(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 523 837**

(51) Int. CI.:

C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2004 E 04776560 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 1648998**

(54) Título: **Agentes de unión específica al factor de crecimiento de hepatocitos**

(30) Prioridad:

18.07.2003 US 488681 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.12.2014

(73) Titular/es:

AMGEN INC. (50.0%)
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US y
AMGEN FREMONT INC. (50.0%)

(72) Inventor/es:

BURGESS, TERESA L.;
COXON, ANGELA;
GREEN, LARRY L. y
ZHANG, KE

(74) Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

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

Agentes de unión específica al factor de crecimiento de hepatocitos

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 60/488.681, presentada el 18 de julio de 2003.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a agentes de unión específica que se unen al factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). También se describen composiciones, métodos de producción de dichas composiciones y métodos para el tratamiento de diversos trastornos, tales como determinados tipos de cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, tumores sólidos y tumores malignos hematológicos.

Antecedentes de la invención

Se ha identificado el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) como un potente mitógeno para hepatocitos. También se identificó HGF como una proteína secretora de fibroblastos y músculo liso que induce la motilidad de células epiteliales. HGF también se denomina en la bibliografía factor de dispersión (SF).

HGF es un polipéptido heterodimérico multifuncional producido predominantemente por células mesenquimatosas, que actúa como ligando para la tirosina cinasa receptora de Met (Met). El receptor de Met humano también se conoce como "c-met". Se ha mostrado que la señalización a través de la ruta de tirosina cinasa receptora de Met-HGF (Met-HGF) conduce a una serie de respuestas celulares, incluyendo, pero sin limitarse a proliferación (mitosis), dispersión (motilidad), estimulación del movimiento celular a través de una matriz (invasión) y morfogénesis de ramificación. *In vivo*, la ruta de señalización de Met-HGF (Met-HGF) desempeña un papel en, por ejemplo, inducción neural, regeneración del hígado, cicatrización de heridas, angiogénesis, crecimiento, invasión, diferenciación morfológica y desarrollo embrionario normal. Además de estas funciones, el par Met-HGF también puede desempeñar un papel en cánceres humanos. Se ha mostrado que la señalización de Met-HGF aberrante está implicada en tumorigénesis, particularmente en el desarrollo de los fenotipos invasivo y metastásico. También se ha encontrado que determinados patógenos, tales como malaria, se aprovechan de la señalización de Met-HGF aberrante. Véase Carrolo et al., Nat Med. 2003 9(11):1363-9 (12 de octubre de 2003).

Además, algunos grupos han notificado que HGF puede desempeñar un papel en angiogénesis y en enfermedad mediada por angiogénesis, tal como retinopatía diabética proliferativa o degeneración macular. Véase, por ejemplo, Grant, D.S. *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 90(5) 1937-41 (1993); Bussolino *et al.*, J. Cell Bid., 119(3):629-641 (1992); Montesano *et al.*, Cell, 67:901-908 (1991); Canon *et al.*, Br. J. Ophthalmol. 84(7):732-5 (2000). HGF también puede desempeñar un papel en apoptosis o muerte celular programada. Pueden surgir tumores cuando los mecanismos reguladores normales no logran mantener un equilibrio entre proliferación y apoptosis, de manera que las células se acumulan en cantidades excesivas. HGF puede efectuar tanto proliferación como apoptosis, dependiendo del contexto biológico.

Debido a que HGF está implicado en muchos procesos fisiológicos, en determinados casos, puede ser útil tener moléculas que puedan regular su actividad. Por ejemplo, en determinados casos, tales moléculas pueden ser útiles para tratar una variedad de diferentes tipos de cáncer.

El documento WO0134650 describe anticuerpos anti-HGF humano útiles para tratar cáncer cuando se usan en combinaciones. Sugiere que se requiere la unión a múltiples epítopos para neutralizar la actividad.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo aislado que puede unirse a al menos un polipéptido seleccionado de

- SEQ ID NO: 164;
- SEQ ID NO: 165;
- SEQ ID NO: 123;
- aminoácidos 495-556 de HGF humano;
- aminoácidos 507-585 de HGF humano; y
- aminoácidos 506-728 de HGF humano,

en el que el anticuerpo puede neutralizar la unión de HGF a c-Met.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo aislado, en el que el anticuerpo puede unirse a factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), en el que el anticuerpo puede neutralizar la unión de HGF a c-Met y el

anticuerpo se selecciona de:

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 60, 70 y 80 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 90, 100 y 110;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 61, 71 y 81 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 91, 101 y 111;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 62, 72 y 82 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 92, 102 y 112;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 63, 73 y 83 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 93, 103 y 113;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 64, 74 y 84 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 94, 104 y 114;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 65, 75 y 85 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 95, 105 y 115;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 66, 76 y 86 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 96, 106 y 116;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 67, 77 y 87 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 97, 107 y 117;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 68, 78 y 88 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 98, 108 y 118; y

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 69, 79 y 89 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 99, 109 y 119.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo aislado, que puede neutralizar la unión de HGF a c-Met y que compite por la unión a HGF con al menos un anticuerpo seleccionado de:

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 desde el residuo 20 hasta el residuo 141;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 desde el residuo 20 hasta el residuo 137;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 desde el residuo 20 hasta el residuo 148;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 desde el residuo 20 hasta el residuo 144;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 desde el residuo 20 hasta el residuo 142;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 desde el residuo 20 hasta el residuo 140; y

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 desde el residuo 20 hasta el residuo 139.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición que comprende un anticuerpo tal como se describió anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo tal como se describió anteriormente y al menos un agente quimioterápico para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un paciente.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo tal como se describió anteriormente y radioterapia para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un paciente.

Es un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de detección del nivel de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo tal como se describió anteriormente.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de

- SEQ ID NO: 164;
- SEQ ID NO: 165;
- SEQ ID NO: 123;
- aminoácidos 495-556 de HGF humano; y
- aminoácidos 507-585 de HGF humano.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de obtención de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36 que puede unirse a factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) que comprende administrar al menos un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de

- SEQ ID NO: 164;
- SEQ ID NO: 165;
- SEQ ID NO: 123;
- aminoácidos 495-556 de HGF humano; y
- aminoácidos 507-585 de HGF humano

a un animal no humano y obtener un anticuerpo que puede unirse a HGF del animal.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una célula huésped que comprende un primer polinucleótido que codifica para una cadena ligera y un segundo polinucleótido que codifica para una cadena pesada, en la que la cadena ligera y la cadena pesada forman un anticuerpo que puede unirse a factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el anticuerpo se selecciona de:

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 60, 70 y 80 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 90, 100 y 110;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 61, 71 y 81 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 91, 101 y 111;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 62, 72 y 82 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 92, 102 y 112;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 63, 73 y 83 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 93, 103 y 113;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 64, 74 y 84 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 94, 104 y 114;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 65, 75 y 85 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 95, 105 y 115;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 66, 76 y 86 y una cadena pesada que

comprende SEQ ID NO: 96, 106 y 116;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 67, 77 y 87 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 97, 107 y 117;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 68, 78 y 88 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 98, 108 y 118; y

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 69, 79 y 89 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 99, 109 y 119.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una célula huésped que comprende un primer polinucleótido que codifica para una cadena ligera y un segundo polinucleótido que codifica para una cadena pesada, en la que la cadena ligera y la cadena pesada forman un anticuerpo que puede neutralizar la unión de HGF a c-Met y que compite por la unión a HGF con al menos un anticuerpo seleccionado de:

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 desde el residuo 20 hasta el residuo 141;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 desde el residuo 20 hasta el residuo 137;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 desde el residuo 20 hasta el residuo 148;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 desde el residuo 20 hasta el residuo 144;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 desde el residuo 20 hasta el residuo 142;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 desde el residuo 20 hasta el residuo 140; y

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 desde el residuo 20 hasta el residuo 139.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de producción de un anticuerpo que puede unirse a factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), que comprende expresar un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido en una célula huésped aislada, en el que el primer polinucleótido codifica para una cadena ligera y el segundo polinucleótido codifica para una cadena pesada, en el que la cadena ligera y la cadena pesada forman un anticuerpo tal como se describió anteriormente.

En determinadas realizaciones, la solicitud proporciona un polipéptido aislado que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) seleccionada de CDR1a, CDR2a y CDR3a

en el que CDR1a comprende la secuencia de aminoácidos a b c d e f g h i j k l m n o p q, en la que el aminoácido a se selecciona de lisina, arginina o glutamina; el aminoácido b se selecciona de serina o alanina; el aminoácido c es serina, el aminoácido d es glutamina; el aminoácido e se selecciona de serina, glicina o ácido aspártico; el aminoácido f se selecciona de valina o isoleucina o no está presente; el aminoácido g se selecciona de leucina o

fenilalanina o no está presente; el aminoácido h se selecciona de fenilalanina o tirosina o no está presente; el aminoácido i es serina o no está presente; el aminoácido j es serina o no está presente; el aminoácido k se selecciona de asparagina, treonina o no está presente; el aminoácido l se selecciona de asparagina, isoleucina o valina; el aminoácido m se selecciona de lisina, arginina, asparagina o ácido aspártico; el aminoácido n se selecciona de asparagina o serina; el aminoácido o se selecciona de tirosina, ácido aspártico, triptófano o asparagina; el aminoácido p es leucina; y el aminoácido q se selecciona de alanina, glicina o asparagina;

en el que CDR2a comprende la secuencia de aminoácidos r s t u v w x, en la que el aminoácido r se selecciona de triptófano, alanina, valina, ácido glutámico o glicina; el aminoácido s es alanina, el aminoácido t es serina, el aminoácido u se selecciona de treonina, serina o ácido aspártico; el aminoácido v se selecciona de arginina o leucina; el aminoácido w se selecciona de ácido glutámico, glutamina o alanina; y el aminoácido x se selecciona de serina, asparagina o treonina;

en el que CDR3a comprende la secuencia de aminoácidos y z a' b' c' d' e' f' g' h', en la que el aminoácido y se selecciona de glutamina o leucina; el aminoácido z se selecciona de glutamina, asparagina o arginina; el aminoácido a' se selecciona de tirosina, histidina, alanina o serina; el aminoácido b' se selecciona de fenilalanina, tirosina, ácido aspártico, asparagina o isoleucina; el aminoácido c' se selecciona de serina, glicina o asparagina; el aminoácido d' se selecciona de prolina, tirosina, treonina, fenilalanina, ácido aspártico, leucina o triptófano; el aminoácido e' es prolina; el aminoácido f es prolina o no está presente; el aminoácido g' es triptófano, leucina, prolina, tirosina o isoleucina; y el aminoácido h' es treonina o asparagina; y

en el que el polipéptido, en asociación con una cadena pesada de anticuerpo, puede unirse a factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).

En determinadas realizaciones, la solicitud proporciona un polipéptido aislado que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) seleccionada de CDR1b, CDR2b y CDR3b

en el que CDR1b comprende la secuencia de aminoácidos a b c d e f g, en la que el aminoácido a es serina o no está presente; el aminoácido b se selecciona de ácido aspártico o glicina, o no está presente; el aminoácido c se selecciona de ácido aspártico, glicina, serina, valina, treonina o isoleucina; el aminoácido d es tirosina; el aminoácido e se selecciona de tirosina o glicina; el aminoácido f se selecciona de isoleucina, metionina o triptófano; y el aminoácido g se selecciona de histidina, asparagina o serina;

en el que CDR2b comprende la secuencia de aminoácidos h i j k l m n o p q r s t u v w x, en la que el aminoácido h se selecciona de triptófano, tirosina, valina, asparagina o ácido glutámico; el aminoácido i se selecciona de isoleucina, fenilalanina o valina; el aminoácido j se selecciona de asparagina, serina, triptófano o tirosina; el aminoácido k se selecciona de prolina, serina, tirosina o histidina; el aminoácido l se selecciona de asparagina, serina o ácido aspártico; el aminoácido m se selecciona de serina o glicina; el aminoácido n se selecciona de glicina o serina, o no está presente; el aminoácido o se selecciona de glicina, treonina, ácido aspártico, serina, isoleucina o asparagina; el aminoácido p se selecciona de treonina, isoleucina o lisina; el aminoácido q se selecciona de asparagina o tirosina; el aminoácido r se selecciona de tirosina o histidina; el aminoácido s se selecciona de alanina o asparagina; el aminoácido t se selecciona de glutamina, ácido aspártico o prolina; el aminoácido u se selecciona de lisina o serina; el aminoácido v se selecciona de fenilalanina, valina o leucina; el aminoácido w se selecciona de glutamina o lisina y el aminoácido x se selecciona de glicina o serina;

en el que CDR3b comprende la secuencia de aminoácidos y z a' b' c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' m' n' o' p' q' r', en la que el aminoácido y se selecciona de ácido glutámico, ácido aspártico, serina o glicina, o no está presente; el aminoácido z se selecciona de leucina, ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, prolina o glicina, o no está presente; el aminoácido a' se selecciona de ácido glutámico, tirosina o leucina, o no está presente; el aminoácido b' se selecciona de leucina, asparagina, glicina, histidina, tirosina o triptófano, o no está presente; el aminoácido c' se selecciona de arginina, serina, ácido glutámico, tirosina, glicina o fenilalanina, o no está presente; el aminoácido d' es glicina o no está presente; el aminoácido e' se selecciona de triptófano o tirosina, o no está presente; el aminoácido f' es ácido aspártico o no está presente; el aminoácido g' se selecciona de serina o arginina, o no está presente; el aminoácido h' es serina o no está presente; el aminoácido i' se selecciona de glicina o tirosina, o no está presente; el aminoácido j' se selecciona de tirosina, ácido glutámico o ácido aspártico, o no está presente; el aminoácido k' se selecciona de tirosina, fenilalanina o ácido aspártico, o no está presente; el aminoácido l' se selecciona de tirosina, ácido aspártico, histidina o triptófano, o no está presente; el aminoácido m' se selecciona de tirosina, glicina, ácido aspártico, prolina o serina, o no está presente; el aminoácido n' se selecciona de glicina, valina, tirosina o ácido aspártico, o no está presente; el aminoácido o' se selecciona de leucina, alanina, glicina o tirosina, o no está presente; el aminoácido p' se selecciona de metionina, fenilalanina o tirosina; el aminoácido q' es ácido aspártico y el aminoácido r' se selecciona de valina, tirosina, isoleucina o prolina; y

en el que el polipéptido, en asociación con una cadena ligera de anticuerpo, puede unirse a HGF.

En determinadas realizaciones, la solicitud proporciona un agente de unión específica aislado, en el que el agente de unión específica comprende:

(i) un primer polipéptido que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR)

seleccionada de CDR1a, CDR2a y CDR3a

en el que CDR1a comprende la secuencia de aminoácidos a b c d e f g h I j k I m n o p q, en la que el aminoácido a se selecciona de lisina, arginina o glutamina; el aminoácido b se selecciona de serina o alanina; el aminoácido c es serina, el aminoácido d es glutamina; el aminoácido e se selecciona de serina, glicina o ácido aspártico; el aminoácido f se selecciona de valina o isoleucina o no está presente; el aminoácido g se selecciona de leucina o fenilalanina o no está presente; el aminoácido h se selecciona de fenilalanina o tirosina o no está presente; el aminoácido i es serina o no está presente; el aminoácido j es serina o no está presente; el aminoácido k se selecciona de asparagina, treonina, o no está presente; el aminoácido I se selecciona de asparagina, isoleucina o valina; el aminoácido m se selecciona de lisina, arginina, serina, asparagina o ácido aspártico; el aminoácido n se selecciona de asparagina o serina; el aminoácido o se selecciona de tirosina, ácido aspártico, triptófano o asparagina; el aminoácido p es leucina; y el aminoácido q se selecciona de alanina, glicina o asparagina;

en el que CDR2a comprende la secuencia de aminoácidos r s t u v w x, en la que el aminoácido r se selecciona de triptófano, alanina, valina, ácido glutámico o glicina; el aminoácido s es alanina, el aminoácido t es serina, el aminoácido u se selecciona de treonina, serina o ácido aspártico; el aminoácido v se selecciona de arginina o leucina; el aminoácido w se selecciona de ácido glutámico, glutamina o alanina; y el aminoácido x se selecciona de serina, asparagina o treonina;

en el que CDR3a comprende la secuencia de aminoácidos y z a' b' c' d' e' f' g' h', en la que el aminoácido y se selecciona de glutamina o leucina; el aminoácido z se selecciona de glutamina, asparagina o arginina; el aminoácido a' se selecciona de tirosina, histidina, alanina o serina; el aminoácido b' se selecciona de fenilalanina, tirosina, ácido aspártico, asparagina o isoleucina; el aminoácido c' se selecciona de serina, glicina o asparagina; el aminoácido d' se selecciona de prolina, tirosina, treonina, fenilalanina, ácido aspártico, leucina o triptófano; el aminoácido e' es prolina; el aminoácido f' es prolina o no está presente; el aminoácido g' es triptófano, leucina, prolina, tirosina o isoleucina; y el aminoácido h' es treonina o asparagina; y

en el que el primer polipéptido, en asociación con una cadena pesada de anticuerpo, puede unirse a factor de crecimiento de hepatocitos (HGF); y

(ii) un segundo polipéptido que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) seleccionada de CDR1b, CDR2b o CDR3b

en el que CDR1b comprende la secuencia de aminoácidos a b c d e f g, en la que el aminoácido a es serina o no está presente; el aminoácido b se selecciona de ácido aspártico o glicina, o no está presente; el aminoácido c se selecciona de ácido aspártico, glicina, serina, valina, treonina o isoleucina; el aminoácido d es tirosina; el aminoácido e se selecciona de tirosina o glicina; el aminoácido f se selecciona de isoleucina, metionina o triptófano; y el aminoácido g se selecciona de histidina, asparagina o serina;

en el que CDR2b comprende la secuencia de aminoácidos h i j k I m n o p q r s t u v w x, en la que el aminoácido h se selecciona de triptófano, tirosina, valina, asparagina o ácido glutámico; el aminoácido i se selecciona de isoleucina, fenilalanina o valina; el aminoácido j se selecciona de asparagina, serina, triptófano o tirosina; el aminoácido k se selecciona de prolina, serina, tirosina o histidina; el aminoácido I se selecciona de asparagina, serina o ácido aspártico; el aminoácido m se selecciona de serina o glicina; el aminoácido n se selecciona de glicina o serina, o no está presente; el aminoácido o se selecciona de glicina, treonina, ácido aspártico, serina, isoleucina o asparagina; el aminoácido p se selecciona de treonina, isoleucina o lisina; el aminoácido q se selecciona de asparagina o tirosina; el aminoácido r se selecciona de tirosina o histidina; el aminoácido s se selecciona de alanina o asparagina; el aminoácido t se selecciona de glutamina, ácido aspártico o prolina; el aminoácido u se selecciona de lisina o serina; el aminoácido v se selecciona de fenilalanina, valina o leucina; el aminoácido w se selecciona de glutamina o lisina y el aminoácido x se selecciona de glicina o serina;

en el que CDR3b comprende la secuencia de aminoácidos y z a' b' c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' m' n' o' p' q' r', en la que el aminoácido y se selecciona de ácido glutámico, ácido aspártico, serina o glicina, o no está presente; el aminoácido z se selecciona de leucina, ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, prolina o glicina, o no está presente; el aminoácido a' se selecciona de ácido glutámico, tirosina o leucina, o no está presente; el aminoácido b' se selecciona de leucina, asparagina, glicina, histidina, tirosina o triptófano, o no está presente; el aminoácido c' se selecciona de arginina, serina, ácido glutámico, tirosina, glicina o fenilalanina, o no está presente; el aminoácido d' es glicina o no está presente; el aminoácido e' se selecciona de triptófano o tirosina, o no está presente; el aminoácido f' es ácido aspártico o no está presente; el aminoácido g' se selecciona de serina o arginina, o no está presente; el aminoácido h' es serina o no está presente; el aminoácido i' se selecciona de glicina o tirosina, o no está presente; el aminoácido j' se selecciona de tirosina, ácido glutámico o ácido aspártico, o no está presente; el aminoácido k' se selecciona de tirosina, fenilalanina o ácido aspártico, o no está presente; el aminoácido l' se selecciona de tirosina, ácido aspártico, histidina o triptófano, o no está presente; el aminoácido m' se selecciona de tirosina, glicina, ácido aspártico, prolina o serina, o no está presente; el aminoácido n' se selecciona de glicina, valina, tirosina o ácido aspártico, o no está presente; el aminoácido o' se selecciona de leucina, alanina, glicina o tirosina, o no está presente; el aminoácido p' se selecciona de metionina, fenilalanina o tirosina; el aminoácido q' es ácido aspártico y el aminoácido r' se selecciona de valina, tirosina, isoleucina o prolina; y

en el que el segundo polipéptido, en asociación con una cadena ligera de anticuerpo, puede unirse a HGF.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 y 42.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 y 43.

En determinadas realizaciones, la solicitud proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19.

En determinadas realizaciones, la solicitud proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20.

En determinadas realizaciones, la solicitud proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un polipéptido que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) seleccionada de CDR1a, CDR2a y CDR3a

en el que CDR1a comprende la secuencia de aminoácidos a b c d e f g h i j k l m n o p q, en la que el aminoácido a se selecciona de lisina, arginina o glutamina; el aminoácido b se selecciona de serina o alanina; el aminoácido c es serina, el aminoácido d es glutamina; el aminoácido e se selecciona de serina, glicina o ácido aspártico; el aminoácido f se selecciona de valina o isoleucina o no está presente; el aminoácido g se selecciona de leucina o fenilalanina o no está presente; el aminoácido h se selecciona de fenilalanina o tirosina o no está presente; el aminoácido i es serina o no está presente; el aminoácido j es serina o no está presente; el aminoácido k se selecciona de asparagina, treonina, o no está presente; el aminoácido l se selecciona de asparagina, isoleucina o valina; el aminoácido m se selecciona de lisina, arginina, serina, asparagina o ácido aspártico; el aminoácido n se selecciona de asparagina o serina; el aminoácido o se selecciona de tirosina, ácido aspártico, triptófano o asparagina; el aminoácido p es leucina; y el aminoácido q se selecciona de alanina, glicina o asparagina;

en el que CDR2a comprende la secuencia de aminoácidos r s t u v w x, en la que el aminoácido r se selecciona de triptófano, alanina, valina, ácido glutámico o glicina; el aminoácido s es alanina, el aminoácido t es serina, el aminoácido u se selecciona de treonina, serina o ácido aspártico; el aminoácido v se selecciona de arginina o leucina; el aminoácido w se selecciona de ácido glutámico, glutamina o alanina; y el aminoácido x se selecciona de serina, asparagina o treonina;

en el que CDR3a comprende la secuencia de aminoácidos y z a' b' c' d' e' f' g' h', en la que el aminoácido y se selecciona de glutamina o leucina; el aminoácido z se selecciona de glutamina, asparagina o arginina; el aminoácido a' se selecciona de tirosina, histidina, alanina o serina; el aminoácido b' se selecciona de fenilalanina, tirosina, ácido aspártico, asparagina o isoleucina; el aminoácido c' se selecciona de serina, glicina o asparagina; el aminoácido d' se selecciona de prolina, tirosina, treonina, fenilalanina, ácido aspártico, leucina o triptófano; el aminoácido e' es prolina; el aminoácido f' es prolina o no está presente; el aminoácido g' es triptófano, leucina, prolina, tirosina o isoleucina; y el aminoácido h' es treonina o asparagina; y

en el que el polipéptido, en asociación con una cadena pesada de anticuerpo, puede unirse a factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).

En determinadas realizaciones, la solicitud proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un polipéptido que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) seleccionada de CDR1b, CDR2b y CDR3b

en el que CDR1b comprende la secuencia de aminoácidos a b c d e f g, en la que el aminoácido a es serina o no está presente; el aminoácido b se selecciona de ácido aspártico o glicina, o no está presente; el aminoácido c se selecciona de ácido aspártico, glicina, serina, valina, treonina o isoleucina; el aminoácido d es tirosina; el aminoácido e se selecciona de tirosina o glicina; el aminoácido f se selecciona de isoleucina, metionina o triptófano; y el aminoácido g se selecciona de histidina, asparagina o serina;

en el que CDR2b comprende la secuencia de aminoácidos h i j k l m n o p q r s t u v w x, en la que el aminoácido h se selecciona de triptófano, tirosina, valina, asparagina o ácido glutámico; el aminoácido i se selecciona de isoleucina, fenilalanina o valina; el aminoácido j se selecciona de asparagina, serina, triptófano o tirosina; el aminoácido k se selecciona de prolina, serina, tirosina o histidina; el aminoácido l se selecciona de asparagina, serina o ácido aspártico; el aminoácido m se selecciona de serina o glicina; el aminoácido n se selecciona de glicina o serina, o no está presente; el aminoácido o se selecciona de glicina, treonina, ácido aspártico, serina, isoleucina o asparagina; el aminoácido p se selecciona de treonina, isoleucina o lisina; el aminoácido q se selecciona de asparagina o tirosina; el aminoácido r se selecciona de tirosina o histidina; el aminoácido s se selecciona de alanina o asparagina; el aminoácido t se selecciona de glutamina, ácido aspártico o prolina; el aminoácido u se selecciona de lisina o serina; el aminoácido v se selecciona de fenilalanina, valina o leucina; el aminoácido w se selecciona de glutamina o lisina y el aminoácido x se selecciona de glicina o serina;

en el que CDR3b comprende la secuencia de aminoácidos y z a' b' c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' m' n' o' p' q' r', en la que el aminoácido y se selecciona de ácido glutámico, ácido aspártico, serina o glicina, o no está presente; el aminoácido z se selecciona de leucina, ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, prolina o glicina, o no está presente; el aminoácido a' se selecciona de ácido glutámico, tirosina o leucina, o no está presente; el aminoácido b' se selecciona de leucina, asparagina, glicina, histidina, tirosina o triptófano, o no está presente; el aminoácido c' se selecciona de arginina, serina, ácido glutámico, tirosina, glicina o fenilalanina, o no está presente; el aminoácido d' es glicina o no está presente; el aminoácido e' se selecciona de triptófano o tirosina, o no está presente; el aminoácido f' es ácido aspártico o no está presente; el aminoácido g' se selecciona de serina o arginina, o no está presente; el aminoácido h' es serina o no está presente; el aminoácido i' se selecciona de glicina o tirosina, o no está presente; el aminoácido j' se selecciona de tirosina, ácido glutámico o ácido aspártico, o no está presente; el aminoácido k' se selecciona de tirosina, fenilalanina o ácido aspártico, o no está presente; el aminoácido l' se selecciona de tirosina, ácido aspártico, histidina o triptófano, o no está presente; el aminoácido m' se selecciona de tirosina, glicina, ácido aspártico, prolina o serina, o no está presente; el aminoácido n' se selecciona de glicina, valina, tirosina o ácido aspártico, o no está presente; el aminoácido o' se selecciona de leucina, alanina, glicina o tirosina, o no está presente; el aminoácido p' se selecciona de metionina, fenilalanina o tirosina; el aminoácido q' es ácido aspártico y el aminoácido r' se selecciona de valina, tirosina, isoleucina o prolina; y

en el que el polipéptido, en asociación con una cadena ligera de anticuerpo, puede unirse a HGF.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona una línea celular aislada que produce un anticuerpo seleccionado de 1.24.1, 1.29.1, 1.60.1, 1.61.3, 1.74.3, 1.75.1, 2.4.4, 2.12.1, 2.40.1 y 3.10.1.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona un método de inhibición de la unión de HGF a Met que comprende administrar un agente de unión específica a HGF.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona un polipéptido que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 164 y 165.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona un polipéptido que consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 164 y 165.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona un agente de unión específica que puede unirse a al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 164 y 165.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona un dominio de unión a antígeno o anticuerpo que puede unirse a al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 164 y 165.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona un método de obtención de un anticuerpo que puede unirse a factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) que comprende administrar al menos un polipéptido seleccionado de SEQ ID NO: 164 y 165 a un animal y obtener un anticuerpo que puede unirse a HGF del animal.

En determinadas realizaciones, la solicitud proporciona un método de disminución o prevención de la unión de un agente de unión específica a factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) administrando un polipéptido que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 164 y 165.

En determinadas realizaciones, la solicitud proporciona un método de disminución o prevención de la unión de un agente de unión específica a factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) administrando un polipéptido que consiste en al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 164 y 165.

Otras realizaciones de esta invención resultarán fácilmente evidentes a partir de la descripción adjunta proporcionada.

Breve descripción de las figuras

La figura 1A muestra un dendrograma de cadenas ligeras kappa de determinados anticuerpos frente a HGF mostrando sus relaciones de línea germinal. Las identificaciones de los genes de la línea germinal se indican a la derecha de la designación del anticuerpo. La figura 1 B muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de regiones variables de cadena ligera kappa de determinados anticuerpos frente a HGF. Las identificaciones de los genes de la línea germinal se indican a la izquierda. Las regiones CDR se indican como líneas en negrita por encima de las secuencias alineadas.

La figura 2A muestra un dendrograma de cadenas pesadas gamma de determinados anticuerpos frente a HGF mostrando sus relaciones de línea germinal. Las identificaciones de los genes de la línea germinal se indican a la derecha de la designación del anticuerpo. La figura 2B muestra una alineación de secuencia de aminoácidos de regiones variables de cadena pesada gamma de determinados anticuerpos frente a HGF. Las identificaciones de los genes de la línea germinal se indican a la izquierda. Las regiones CDR se indican como líneas en negrita por encima de las secuencias alineadas.

La figura 3 muestra secuencias de ADN que codifican para regiones variables de las cadenas tanto ligeras como

pesadas de determinados anticuerpos frente a HGF. Se indican para cada secuencia el nombre del anticuerpo, la designación de la línea germinal y la ID de secuencia. La secuencia de péptido señal natural está subrayada. También se muestran las secuencias de ADN de las regiones constantes de Kappa, IgG1 e IgG2 humanas.

La figura 4 muestra secuencias de aminoácidos de regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de determinados anticuerpos frente a HGF. Se indican para cada secuencia el nombre del anticuerpo, la designación de la línea germinal y la ID de secuencia. La secuencia de péptido señal natural está subrayada. También se muestran las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de Kappa, IgG1 e IgG2 humanas.

La figura 5 muestra secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las cadenas ligeras y pesadas de determinados anticuerpos frente a HGF. Se indican para cada secuencia el nombre del anticuerpo y la ID de secuencia. La figura 5A muestra secuencias de aminoácidos de CDR de la cadena ligera de determinados anticuerpos frente a HGF. La figura 5B muestra secuencias de aminoácidos de CDR de la cadena pesada de determinados anticuerpos frente a HGF.

La figura 6 muestra resultados de la determinación de K_D de determinados anticuerpos frente a HGF, comentados en el ejemplo 8. La figura 6A muestra datos de un método cinético. La figura 6B muestra datos de un método de equilibrio/disolución.

La figura 7 muestra autorradiogramas de inmunotransferencias de tipo Western comentadas en el ejemplo 8 que someten a prueba la capacidad de determinados anticuerpos para unirse a HGF humano y a HGF de ratón. Los paneles a la izquierda (carriles 1-4) muestran autorradiogramas de experimentos realizados en condiciones no reductoras. Los paneles a la derecha (carriles 5-8) muestran autorradiogramas de experimentos realizados en condiciones reductoras.

La figura 8 muestra datos de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de experimentos comentados en el ejemplo 8, que evalúan la unión de determinados anticuerpos a determinadas dianas. La parte superior de la figura 8 muestra datos de FACS de muestras control que carecen de un agente de unión específica. Los paneles 1 y 2 (desde la izquierda) muestran datos de muestras control que carecen de diana incubada con FITC y PE, respectivamente. Los paneles 3 y 4 muestran datos de muestras control que comprenden HGF d5 marcado con FITC y PE, respectivamente, pero que carecen de un agente de unión específica. Los paneles por debajo de la línea continua muestran datos de FACS de experimentos que someten a prueba cinco anticuerpos frente a HGF. Para cada anticuerpo, el primer panel (desde la izquierda) muestra datos de muestras control que carecen de diana, el segundo de los cuatro paneles muestra datos de experimentos en los que la diana era: HGF humano, HGF de ratón y HGF d5 humano, respectivamente.

La figura 9A muestra un esquema de un plásmido que codifica para avidina adyacente a un sitio de clonación múltiple que se usó para generar proteínas de fusión que comprenden avidina y proteína diana tal como se comenta en el ejemplo 8. La figura 9B muestra la secuencia de avidina de pollo.

Las figuras 10A y 10B muestran representaciones esquemáticas de determinadas proteínas de fusión y resultados de ensayos de unión, comentados en los ejemplos 8C y 8D, usando esas proteínas de fusión. La figura 10C muestra una representación esquemática de determinadas proteínas de fusión que tienen mutaciones puntuales, inserciones, o deleciones. La figura 10D muestra las secuencias de aminoácidos de HGF humano y de ratón en la región de aminoácidos 451-731 (SEQ ID NO. 120 y 121, respectivamente), con la correspondiente secuencia consenso indicada (SEQ ID NO. 122).

Las figuras 11A y 11B muestran análisis de HPLC de experimentos de protección frente a proteasas en HGF humano tal como se comenta en el ejemplo 8E. La figura 11C muestra las secuencias de aminoácidos de péptidos protegidos de la digestión proteolítica mediante la unión al anticuerpo 2.12.1 en ese trabajo.

Las figuras 12A-12D muestran resultados de ensayos de unión competitiva comentados en el ejemplo 8.

La figura 13 muestra datos de CI50 de ensayos de neutralización comentados en el ejemplo 9.

La figura 14 muestra datos de ensayos de neutralización en células PC3 comentados en el ejemplo 10.

La figura 15 muestra datos de ensayos de inhibición en células U-87 comentados en el ejemplo 10.

La figura 16 muestra resultados de experimentos comentados en el ejemplo 11 que evalúan el efecto de determinados anticuerpos frente a HGF en tumores por xenoinjerto de U-87 MG en ratones. La figura 16A muestra datos de respuesta a la dosis para el anticuerpo 2.4.4 en crecimiento tumoral por xenoinjerto de U-87 MG en el modelo de enfermedad residual mínima. La figura 16B muestra los datos de respuesta a la dosis para el anticuerpo 2.4.4 en crecimiento tumoral por xenoinjerto de U-87 en un modelo de enfermedad establecida. Las figuras 16C, 16D, 16E y 16F muestran datos de experimentos comparativos que someten a prueba anticuerpos frente a HGF en un modelo de enfermedad residual mínima de U-87 (16C y 16D) o en un modelo de enfermedad establecida de U-87 (16E y 16F).

Descripción detallada de determinadas realizaciones a modo de ejemplo

Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son sólo a modo de ejemplo y explicativo y no restringen la invención, tal como se reivindica. En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitativo. Además, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y tanto elementos como componentes que comprenden más de una subunidad a menos que se indique específicamente lo contrario. Además, el uso del término "parte" puede incluir parte de un resto o el resto completo.

Los encabezamientos de sección usados en el presente documento son sólo para fines de organización y no debe considerarse que limitan el objeto descrito.

Definiciones

Pueden usarse técnicas convencionales para la síntesis de ADN recombinante, oligonucleótidos y cultivo tisular y transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Pueden realizarse reacciones enzimáticas y técnicas de purificación según las especificaciones del fabricante o tal como se logra comúnmente en la técnica o tal como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores puede realizarse generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se tratan a lo largo de toda la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). A menos que se proporcionen definiciones específicas, las nomenclaturas utilizadas en conexión con y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Pueden usarse técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración y tratamiento de pacientes.

Tal como se utiliza según la presente descripción, debe entenderse que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

El término "factor de crecimiento de hepatocitos" o "HGF" se refiere a un polipéptido tal como se expone en Nakamura *et al.*, Nature 342: 440-443 (1989) o fragmentos del mismo, así como polipéptidos relacionados, que incluyen, pero no se limitan a, variantes alélicas, variantes de corte y empalme, variantes de derivado, variantes por sustitución, variantes por deleción y/o variantes por inserción, polipéptidos de fusión y homólogos entre especies. En determinadas realizaciones, un polipéptido HGF incluye residuos terminales, tales como, pero sin limitarse a, residuos de secuencia líder, residuos de selección como diana, residuos de metionina amino terminal, residuos de lisina, residuos de etiqueta y/o residuos de proteína de fusión.

El término "agente de unión específica" se refiere a una molécula natural o no natural que se une específicamente a una diana. Los ejemplos de agentes de unión específica incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos y compuestos de molécula pequeña. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica es un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica es una región de unión a antígeno.

El término "agente de unión específica a HGF" se refiere a un agente de unión específica que se une específicamente a cualquier parte de HGF. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica a HGF es un anticuerpo frente a HGF. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica es una región de unión a antígeno.

El término "anticuerpo policlonal" se refiere a una mezcla heterogénea de anticuerpos que se unen a diferentes epítopos del mismo antígeno.

El término "anticuerpos monoclonales" se refiere a una colección de anticuerpos codificados por la misma molécula de ácido nucleico. En determinadas realizaciones, se producen anticuerpos monoclonales mediante un solo hibridoma u otra línea celular, o mediante un mamífero transgénico. Los anticuerpos monoclonales normalmente reconocen el mismo epítopo. El término "monoclonal" no se limita a ningún método particular para preparar un anticuerpo.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una parte del anticuerpo es homóloga a una secuencia de una especie particular o una clase de anticuerpo particular, mientras que otra parte del anticuerpo es homóloga a una secuencia de una especie o clase de anticuerpo diferente. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.816.567 y Morrison *et al.*, Proc Natl Acad Sci (USA), 81:6851-6855 (1985).

El término "anticuerpo injertado con CDR" se refiere a un anticuerpo en el que la CDR de un anticuerpo se inserta en el entramado de otro anticuerpo. En determinadas realizaciones, el anticuerpo del que se deriva la CDR y el anticuerpo del que se deriva el entramado son de especies diferentes. En determinadas realizaciones, el anticuerpo

del que se deriva la CDR y el anticuerpo del que se deriva el entramado son de isotipos diferentes.

El término "anticuerpo multiespecífico" se refiere a un anticuerpo en el que dos o más regiones variables se unen a epítopos diferentes. Los epítopos pueden estar en la misma o en diferentes dianas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo multiespecífico es un "anticuerpo biespecífico", que reconoce dos epítopos diferentes en el mismo o en diferentes antígenos.

El término "anticuerpo catalítico" se refiere a un anticuerpo en el que se unen uno o más restos catalíticos. En determinadas realizaciones, un anticuerpo catalítico es un anticuerpo citotóxico, que comprende un resto citotóxico.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo en el que toda o parte de una región de entramado de anticuerpo se deriva de un ser humano, pero toda o parte de una o más regiones CDR se derivan de otra especie, por ejemplo un ratón.

El término "anticuerpo completamente humano" se refiere a un anticuerpo en el que tanto la CDR como el entramado comprenden secuencias sustancialmente humanas. En determinadas realizaciones, se producen anticuerpos completamente humanos en mamíferos no humanos, incluyendo, pero sin limitarse a, ratones, ratas y lagomorfos. En determinadas realizaciones, se producen anticuerpos completamente humanos en células de hibridoma. En determinadas realizaciones, se producen anticuerpos completamente humanos de manera recombinante.

El término "anticuerpo anti-idiotipo" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a otro anticuerpo.

El término "se une específicamente" se refiere a la capacidad de un agente de unión específica para unirse a una diana con mayor afinidad de la que se une a una no diana. En determinadas realizaciones, la unión específica se refiere a la unión a una diana con una afinidad que es al menos 10, 50, 100, 250, 500 ó 1000 veces mayor que la afinidad por una no diana. En determinadas realizaciones, la afinidad se determina mediante un ensayo ELISA de afinidad. En determinadas realizaciones, la afinidad se determina mediante un ensayo BIAcore. En determinadas realizaciones, la afinidad se determina mediante un método cinético. En determinadas realizaciones, la afinidad se determina mediante un método de equilibrio/disolución.

El término "epítopo" se refiere a una parte de una molécula a la que puede unirse un agente de unión específica. En determinadas realizaciones, los epítopos comprenden normalmente agrupamientos de moléculas de superficie químicamente activos, tales como, por ejemplo, aminoácidos o cadenas laterales de hidrato de carbono y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas. Los epítopos pueden ser contiguos o no contiguos. En determinadas realizaciones, los epítopos pueden ser miméticos porque comprenden una estructura tridimensional que es similar a un epítopo usado para generar el anticuerpo, aunque no comprendan ninguno o comprendan sólo algunos de los residuos de aminoácido encontrados en ese epítopo usado para generar el anticuerpo.

El término "epítopo de inhibición y/o neutralización" se refiere a un epítopo, que cuando queda unido a un agente de unión específica da como resultado una disminución de una actividad biológica *in vivo*, *in vitro* y/o *in situ*. En determinadas realizaciones, un epítopo de neutralización está ubicado en o está asociado con una región biológicamente activa de una diana.

El término "epítopo de activación" se refiere a un epítopo, que cuando queda unido a un agente de unión específica da como resultado la activación o el mantenimiento de una actividad biológica *in vivo*, *in vitro* y/o *in situ*. En determinadas realizaciones, un epítopo de activación está ubicado en o está asociado con una región biológicamente activa de una diana.

El término "polinucleótido aislado" tal como se usa en el presente documento significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen el "polinucleótido aislado" (1) no está asociado con todo o una parte de un polinucleótido en el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está unido a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término "proteína aislada" al que se hace referencia en el presente documento significa una proteína codificada por ADNc, ARN recombinante o de origen sintético o alguna combinación de los mismos, que (1) está libre de al menos algunas proteínas con las que se encontraría normalmente, (2) está esencialmente libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, o (4) no se produce en la naturaleza.

El término "polipéptido" se usa en el presente documento como un término genérico para referirse a proteínas nativas, o modificaciones de tales proteínas que tienen deleciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la secuencia nativa. En determinadas realizaciones, el polipéptido tiene deleciones, adiciones y/o sustituciones de al menos uno pero no más de 50, 30, 20, 15, 10, 8, 5 ó 3 aminoácidos de la secuencia nativa.

El término "que se produce de manera natural" tal como se usa en el presente documento tal como se aplica a un

objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente de forma artificial en el laboratorio o que por lo demás se produce de manera natural.

El término "unido operativamente" tal como se usa en el presente documento se refiere a componentes que se encuentran en una relación que les permite funcionar en su manera deseada. Por ejemplo, una secuencia control "unida operativamente" a una secuencia codificante está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias control.

El término "secuencia control" tal como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de polinucleótido que pueden efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están ligadas. La naturaleza de tales secuencias control puede diferir dependiendo del organismo huésped. Según determinadas realizaciones, las secuencias control para procariotas pueden incluir promotor, sitio de unión riobosómica y secuencia de terminación de la transcripción. Según determinadas realizaciones, las secuencias control para eucariotas pueden incluir promotores, uno o más potenciadores y secuencia de terminación de la transcripción. En determinadas realizaciones, las "secuencias control" pueden incluir secuencias líder y/o secuencias de pareja de fusión.

El término "polinucleótido" tal como se le hace referencia en el presente documento significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud. En determinadas realizaciones, las bases pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas mono y bicatenarias de ADN.

El término "oligonucleótido" al que se le hace referencia en el presente documento incluye nucleótidos que se producen de manera natural y modificados unidos entre sí por uniones de oligonucleótido que se producen de manera natural y/o que no se producen de manera natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que comprenden generalmente una longitud de 200 bases o menos. En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos tienen de 10 a 60 bases de longitud. En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos tienen de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, por ejemplo para su uso en la construcción de un mutante génico. Los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido.

El término "nucleótidos que se producen de manera natural" incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" incluye nucleótidos con grupos azúcar modificados o sustituidos y similares. El término "uniones de oligonucleótido" incluye uniones de oligonucleótidos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamidato y similares. Véase, por ejemplo, LaPlanche *et al.* Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec *et al.* J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein *et al.* Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon *et al.* Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon *et al.* Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, págs. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford Inglaterra (1991)); Stec *et al.* Patente estadounidense n.° 5.151.510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). En determinadas realizaciones, un oligonucleótido puede incluir un marcador para la detección.

La identidad y similitud de polipéptidos relacionados puede calcularse fácilmente mediante métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M. y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York (1991); y Carillo *et al.*, SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).

Determinados métodos para determinar la identidad se diseñan para dar la máxima coincidencia entre las secuencias sometidas a prueba. Los métodos para determinar la identidad se describen en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programa informático para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete del programa GCG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, Nucl. Acid. Res., 12:387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol, 215:403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible al público a partir del Centro nacional de información biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*) (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul *et al.* NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul *et al.*, citado anteriormente (1990)). También puede usarse el algoritmo de Smith Waterman bien conocido para determinar la identidad.

Determinados esquemas de alineación para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado la coincidencia de sólo una región corta de las dos secuencias y esta región alineada pequeña puede tener identidad de secuencia muy alta incluso aunque no haya ninguna relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, el método de alineación seleccionado (programa GAP) dará como resultado una alineación que abarca al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido diana.

Por ejemplo, usando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), se alinean dos polipéptidos para los que va a determinarse el porcentaje de identidad de secuencia para la coincidencia óptima de sus aminoácidos respectivos (el "intervalo de coincidencia", tal como se determina mediante el algoritmo). En determinadas realizaciones, se usa una penalización por apertura de hueco (que se calcula como 3X la diagonal promedio; la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que se está usando; la "diagonal" es la puntuación o el número asignado a cada coincidencia de aminoácido perfecta mediante la matriz de comparación particular) y una penalización por extensión de hueco (que es habitualmente 1/10 veces la penalización por apertura de hueco), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62 junto con el algoritmo. En determinadas realizaciones, también se usa una matriz de comparación convencional (véase Dayhoff *et al.*, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5(3) (1978) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:10915-10919 (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62) por el algoritmo.

En determinadas realizaciones, los parámetros para una comparación de secuencia de polipéptido incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman *et al.*, J. Mol. Biol., 48:443-453 (1970);

Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff *et al.*, citado anteriormente (1992);

Penalización por hueco: 12

Penalización por longitud de hueco: 4

Umbral de similitud: 0

El programa GAP puede ser útil con los parámetros anteriores. En determinadas realizaciones, los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para las comparaciones de polipéptidos (junto con ninguna penalización para los huecos finales) usando el algoritmo GAP.

En determinadas realizaciones, un agente de unión específica comprende una cadena pesada que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 y 43. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica comprende una cadena pesada que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95% a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 y 43. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica comprende una cadena pesada que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 99% a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 y 43.

En determinadas realizaciones, un agente de unión específica comprende una cadena ligera que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 y 42. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica comprende una cadena ligera que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95% a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 y 42. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica comprende una cadena ligera que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 99% a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 y 42.

Tal como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase Immunology-A Synthesis (2ª edición, E. S. Golub y D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como α-aminoácidos, α-aminoácidos disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, ε-N,N,N-trimetil-lisina, ε-N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ-N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptido usada en el presente documento, la dirección hacia la izquierda es la dirección amino-terminal y la dirección hacia la derecha es la dirección carboxilo-terminal, según el convenio y el uso convencional.

De manera similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de secuencias de polinucleótido monocatenarias es el extremo 5'; la dirección hacia la izquierda de secuencias de polinucleótido bicatenarias se denomina la dirección 5'. La dirección de adición de 5' a 3' de transcritos de ARN en formación se denomina dirección de transcripción, las regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 5' con respecto al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias en el sentido de 5", las regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 3' con

respecto al extremo 3' en el transcrito de ARN se denominan "secuencias en el sentido de 3'".

Las sustituciones de aminoácido conservativas pueden abarcar residuos de aminoácido que no se producen de manera natural, que normalmente se incorporan mediante síntesis química de péptidos en lugar de mediante síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas revertidas o invertidas de restos de aminoácido.

Los residuos que se producen de manera natural pueden dividirse en clases basándose en propiedades de cadena lateral comunes:

1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

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

3) ácidos: Asp, Glu;

4) básicos: His, Lys, Arg;

5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y

6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Por ejemplo, las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Tales residuos sustituidos pueden introducirse en regiones del anticuerpo humano que son homólogas con anticuerpos no humanos, o en las regiones no homólogas de la molécula.

Al realizar tales cambios, según determinadas realizaciones, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en sus de características de hidrofobicidad y carga. Estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

En la técnica se entiende la importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir función biológica interactiva a una proteína. Véase, por ejemplo, Kyte *et al.*, J. Mol. Biol., 157:105-131 (1982). Se sabe que determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen una puntuación o índice hidropático similar y aún mantener una actividad biológica similar. Al realizar cambios basándose en el índice hidropático, en determinadas realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ±2. En determinadas realizaciones, se incluyen los que están dentro ±1 y en determinadas realizaciones, se incluyen los que están dentro de ±0,5.

En la técnica también se entiende que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente basándose en la hidrofilicidad, particularmente cuando la proteína o el péptido biológicamente funcional creado de esta manera se prevé para su uso en realizaciones inmunológicas, tal como el presente caso. En determinadas realizaciones, la hidrofilicidad promedio local más alta de una proteína, tal como viene determinada por la hidrofilicidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Los siguientes valores de hidrofilicidad se han asignado a estos residuos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) y triptófano (-3,4). Al realizar cambios basándose en valores de hidrofilicidad similares, en determinadas realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilicidad están dentro de ±2, en determinadas realizaciones, se incluyen los que están dentro de ±1, y en determinadas realizaciones, se incluyen los que están dentro de ±0,5. También pueden identificarse epítopos a partir de secuencias primarias de aminoácidos basándose en la hidrofilicidad. Estas regiones también se denominan "regiones de núcleo epitópico".

En la tabla 1 se exponen sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo.

Tabla 1:

Sustituciones de aminoácidos

Residuos originales	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones a modo de ejemplo más específicas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln

Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, ácido 1,4-diaminobutírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Un experto en la técnica podrá determinar variantes adecuadas del polipéptido expuesto en el presente documento usando técnicas bien conocidas. En determinados casos, un experto en la técnica puede identificar áreas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir la actividad seleccionando como diana regiones que no se cree que sean importantes para la actividad. En determinados casos, pueden identificarse residuos y partes de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. En determinados casos, las áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden someterse a sustituciones de aminoácidos conservativas sin destruir la actividad biológica o sin afectar de manera adversa la estructura del polipéptido.

Adicionalmente, un experto en la técnica puede revisar estudios de estructura-función que identifican residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o la estructura. En vista de una comparación de este tipo, puede predecirse la importancia de los residuos de aminoácido en una proteína que corresponden a residuos de aminoácido que son importantes para la actividad o la estructura en proteínas similares. Un experto en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos similares químicamente para tales residuos de aminoácido importantes predichos.

Un experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con la estructura en polipéptidos similares. En vista de tal información, en determinados casos, un experto en la técnica puede predecir la alineación de residuos de aminoácido de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. En determinados casos, un experto en la técnica puede elegir no realizar cambios de radicales a los residuos de aminoácido que se predice que están en la superficie de la proteína, puesto que tales residuos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además un experto en la técnica puede generar variantes de prueba que contienen una única sustitución de aminoácido en cada residuo de aminoácido deseado. Las variantes pueden seleccionarse entonces usando ensayos de actividad conocidos por los expertos en la técnica. Tales variantes podrían usarse para reunir información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, si se ha descubierto que un cambio en un residuo de aminoácido particular dio como resultado activad destruida, indeseablemente reducida o inadecuada, pueden evitarse variantes con un cambio de ese tipo. En otras palabras, basándose en la información reunida a partir de tales experimentos de rutina, un experto en la técnica puede determinar fácilmente los aminoácidos en los que deben evitarse sustituciones adicionales o bien solas o bien en combinación con otras mutaciones.

Varias publicaciones científicas se han dedicado a la predicción de la estructura secundaria. Véanse, por ejemplo, Moult J., Curr, Op. en Biotech., 7(4):422-427 (1996), Chou *et al.*, Biochemistry, 13(2):222-245 (1974); Chou *et al.*, Biochemistry, 113(2):211-222 (1974); Chou *et al.*, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148 (1978); Chou *et al.*, Ann. Rev. Biochem., 47:251-276 y Chou *et al.*, Biophys. J., 26:367-384 (1979). Además, actualmente están disponibles programas informáticos para ayudar con la predicción de la estructura secundaria. Un método de predicción de la estructura secundaria se basa en el modelado por homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia mayor del 30%, o similitud mayor del 40% a menudo tienen topologías estructurales similares. El reciente crecimiento de la base de datos estructural de proteínas (PDB) ha proporcionado predictibilidad potenciada de la estructura secundaria, incluyendo el número posible de plegamientos dentro de la estructura de un polipéptido o una proteína. Véase, por ejemplo, Holm *et al.*, Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247 (1999). Se ha sugerido (Brenner *et al.*, Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376 (1997)) que existe un número limitado de plegamientos en una proteína o un polipéptido dado y que una vez se han resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural se volverá drásticamente más precisa.

Los métodos adicionales de predicción de la estructura secundaria incluyen "reconocimiento de plegamiento" (Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87 (1997); Sippl *et al.*, Structure, 4(1):15-19 (1996).), "análisis de perfil" (Bowie *et al.*, Science, 253:164-170 (1991); Gribskov *et al.*, Met. Enzym., 183:146-159 (1990); Gribskov *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13):4355-4358 (1987)), y "unión evolutiva" (véase Holm, citado anteriormente (1999) y Brenner, citado

anteriormente (1997)).

En determinadas realizaciones, las variantes de agente de unión específica incluyen variantes de glicosilación en las que el número y/o tipo de sitios de glicosilación se ha alterado en comparación con las secuencias de aminoácidos de un polipéptido original. En determinadas realizaciones, las variantes de proteína comprenden un número mayor o menor de sitios de glicosilación con unión a N que la proteína nativa. Un sitio de glicosilación con unión a N se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en la que el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto prolina. La sustitución de residuos de aminoácido para crear esta secuencia proporciona un posible nuevo sitio para la adición de una cadena de hidrato de carbono con unión a N. Alternativamente, las sustituciones que eliminan esta secuencia eliminarán una cadena de hidrato de carbono con unión a N existente. También se proporciona una redisposición de cadenas de hidrato de carbono con unión a N en las que se eliminan uno o más sitios de glicosilación con unión a N (normalmente aquellos que se producen de manera natural) y se crean uno o más sitios con unión a N nuevos. Las variantes de anticuerpo preferidas adicionales incluyen variantes de cisteína en las que se delecionan uno o más residuos cisteína o se sustituyen por otro aminoácido (por ejemplo, serina) en comparación con la secuencia de aminoácidos original. Las variantes de cisteína pueden ser útiles cuando deben volver a plegarse los anticuerpos en una conformación biológicamente activa tal como tras el aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. Las variantes de cisteína tienen generalmente menos residuos cisteína que la proteína nativa y normalmente tienen un número par para minimizar interacciones que resultan de cisteínas desapareadas.

Según determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son las que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alteran afinidades de unión, y/o (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales en tales polipéptidos. Según determinadas realizaciones, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (en determinadas realizaciones, sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia que se produce de manera natural (en determinadas realizaciones, en la parte del polipéptido fuera del/de los dominio(s) que forma(n) contactos intermoleculares). En determinadas realizaciones, una sustitución de aminoácido conservativa normalmente no puede cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper una hélice que se produce en la secuencia original, ni alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan a la secuencia original). Ejemplos de estructuras secundaria y terciaria de polipéptido reconocidas en la técnica se describen, por ejemplo, en Proteínas, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thomton *et al.* Nature 354:105 (1991).

El término "derivado" se refiere a una molécula que incluye una modificación química distinta de una inserción, deleción o sustitución de aminoácidos. En determinadas realizaciones, los derivados comprenden modificaciones covalentes, incluyendo, pero sin limitarse a, enlace químico con polímeros, lípidos u otros restos orgánicos o inorgánicos. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica modificado químicamente puede tener mayor semivida en circulación que un agente de unión específica que no está modificado químicamente. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica modificado químicamente puede tener capacidad de direccionamiento mejorada para las células, tejidos y/u órganos deseados. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica derivado se modifica covalentemente para incluir una o más uniones a polímero soluble en agua, incluyendo, pero sin limitarse a, polietilenglicol, polioxietilenglicol o polipropilenglicol. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.^{os}: 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 y 4.179.337. En determinadas realizaciones, un agente de unión específica derivado comprende uno o más polímeros, incluyendo, pero sin limitarse a, monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa u otros polímeros a base de hidratos de carbono, poli-(N-vinilpirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol) y poli(alcohol vinílico), así como mezclas de tales polímeros.

En determinadas realizaciones, un derivado se modifica covalentemente con subunidades de polietilenglicol (PEG). En determinadas realizaciones, uno o más polímeros solubles en agua se unen a una o más posiciones específicas, por ejemplo en el extremo amino-terminal, de un derivado. En determinadas realizaciones, uno o más polímeros solubles en agua se unen al azar a una o más cadenas laterales de un derivado. En determinadas realizaciones, se usa PEG para mejorar la capacidad terapéutica de un agente de unión específica. En determinadas realizaciones, se usa PEG para mejorar la capacidad terapéutica de un anticuerpo humanizado. Se comentan determinados de tales métodos, por ejemplo, en la patente estadounidense n.° 6.133.426.

El término "fragmento de polipéptido" tal como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene una deleción amino-terminal y/o carboxilo-terminal. En determinadas realizaciones, los fragmentos tienen al menos de 5 a 478 aminoácidos de largo. Se apreciará que en determinadas realizaciones, los fragmentos tienen al menos 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ó 450 aminoácidos de largo.

En la industria farmacéutica se usan comúnmente análogos de péptido como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido de molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos de péptido" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber y Freidinger TINS

pág. 392 (1985); y Evans *et al.* J. Med. Chem. 30:1229 (1987). Tales compuestos se desarrollan a menudo con la ayuda de modelado molecular computerizado. Pueden usarse miméticos de péptido que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles para producir un efecto terapéutico o profiláctico similar. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como anticuerpo humano, pero tienen una o más uniones de péptido sustituidas opcionalmente por una unión seleccionada de: --CH_2NH--, --CH_2S--, --CH_2-CH_2--, --CH=CH- (cis y trans), --$COCH_2$--, --$CH(OH)CH_2$-- y --CH_2SO--, mediante métodos bien conocidos en la técnica. Puede usarse la sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) en determinadas realizaciones para generar péptidos más estables. Además, pueden generarse péptidos limitados que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencia consenso sustancialmente idéntica mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992); por ejemplo, añadiendo residuos de cisteína internos que pueden formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

Los términos "anticuerpo" o "péptido(s) de anticuerpo" se refieren a un anticuerpo intacto, o un fragmento de unión del mismo que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica. En determinadas realizaciones, se producen fragmentos de unión mediante técnicas de ADN recombinante. En determinadas realizaciones, se producen fragmentos de unión mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')2, Fv y anticuerpos de cadena sencilla.

El término "cadena pesada" incluye cualquier polipéptido que tiene una secuencia de región variable suficiente para conferir especificidad por una diana. El término "cadena ligera" incluye cualquier polipéptido que tiene una secuencia de región variable suficiente para conferir especificidad por una diana. Una cadena pesada de longitud completa incluye un dominio de región variable, V_H y tres dominios de región constante, C_H1, C_H2 y C_H3. El dominio V_H se encuentra en el extremo amino-terminal del polipéptido y el dominio C_H3 se encuentra en el extremo carboxilo-terminal. El término "cadena pesada", tal como se usa en el presente documento, abarca una cadena pesada de longitud completa y fragmentos de la misma. Una cadena ligera de longitud completa incluye un dominio de región variable, V_L y un dominio de región constante, C_L. Como la cadena pesada, el dominio de región variable de la cadena ligera se encuentra en el extremo amino-terminal del polipéptido. El término "cadena ligera", tal como se usa en el presente documento, abarca una cadena ligera de longitud completa y fragmentos de la misma. Un fragmento Fab está compuesto por una cadena ligera y C_H1 y las regiones variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula de Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un fragmento Fab' contiene una cadena ligera y una cadena pesada que contiene más de la región constante, entre los dominios C_H1 y C_H2, de manera que puede formarse un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas para formar una molécula de F(ab')2. La región Fv comprende las regiones variables de las cadenas tanto pesadas como ligeras, pero carece de las regiones constantes. Anticuerpos de cadena sencilla son moléculas de Fv en las que se han conectado las regiones variables de cadena pesada y ligera mediante un ligador flexible para formar una cadena de polipéptido individual que forma una región de unión a antígeno. Se dan a conocer anticuerpos monocatenarios en detalle en, por ejemplo, el documento WO 88/01649 y las patentes estadounidenses n.ºs 4.946.778 y 5.260.203.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere a una parte de las cadenas ligeras y/o pesadas de un anticuerpo, que normalmente incluye aproximadamente los de 120 a 130 aminoácidos amino-terminales en la cadena pesada y aproximadamente los de 100 a 110 aminoácidos amino-terminales en la cadena ligera. En determinadas realizaciones, las regiones variables de diferentes anticuerpos difieren extensamente en la secuencia de aminoácidos incluso entre anticuerpos de la misma especie. La región variable de un anticuerpo determina normalmente la especificidad de un anticuerpo particular por su diana

El término "fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional" se refiere a un fragmento de polipéptido que comprende al menos los dominios variables de una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina. En determinadas realizaciones, un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional puede unirse a un ligando, impidiendo la unión del ligando a su receptor e interrumpiendo de ese modo una respuesta biológica que resulta de la unión del ligando al receptor. En determinadas realizaciones, un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional puede unirse a un receptor, impidiendo la unión del ligando a su receptor e interrumpiendo de ese modo una respuesta biológica que resulta de la unión del ligando al receptor. En determinadas realizaciones, un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional puede unirse a un receptor y activar o inactivar ese receptor.

Normalmente se entiende que un anticuerpo bivalente distinto de un anticuerpo "multiespecífico" o "multifuncional", en determinadas realizaciones, tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos.

Un agente de unión específica inhibe sustancialmente la adhesión de un ligando a un receptor cuando un exceso de agente de unión específica reduce la cantidad de receptor unido al contrarreceptor en al menos aproximadamente el 20%, el 40%, el 60%, el 80%, el 85% o más (tal como se midió un ensayo de unión competitiva *in vitro*).

El término "diana" se refiere a una molécula o una parte de una molécula que puede unirse a un agente de unión específica. En determinadas realizaciones, una diana puede tener uno o más epítopos. En determinadas realizaciones, una diana es un antígeno.

El término "epítopo" incluye cualquier determinante de polipéptido que puede unirse específicamente a un receptor de células T o inmunoglobulina. En determinadas realizaciones, los determinantes de epítopo incluyen agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo, y, en determinadas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítopo es una región de un antígeno a la que se une un anticuerpo. En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es ≤ 1 µM, en determinadas realizaciones, cuando la constante de disociación es ≤ 100 nM y en determinadas realizaciones, cuando la constante de disociación es ≤ 10 nM.

El término "agente" se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "marca" o "marcado" se refieren a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de restos de biotina que pueden detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o colorimétricos). En determinadas realizaciones, la marca o el marcador también pueden ser terapéuticos. En la técnica se conocen y pueden usarse diversos métodos de marcaje de polipéptidos y glicoproteínas. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, 3 H, 14 C, 15 N, 35 S, 90 Y, 99 Tc, 111 In, 125 I, 131 I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), quimioluminiscencia, grupos biotinilo, epítopos de polipéptido predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de par de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, etiquetas de epítopo). En determinadas realizaciones, los marcadores se unen mediante brazos espaciadores de diversas longitudes parar reducir el posible impedimento estérico.

El término "muestra biológica", tal como se usa en el presente documento, incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o ser anteriormente vivo. Tales seres vivos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, ratones, monos, ratas, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, orina, células, órganos, tejidos, hueso, médula ósea, ganglios linfáticos y piel.

El término "cáncer" incluye, pero no se limita a tumores sólidos y tumores malignos hematológicos. Los cánceres a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer colorrectal, carcinoma gástrico, glioma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma renal papilar esporádico y hereditario, leucemia, linfoma, síndrome de Li-Fraumeni, mesotelioma pleural maligno, melanoma, mieloma múltiple, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, osteosarcoma, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas, sarcoma sinovial, carcinoma de tiroides y carcinoma de células de transición de la vejiga urinaria.

El término "actividad de HGF" incluye cualquier efecto biológico de HGF. En determinadas realizaciones, la actividad de HGF es actividad de Met-HGF. En determinadas realizaciones, actividad de HGF es actividad de HGF independiente de Met.

El término "señalización de Met-HGF" incluye la interacción de HGF con un receptor de Met.

El término "actividad de Met-HGF" incluye cualquier actividad biológica que resulta de la señalización de Met-HGF. Las actividades a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, inducción neural, regeneración del hígado, cicatrización de heridas, crecimiento, invasión, diferenciación morfológica, desarrollo embrionario, dispersión, proliferación, apoptosis, motilidad celular, metástasis, migración, adhesión celular, agrupación de integrina, fosforilación de paxilina, formación de adhesiones focales y cáncer que resulta de señalización aberrante de Met-HGF.

El término "señalización de Met-HGF aberrante" incluye cualquier circunstancia en la que la señalización de Met-HGF no puede estimular ninguna actividad de Met-HGF cuando normalmente la señalización daría como resultado tal actividad. La señalización de Met-HGF aberrante también incluye cualquier circunstancia en la que la señalización de Met-HGF da como resultado menos actividad de Met-HGF de la que se produciría con señalización normal. La actividad aberrante también incluye cualquier circunstancia en la que la señalización de Met-HGF da como resultado mayor actividad de Met-HGF de la que se produciría con señalización normal. La señalización aberrante de Met-HGF puede dar como resultado, por ejemplo, determinados cánceres.

El término "actividad de HGF independiente de Met" se refiere a cualquier actividad biológica efectuada por HGF que no depende de la unión de HGF a un receptor de Met. Tal actividad incluye, pero no se limita a, actividad biológica efectuada por la interacción de HGF con otros receptores y actividad biológica efectuada por HGF a través de otras rutas, por ejemplo, heterodímeros met/ron o Ron.

El término "actividad de HGF aberrante" se refiere a cualquier circunstancia en la que la actividad de HGF es o bien mayor o bien menor de la que debería. En determinadas circunstancias, la actividad de HGF aberrante da como resultado la señalización de HGF aberrante. En determinadas circunstancias, la actividad de HGF aberrante resulta de una concentración de HGF que es superior a lo que debería. En determinadas realizaciones, la actividad de HGF aberrante resulta de una concentración de HGF que es inferior a lo que debería.

El término "fármaco o agente farmacéutico" tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto químico o composición que puede inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra de manera apropiada a un paciente.

El término "modulador", tal como se usa en el presente documento, es un compuesto que cambia o altera la actividad o función de una molécula. Por ejemplo, un modulador puede aumentar un aumento o una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de una molécula en comparación de la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del modulador. En determinadas realizaciones, un modulador es un inhibidor, que disminuye la magnitud de al menos una actividad o función de una molécula. Determinadas actividades y funciones a modo de ejemplo de una molécula incluyen, pero no se limitan a, afinidad de unión, actividad enzimática y transducción de señales. Determinados inhibidores a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, anticuerpos, pepticuerpos, hidratos de carbono o moléculas orgánicas pequeñas. Se describen pepticuerpos, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6.660.843 (que corresponde a la solicitud PCT n.º WO 01/83525).

Tal como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). En determinadas realizaciones, una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En determinadas realizaciones, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 99% de todas las especies macromolares presentes en la composición. En determinadas realizaciones, la especie objetivo se purifica hasta homogeneidad esencial (no pueden detectarse especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencionales) en la que la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

El término paciente incluye sujetos humanos y animales.

Determinados agentes de unión específica a modo de ejemplo

En determinados casos, HGF se une a un receptor de Met para inducir la fosforilación de Met. En determinados casos, la fosforilación de Met inducida por HGF normal regula una variedad de procesos celulares. En determinados casos, la actividad de Met-HGF aberrante se correlaciona con varios estados patológicos humanos. Por ejemplo, en determinados casos, demasiada actividad de HGF se correlaciona con determinados cánceres. Por tanto, en determinados casos, la modulación de la actividad de HGF puede ser terapéuticamente útil. En determinadas realizaciones, se usan agentes de unión específica a HGF para disminuir la cantidad de actividad de HGF desde un nivel anormalmente alto. En determinadas realizaciones, la disminución de la actividad de HGF desde un nivel anormalmente alto disminuye la actividad tumorigénica y reduce la gravedad del cáncer. Según determinadas realizaciones, se usan agentes de unión específica a HGF para tratar cáncer. En determinadas realizaciones, se usan agentes de unión específica a HGF para prevenir cáncer.

En determinadas realizaciones, se usa un agente de unión específica a HGF para tratar cánceres en los que la actividad de HGF es normal. En tales cánceres, por ejemplo, la reducción de la actividad de HGF hasta por debajo de la normal puede proporcionar un efecto terapéutico.

En determinadas realizaciones, se usa un agente de unión específica a HGF para modular al menos una actividad de Met-HGF. En determinadas realizaciones, se usa un agente de unión específica a HGF para modular al menos una actividad de HGF independiente de Met. En determinadas realizaciones, se usa más de un agente de unión específica a HGF para modular la actividad de HGF.

En determinadas realizaciones, agentes de unión específica a HGF son anticuerpos monoclonales completamente humanos. En determinadas realizaciones, se proporcionan secuencias de nucleótidos que codifican para y secuencias de aminoácidos que comprenden, moléculas de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina, particularmente secuencias que corresponden a las regiones variables. En determinadas realizaciones, se proporcionan secuencias que corresponden a regiones determinantes de complementariedad (CDR), específicamente de CDR1 a CDR3. Según determinadas realizaciones, se proporciona una línea celular de hibridoma que expresa una molécula de inmunoglobulina de este tipo. Según determinadas realizaciones, se proporciona una línea celular de hibridoma que expresa un anticuerpo monoclonal de este tipo. En determinadas realizaciones se selecciona una línea celular de hibridoma de al menos una de 1.24.1, 1.29.1, 1.60.1, 1.61.3, 1.74.3. 1.75.1, 2.4.4, 2.12.1, 2.40.1 y 3.10.1. En determinadas realizaciones, se proporciona un anticuerpo monoclonal humano purificado frente a HGF humano.

La capacidad para clonar y reconstruir loci humanos del tamaño de megabases en cromosomas artificiales de

levadura (YAC) e introducirlos en la línea germinal de ratón proporciona un enfoque para dilucidar los componentes funcionales de loci muy grandes o mapeados de manera aproximada así como generar modelos útiles de enfermedad humana. Además, la utilización de tal tecnología para la sustitución de loci de ratón con sus equivalentes humanos podría proporcionar revelaciones en la expresión y regulación de productos génicos humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas y su implicación en la inducción y progresión de enfermedades.

Una aplicación práctica importante de una estrategia de este tipo es la "humanización" del sistema inmunitario humoral del ratón. La introducción de loci de inmunoglobulina (Ig) humana en ratones en los que se han inactivado los genes de Ig endógenos ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos que subyacen a la expresión programada y el ensamblaje de anticuerpos así como su papel en el desarrollo de células B. Además, una estrategia de este tipo puede proporcionar una fuente para la producción de anticuerpos monoclonales completamente humanos (AcM). En determinadas realizaciones, se espera que los anticuerpos completamente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a AcM de ratón o derivatizados de ratón y por tanto, en determinadas realizaciones, aumenten la eficacia y la seguridad de los anticuerpos administrados. En determinadas realizaciones, pueden usarse anticuerpos completamente humanos en el tratamiento de enfermedades humanas crónicas o recurrentes, tales como cáncer, malaria o retinopatía diabética proliferativa, que puede implicar administraciones repetidas de los anticuerpos.

Pueden modificarse por ingeniería genética variedades de ratón deficientes en la producción de anticuerpo de ratón con fragmentos grandes de los loci de Ig humana previendo que tales ratones producirán anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Los fragmentos de Ig humana grandes pueden conservar la gran diversidad de genes variables así como la regulación apropiada de la producción y expresión de anticuerpos. Aprovechando la maquinaria del ratón para la diversificación y selección de anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica a proteínas humanas, el repertorio de anticuerpo humanos reproducido en estas cepas de ratón puede proporcionar anticuerpos completamente humanos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluyendo antígenos humanos. Usando la tecnología de hibridoma, pueden producirse y seleccionarse AcM humanos específicos de antígeno con la especificidad deseada. Se describen determinados métodos a modo de ejemplo en el documento WO 98/24893, la patente estadounidense n.° 5.545.807, el documento EP 546073B1 y el documento EP 546073A1.

En determinadas realizaciones, pueden usarse regiones constantes de especies distintas de la humana junto con la(s) región/regiones variable(s) humana(s).

Estructura de anticuerpos que se producen de manera natural

Las unidades estructurales de anticuerpos que se producen de manera natural comprenden normalmente un tetrámero. Cada uno de tales tetrámeros está compuesto normalmente por dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena "ligera" de longitud completa (en determinadas realizaciones, de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" de longitud completa (en determinadas realizaciones, de aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena incluye normalmente una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que normalmente es responsable del reconocimiento de antígeno. La parte carboxilo-terminal de cada cadena define normalmente una región constante que puede ser responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican normalmente como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican normalmente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases, incluyendo, pero sin limitarse a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tiene subclases incluyendo, pero sin limitarse a, IgM1 e IgM2. IgA está subdividida de manera similar en subclases incluyendo, pero sin limitarse a, IgA1 e IgA2. Dentro de cadenas ligeras y pesadas de longitud completa, normalmente, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, por ejemplo, Fundamental Immunology cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman normalmente el sitio de unión a antígeno.

Las regiones variables presentan normalmente la misma estructura general de regiones de entramado (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas normalmente por las regiones de entramado, que pueden permitir la unión a un epítopo específico. Desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, las regiones variables de cadena tanto ligera como pesada comprenden normalmente los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es normalmente según las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia *et al.* Nature 342:878-883 (1989).

En determinadas realizaciones, una cadena pesada de anticuerpo se une a un antígeno en ausencia de una cadena ligera de anticuerpo. En determinadas realizaciones, una cadena ligera de anticuerpo se une a un antígeno en ausencia de una cadena pesada de anticuerpo. En determinadas realizaciones, una región de unión de anticuerpo se une a un antígeno en ausencia de una cadena ligera de anticuerpo. En determinadas realizaciones, una región de

unión de anticuerpo se une a un antígeno en ausencia de una cadena pesada de anticuerpo. En determinadas realizaciones, una región variable individual se une específicamente a un antígeno en ausencia de otras regiones variables.

En determinadas realizaciones, la delineación definitiva de una CDR y la identificación de residuos que comprenden el sitio de unión de un anticuerpo se logra resolviendo la estructura del anticuerpo y/o resolviendo la estructura del complejo anticuerpo-ligando. En determinadas realizaciones, eso puede lograrse mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como cristalografía de rayos X. En determinadas realizaciones, pueden emplearse diversos métodos de análisis para identificar o aproximar las regiones CDR. Ejemplos de tales métodos incluyen, pero no se limitan a, la definición de Kabat, la definición de Chothia, la definición de AbM y la definición de contacto.

La definición de Kabat es un patrón para enumerar los residuos en un anticuerpo y se usa normalmente para identificar regiones CDR. Véase, por ejemplo, Johnson y Wu, Nucleic Acids Res, 28: 214-8 (2000). La definición de Chothia es similar a la definición de Kabat, pero la definición de Chothia tiene en cuenta las posiciones de determinadas regiones de bucle estructurales. Véase, por ejemplo, Chothia *et al.*, J Mol Biol, 196: 901-17 (1986); Chothia *et al.*, Nature, 342: 877-83 (1989). La definición de AbM usa un conjunto integrado de programas informáticos producidos por Oxford Molecular Group que modelan la estructura del anticuerpo. Véase, por ejemplo, Martin *et al.*, Proc NatlAcad Sci (USA) 86:9268-9272 (1989); AbM™, a computer program for modeling variable regions of antibodies, Oxford, RU; Oxford Molecular, Ltd. La definición de AbM modela la estructura terciaria de un anticuerpo a partir de la secuencia primaria usando una combinación de bases de datos de conocimiento y métodos *ab initio*, tales como los descritos en Samudrala *et al.*, *Ab Initio* Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach, PROTEINS, Structure, Functions and Genetics Supl. 3:194-198 (1999). La definición de contacto se basa en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Véase, por ejemplo, MacCallum *et al.*, J Mol Biol, 5:732-45 (1996).

Por convención, las regiones CDR en la cadena pesada se denominan normalmente H1, H2 y H3 y se enumeran secuencialmente en la dirección desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxilo-terminal. Las regiones CDR en la cadena ligera se denominan normalmente L1, L2 y L3 y se enumeran secuencialmente en la dirección desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxilo-terminal.

Anticuerpos biespecíficos o bifuncionales

Normalmente, un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Pueden producirse anticuerpos biespecíficos mediante una variedad de métodos incluyendo, pero sin limitarse a, fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai *et al.*, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990); Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148:1547-1553 (1992).

Preparación de anticuerpos

Según determinadas realizaciones, determinados anticuerpos que se unen específicamente a HGF se abarcan por la invención. En determinadas realizaciones, se producen anticuerpos mediante inmunización con un antígeno. El término "antígeno" se refiere a una molécula usada en un animal para producir anticuerpos que pueden unirse a ese antígeno y/u otra diana. En determinadas realizaciones, pueden producirse anticuerpos mediante inmunización con HGF de longitud completa, una forma soluble de HGF, una forma variante de corte y empalme de HGF o un fragmento de los mismos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden ser policlonales o monoclonales, y/o pueden ser anticuerpos recombinantes. En determinadas realizaciones, anticuerpos de la invención son anticuerpos humanos preparados, por ejemplo, mediante inmunización de animales transgénicos que pueden producir anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, la solicitud publicada PCT n.° WO 93/12227).

En determinadas realizaciones, pueden emplearse determinadas estrategias para manipular propiedades inherentes de un anticuerpo, tales como la afinidad de un anticuerpo por su diana. Tales estrategias incluyen, pero no se limitan a, el uso de mutagénesis específica de sitio o al azar de la molécula de polinucleótido que codifica para un anticuerpo para generar una variante de anticuerpo. En determinadas realizaciones, tal generación va seguida por la selección de variantes de anticuerpo que presentan el cambio deseado, por ejemplo aumento o disminución de la afinidad.

En determinadas realizaciones, los residuos de aminoácido seleccionados como diana en estrategias mutagénicas son aquellos en las CDR. En determinadas realizaciones, se seleccionan como diana aminoácidos en las regiones de entramado de los dominios variables. En determinadas realizaciones, se ha mostrado que tales regiones de entramado contribuyen a las propiedades de unión a la diana de determinados anticuerpos. Véase, por ejemplo, Hudson, Curr Opin Biotech, 9:395-402 (1999) y referencias en el mismo.

En determinadas realizaciones, se producen bibliotecas más pequeñas y que se examinan más eficazmente de variantes de anticuerpo restringiendo la mutagénesis al azar o dirigida al sitio a sitios de hipermutación en las CDR, que son sitios que corresponden a áreas propensas a mutación durante el proceso de maduración por afinidad somática. Véase, por ejemplo, Chowdhury y Pastan, Nature Biotech, 17: 568-572 (1999) y referencias en el mismo.

En determinadas realizaciones, pueden usarse determinados tipos de elementos de ADN para identificar sitios de hipermutación incluyendo, pero sin limitarse a, determinadas repeticiones directas e inversas, determinadas secuencias consenso, determinadas estructuras secundarias y determinados palíndromos. Por ejemplo, tales elementos de ADN que pueden usarse para identificar sitios de hipermutación incluyen, pero no se limitan a, una secuencia de tetrabase que comprende una purina (A o G), seguido por (G), seguido por una pirimidina (C o T), seguid por o bien adenosina o bien tirosina (A o T) (es decir, A/G - G - C/T - AT). Otro ejemplo de un elemento de ADN que puede usarse para identificar sitios de hipermutación es el codón de serina; A-G-C/T.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos están humanizados. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado es sustancialmente no inmunogénico en seres humanos. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado tiene sustancialmente la misma afinidad por una diana que un anticuerpo de otra especie de la que se deriva el anticuerpo humanizado. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense 5.530.101, la patente estadounidense 5.693.761; la patente estadounidense 5.693.762; la patente estadounidense 5.585.089.

En determinadas realizaciones, se identifican aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo que pueden modificarse sin disminuir la afinidad nativa del dominio de unión a antígeno mientras se reduce su inmunogenicidad. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.766.886 y 5.869.619.

En determinadas realizaciones, la modificación de un anticuerpo mediante métodos conocidos en la técnica está diseñada normalmente para lograr un aumento de la afinidad de unión por una diana y/o para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo en el receptor. En determinadas realizaciones, los anticuerpos humanizados se modifican para eliminar sitios de glicosilación con el fin de aumentar la afinidad del anticuerpo por su antígeno relacionado. Véase, por ejemplo, Co *et al.*, Mol Immunol 30: 1361 -1367 (1993). En determinadas realizaciones, se usan técnicas tales como "reformado", "hiperquimerización" o "remodelación de superficie/modificación de superficie" para producir anticuerpos humanizados. Véase, por ejemplo, Vaswami *et al.*, Annals of Allergy, Asthma, & Immunol 81:105 (1998); Roguska *et al.*, Prot Engineer 9:895-904 (1996); y la patente estadounidense n.° 6.072.035. En determinadas de tales realizaciones, tales técnicas reducen normalmente la inmunogenicidad del anticuerpo reduciendo el número de residuos foráneos, pero no impidan las respuestas anti-idiotípicas y anti-alotípicas tras la administración repetida de los anticuerpos. Se describen determinados otros métodos para reducir la inmunogenicidad, por ejemplo, en Gilliland *et al.*, J Immunol 62(6): 3663-71 (1999).

En determinados casos, la humanización de anticuerpos da como resultado una pérdida de la capacidad de unión a antígeno. En determinadas realizaciones, anticuerpos humanizados están "retro-mutados". En determinadas de tales realizaciones, se muta el anticuerpo humanizado para incluir uno o más de los residuos de aminoácido encontrados en el anticuerpo donador. Véase, por ejemplo, Saldanha *et al.*, Mol Immunol 36:709-19 (1999).

En determinadas realizaciones las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo frente a HGF pueden injertarse en regiones de entramado (FR) de la misma o de otra especie. En determinadas realizaciones, las CDR de las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo frente a HGF pueden injertarse en FR humanas consenso. Para crear FR humanas consenso, en determinadas realizaciones, se alinean FR de varias secuencias de aminoácidos de cadena pesada o de cadena ligera humanas para identificar una secuencia de aminoácidos consenso. En determinadas realizaciones, las FR de una cadena pesada o cadena ligera de anticuerpo frente a HGF se reemplazan con las FR de una cadena pesada o cadena ligera diferente. En determinadas realizaciones, aminoácidos poco comunes en las FR de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo frente a HGF no se reemplazan, mientras que el resto de los aminoácidos de FR se reemplazan. Aminoácidos poco comunes son aminoácidos específicos que están en posiciones en las que no se encuentran habitualmente en las FR. En determinadas realizaciones, las regiones variables injertadas de un anticuerpo frente a HGF pueden usarse con una región constante que es diferente de la región constante de un anticuerpo frente a HGF. En determinadas realizaciones, las regiones variables injertadas son parte de un anticuerpo Fv de cadena sencilla. Se describe el injerto de CDR, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 6.180.370, 6.054.297, 5.693.762, 5.859.205, 5.693.761, 5.565.332, 5.585.089 y 5.530.101 y en Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536 (1988), Winter, FEBS Letts 430:92-94 (1998).

En determinadas realizaciones, se usa una técnica de presentación en fago para generar anticuerpos monoclonales. En determinadas realizaciones, tales técnicas producen anticuerpos monoclonales completamente humanos. En determinadas realizaciones, se expresa un polinucleótido que codifica para un fragmento de anticuerpo Fab o Fv individual en la superficie de una partícula de fago. Véase, por ejemplo, Hoogenboom *et al.*, J Mol Biol 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J Mol Biol 222: 581 (1991); la patente estadounidense n.° 5.885.793. En determinadas realizaciones, se "examinan" los fagos para identificar aquellos fragmentos de anticuerpo que tienen afinidad por la diana. Por tanto, determinados de tales procesos imitan la selección inmunitaria a través de la presentación de repertorios de fragmentos de anticuerpo en la superficie de bacteriófagos filamentosos y la posterior selección de fago mediante su unión a la diana. En determinados de tales procedimientos, se aíslan fragmentos de anticuerpos agonistas funcionales de alta afinidad. En determinadas de tales realizaciones, se crea un repertorio completo de genes de anticuerpos humanos clonando genes V humanos redispuestos de manera natural a partir de linfocitos de sangre periférica. Véase, por ejemplo, Mullinax *et al.*, Proc Natl Acad Sci (USA) 87: 8095-8099 (1990).

Según determinadas realizaciones, se preparan anticuerpos de la invención a través de la utilización de un ratón transgénico que tiene una parte sustancial del genoma que produce anticuerpos humanos insertado pero que se ha vuelto deficiente en la producción de anticuerpos murinos, endógenos. Tales ratones, entonces, pueden producir anticuerpos y moléculas de inmunoglobulina humanos y son deficientes en la producción de anticuerpos y moléculas de inmunoglobulina murinos. Las tecnologías utilizadas para lograr este resultado se dan a conocer en las patentes, solicitudes y referencias dadas a conocer en la memoria descriptiva, en el presente documento. En determinadas realizaciones, pueden emplearse métodos tales como los dados a conocer en la solicitud publicada PCT n.º WO 98/24893 o en Mendez *et al*, Nature Genetics 15:146-156 (1997).

Según determinadas realizaciones, se producen anticuerpos monoclonales completamente humanos específicos para HGF tal como sigue. Se inmunizan ratones transgénicos que contienen genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés, por ejemplo HGF, se obtienen células linfáticas (tales como células B) de los ratones que expresan anticuerpos. Tales células recuperadas se fusionan con una línea celular de tipo mieloide para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales y se examinan tales líneas celulares de hibridoma y se seleccionan para identificar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos frente al antígeno de interés. En determinadas realizaciones, se proporciona la producción de una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos específicos frente a HGF.

En determinadas realizaciones, se producen anticuerpos completamente humanos mediante la expresión de ADN recombinante en células huésped o mediante la expresión en células de hibridoma. En determinadas realizaciones, se producen anticuerpos usando la técnica de presentación en fago descrita anteriormente.

En determinadas realizaciones, se producen anticuerpos completamente humanos exponiendo esplenocitos humanos (células B o T) a un antígeno *in vitro* y luego reconstituyendo las células expuestas en un ratón inmunocomprometido, por ejemplo SCID o nod/SCID. Véase, por ejemplo, Brams *et al.*, J Immunol, 160: 2051-2058 (1998); Carballido *et al.*, Nat Med, 6: 103-106 (2000). En determinados de tales enfoques, el injerto de tejido fetal humano en ratones SCID (SCID-hu) da como resultado hematopoyesis a largo plazo y desarrollo de células T humanas. Véase, por ejemplo, McCune *et al.*, Science 241:1532-1639 (1988); Ifversen *et al.*, Sem Immunol 8:243-248 (1996). En determinados casos, la respuesta inmunitaria humoral en tales ratones quiméricos depende del desarrollo conjunto de células T humanas en los animales. Véase, por ejemplo, Martensson *et al.*, Immunol 53:1271-179 (1994). En determinados enfoques, se trasplantan linfocitos de sangre periférica humanos en ratones SCID. Véase, por ejemplo, Mosier *et al.*, Nature 335:256-259 (1988). En determinadas de tales realizaciones, cuando se tratan tales células trasplantadas o bien con un agente de sensibilización, tal como enterotoxina estafilocócica A (SEA), o con anticuerpos monoclonales anti-CD40 humano, se detectan niveles superiores de producción de células B. Véase, por ejemplo, Martensson *et al.*, Immunol 84: 224-230 (1995); Murphy *et al.*, Blood 86: 1946-1953 (1995).

En determinadas realizaciones, se producen anticuerpos de la invención mediante al menos uno de los siguientes hibridomas: 1.24.1, 1.29.1, 1.60.1, 1.61.1, 1.74.1, 1.75.1, 2.4.4, 2.12.1, 2.40.1 y 3.10.1. En determinadas realizaciones, los agentes de unión específica se unen a HGF con una K_D de 10^{-8}, 10^{-9} o 10^{-10} M. En determinadas realizaciones, los agentes de unión específica se unen a HGF con una constante de disociación (K_D) de entre aproximadamente 0,099 y 0,79 nM tal como se mide mediante el método cinético (figura 6A). En determinadas realizaciones, los agentes de unión específica se unen a HGF con una K_D de menos de 10 pM a aproximadamente 54 pM, tal como se mide mediante el método de equilibrio/disolución (figura 6B).

En determinadas realizaciones, los agentes de unión específica comprenden una molécula de inmunoglobulina de al menos una del isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD e IgM. En determinadas realizaciones, los agentes de unión específica comprenden una cadena ligera kappa humana y/o una cadena pesada humana. En determinadas realizaciones, la cadena pesada es del isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD o IgM. En determinadas realizaciones, los agentes de unión específica se han clonado para la expresión en células de mamífero. En determinadas realizaciones, los agentes de unión específica comprenden una región constante distinta de cualquiera de las regiones constantes del isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD e IgM.

En determinadas realizaciones, los agentes de unión específica comprenden una cadena ligera kappa humana y una cadena pesada de IgG1 humana. En determinadas realizaciones, los agentes de unión específica comprenden una cadena ligera kappa humana y una cadena pesada de IgG2 humana. En determinadas realizaciones, los agentes de unión específica comprenden una cadena ligera kappa humana y una cadena pesada de IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD o IgM humana. En determinadas realizaciones, los agentes de unión específica comprenden regiones variables de anticuerpos ligadas a una región constante que ni es la región constante para el isotipo IgG1, ni la región constante para el isotipo IgG2. En determinadas realizaciones, los agentes de unión específica se han clonado para su expresión en células de mamífero.

En determinadas realizaciones, las modificaciones conservativas en las cadenas pesada y ligera de anticuerpos de al menos una de las líneas de hibridoma: 1.24.1, 1.29.1, 1.60.1, 1.61.1, 1.74.1, 1.75.1, 2.4.4, 2.12.1, 2.40.1 y 3.10.1 (y modificaciones correspondientes a los nucleótidos codificantes) producirán anticuerpos frente a HGF que tienen características funcionales y químicas similares a las de los anticuerpos de las líneas de hibridoma: 1.24.1, 1.29.1, 1.60.1, 1.61.1, 1.74.1, 1.75.1, 2.4.4, 2.12.1, 2.40.1 y 3.10.1. Por el contrario, en determinadas realizaciones, pueden lograrse modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o químicas de anticuerpos frente a HGF

seleccionando sustituciones en la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la estructura molecular principal en la zona de la sustitución, por ejemplo, como conformación en lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral.

Por ejemplo, una "sustitución de aminoácido conservativa" puede implicar una sustitución de un residuo de aminoácido nativo con un residuo no nativo de manera que hay poco o ningún efecto sobre la polaridad o la carga del residuo de aminoácido en esa posición. Además, también puede sustituirse cualquier residuo nativo en el polipéptido con alanina, tal como se ha descrito anteriormente para "mutagénesis de exploración de alanina".

Pueden determinarse sustituciones de aminoácido deseadas (o bien conservativas o no conservativas) por los expertos en la técnica en el momento en el que se deseen tales sustituciones. En determinadas realizaciones, pueden usarse sustituciones de aminoácido para identificar residuos importantes de anticuerpos frente a HGF, o para aumentar o disminuir la afinidad de los anticuerpos frente a HGF descritos en el presente documento.

En determinadas realizaciones, pueden expresarse anticuerpos de la presente invención en líneas celulares distintas de las líneas celulares de hibridoma. En determinadas realizaciones, pueden usarse secuencias que codifican para anticuerpos particulares para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuada. Según determinadas realizaciones, la transformación puede ser mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo empaquetar el polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducir una célula huésped con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, tal como se muestra a modo de ejemplo en las patentes estadounidenses n.ºs 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. En determinadas realizaciones, el procedimiento de transformación usado puede depender del huésped que va a transformarse. En la técnica se conocen métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero e incluyen, pero no se limitan a, transfección mediada por dextrano, precipitación mediante fosfato de calcio, transfección mediada por Polybrene, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del/de los polinucleótido(s) en liposomas y microinyección directa del ADN en núcleos.

En la técnica se conocen líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión e incluyen, pero no se limitan a, muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo ("*American Type Culture Collection*") (ATCC), incluyendo pero sin limitarse a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2) y varias líneas celulares distintas. En determinadas realizaciones, pueden seleccionarse líneas celulares determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión y producen anticuerpos con propiedades de unión a HGF constitutivas. Se conocen bien vectores de expresión apropiados para células huésped de mamífero.

En determinadas realizaciones, los agentes de unión específica comprenden uno o más polipéptidos. En determinadas realizaciones, puede utilizarse cualquiera de una variedad de sistemas de vector de expresión/huésped para expresar moléculas de polinucleótido que codifican para polipéptidos. Tales sistemas incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, tales como bacterias transformadas con bacteriófago recombinante, plásmido o vectores de expresión de ADN cósmido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transfectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV, virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmido pBR322 o Ti); o sistemas de células animales.

En determinadas realizaciones, un polipéptido se expresa de manera recombinante en levadura. Determinadas de tales realizaciones usan sistemas de expresión disponibles comercialmente, por ejemplo, el sistema de expresión de *Pichia* (Invitrogen, San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. En determinadas realizaciones, un sistema de este tipo se basa en la secuencia pre-pro-alfa para dirigir la secreción. En determinadas realizaciones, la transcripción del inserto está dirigida por el promotor de alcohol oxidasa (AOX1) tras la inducción mediante metanol.

En determinadas realizaciones, se purifica un polipéptido secretado del medio de crecimiento de levaduras. En determinadas realizaciones, los métodos usados para purificar un polipéptido del medio de crecimiento de levaduras es el mismo que los usados para purificar el polipéptido de sobrenadantes de células bacterianas y de mamífero.

En determinadas realizaciones, se clona un ácido nucleico que codifica para un polipéptido en un vector de expresión de baculovirus, tal como pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA). En determinadas realizaciones, puede usarse un vector de este tipo según las instrucciones del fabricante (PharMingen) para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en medios libres de proteína sF9 y para producir polipéptido recombinante. En determinadas realizaciones, se purifica un polipéptido y se concentra a partir de tales medios usando una columna de heparina-Sepharose (Pharmacia).

En determinadas realizaciones, se expresa un polipéptido en un sistema de insecto. Los expertos en la técnica conocen bien determinados sistemas de insecto para la expresión de polipéptidos. En un sistema de este tipo, se

usa el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes foráneos en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. En determinadas realizaciones, puede insertarse una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido en un gen no esencial del virus, por ejemplo, dentro del gen de polihedrina y colocarse bajo el control del promotor para ese gen. En determinadas realizaciones, la inserción satisfactoria de una molécula de ácido nucleico volverá el gen no esencial inactivo. En determinadas realizaciones, la inactivación da como resultado una característica detectable. Por ejemplo, la inactivación del gen de polihedrina da como resultado la producción de virus que carece de proteína de la cubierta.

En determinadas realizaciones, pueden usarse virus recombinantes para infectar células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia*. Véase, por ejemplo, Smith *et al.*, J Virol 46: 584 (1983); Engelhard *et al.*, Proc Nat Acad Sci (USA) 91:3224-7 (1994).

En determinadas realizaciones, se producen polipéptidos preparados en células bacterianas como cuerpos de inclusión insolubles en las bacterias. En determinadas realizaciones, se recogen células huésped que comprenden tales cuerpos de inclusión por centrifugación; se lavan en NaCl 0,15 M, Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM; y se tratan con lisozima 0,1 mg/ml (Sigma, St. Louis, MO) durante 15 minutos a temperatura ambiente. En determinadas realizaciones, se aclara el lisado mediante sonicación y se sedimentan los residuos celulares mediante centrifugación durante 10 minutos a 12.000 X g. En determinadas realizaciones, se resuspende el sedimento que contiene polipéptido en Tris 50 mM, pH 8 y EDTA 10 mM; se extiende sobre glicerol al 50%; y se centrifuga durante 30 minutos a 6000 X g. En determinadas realizaciones, puede resuspenderse ese sedimento en solución salina tamponada con fosfato (PBS) convencional libre de Mg^{++} y Ca^{++}. En determinadas realizaciones, se purifica adicionalmente el polipéptido fraccionando el sedimento resuspendido en un gel de SDS poliacrilamida desnaturalizante (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente). En determinadas realizaciones, puede empaparse un gel de este tipo en KCl 0,4 M para visualizar la proteína, que puede cortarse y electroeluirse en tampón de ejecución en gel que carece de SDS. Según determinadas realizaciones, se produce una proteína de fusión glutatión-S-transferasa (GST) en bacterias como proteína soluble. En determinadas realizaciones, tal proteína de fusión GST se purifica usando un módulo de purificación de GST (Pharmacia).

En determinadas realizaciones, es deseable "replegar" determinados polipéptidos. En determinadas realizaciones, tales polipéptidos se producen usando determinados sistemas recombinantes comentados en el presente documento. En determinadas realizaciones, se "repliegan" y/o se oxidan polipéptidos para formar la estructura terciaria deseada y/o para generar enlaces disulfuro. En determinadas realizaciones, tal estructura y/o enlaces están relacionados con determinada actividad biológica de un polipéptido. En determinadas realizaciones, se logra el replegamiento usando cualquiera de varios procedimientos conocidos en la técnica. Los métodos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, exponer el agente de polipéptido solubilizado a un pH normalmente por encima de 7 en presencia de un agente caotrópico. Un agente caotrópico a modo de ejemplo es guanidina. En determinadas realizaciones, la disolución de replegamiento/oxidación también contiene un agente reductor y la forma oxidada de ese agente reductor. En determinadas realizaciones, el agente reductor y su forma oxidada están presentes en una razón que generará un potencial redox particular que permite que se produzca transposición de disulfuros. En determinadas realizaciones, tal transposición permite la formación de puentes de cisteína. Los pares redox a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, cisteína/cistamina, glutatión/ditiobisGSH, cloruro cúprico, ditiotreitol DTT/ditiano DTT y 2-mercaptoetanol (bME)/ditio-bME. En determinadas realizaciones, se usa un codisolvente para aumentar la eficacia de replegamiento. Los codisolventes a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares y arginina.

En determinadas realizaciones, se purifica sustancialmente un polipéptido. Los expertos en la técnica conocen determinadas técnicas de purificación de proteínas. En determinadas realizaciones, la purificación de proteínas implica el fraccionamiento en bruto de fracciones polipéptidicas de fracciones no polipeptídicas. En determinadas realizaciones, se purifican polipéptidos usando técnicas cromatográficas y/o electroforéticas. Los métodos de purificación a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, precipitación con sulfato de amonio; precipitación con PEG; inmunoprecipitación; desnaturalización por calor seguido por centrifugación; cromatografía, incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía de afinidad (por ejemplo, proteína-A-Sepharose), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión y cromatografía de fase inversa; filtración en gel; cromatografía de hidroxiapatita; isoelectroenfoque; electroforesis en gel de poliacrilamida; y combinaciones de estas y otras técnicas. En determinadas realizaciones, se purifica un polipéptido mediante cromatografía de líquidos de proteína rápida o mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). En determinadas realizaciones, pueden cambiarse las etapas de purificación o pueden omitirse determinadas etapas y todavía dar como resultado un método adecuado para la preparación de un polipéptido sustancialmente purificado.

En determinadas realizaciones, se cuantifica el grado de purificación de una preparación de polipéptido. Los expertos en la técnica conocen determinados métodos para cuantificar el grado de purificación. Determinados métodos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, determinar la actividad de unión específica de la preparación y evaluar la cantidad de un polipéptido en una preparación mediante análisis de SDS/PAGE. Determinados métodos a modo de ejemplo para evaluar la cantidad de purificación de una preparación de polipéptido comprenden calcular la actividad de unión de una preparación y compararla con la actividad de unión de un extracto inicial. En determinadas realizaciones, los resultados de un cálculo de este tipo se expresan como "purificación en veces". Las unidades usadas para representar la cantidad de actividad de unión dependen del

ensayo particular realizado.

En determinadas realizaciones, un polipéptido está parcialmente purificado. En determinadas realizaciones, la purificación parcial puede lograrse usando menos etapas de purificación o utilizando diferentes formas del mismo esquema de purificación general. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, una cromatografía en columna de intercambio catiónico realizada utilizando un aparato de HPLC dará como resultado generalmente una "purificación en veces" mayor que la misma técnica utilizando un sistema de cromatografía de baja presión. En determinadas realizaciones, los métodos que dan como resultado un grado de purificación más bajo pueden tener ventajas en la recuperación total de polipéptido o en el mantenimiento de la actividad de unión de un polipéptido.

En determinados casos, la migración electroforética de un polipéptido puede variar, en ocasiones significativamente, con diferentes condiciones de SDS/PAGE. Véase, por ejemplo, Capaldi *et al.*, Biochem Biophys\Res Comm, 76: 425 (1977). Se apreciarán que en diferentes condiciones de electroforesis, los pesos moleculares aparentes de polipéptidos purificados o parcialmente purificados pueden ser diferentes.

Determinados epítopos a modo de ejemplo

En determinadas realizaciones, se proporcionan epítopos a los que se unen anticuerpos anti-HGF (véanse, por ejemplo, el ejemplo 8, las figuras 10 y 11 y SEQ ID NO. 164 y 165). En determinadas realizaciones, puede utilizarse un epítopo de HGF para impedir la unión de un anticuerpo anti-HGF o agente de unión específica a HGF. En determinadas realizaciones, puede utilizarse un epítopo de HGF para disminuir la unión de un anticuerpo anti-HGF o agente de unión específica a HGF. En determinadas realizaciones, puede utilizarse un epítopo de HGF para inhibir sustancialmente la unión de un anticuerpo anti-HGF o agente de unión específica a HGF. Un epítopo inhibe sustancialmente la unión de un anticuerpo anti-HGF o agente de unión específica a HGF cuando un exceso de epítopo reduce la cantidad de anticuerpo anti-HGF o agente de unión específica unido a HGF en al menos aproximadamente el 20%, el 40%, el 60%, el 80%, el 85% o más. En determinadas realizaciones, puede utilizarse un epítopo de HGF para unir un anticuerpo anti-HGF o agente de unión específica. En determinadas realizaciones, puede utilizarse un epítopo de HGF para identificar anticuerpos o agentes de unión específica que se unen a HGF. En determinadas realizaciones, puede utilizarse un epítopo de HGF para aislar anticuerpos o agentes de unión específica que se unen a HGF. En determinadas realizaciones, puede utilizarse un epítopo de HGF para generar anticuerpos o agentes de unión específica que se unen a HGF. En determinadas realizaciones, puede utilizarse un epítopo de HGF como inmunógeno para generar anticuerpos o agentes de unión específica que se unen a HGF. En determinadas realizaciones, puede administrarse un epítopo de HGF a un animal y posteriormente pueden obtenerse anticuerpos que se unen a HGF a partir del animal. En determinadas realizaciones, puede utilizarse un epítopo de HGF para interferir con la señalización de HGF-Met normal.

Determinados usos terapéuticos

En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos de tratamiento de un cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes de unión específica a HGF. En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos de tratamiento de cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes de unión específica a HGF y otro agente terapéutico.

En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos de tratamiento o prevención de malaria que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes de unión específica a HGF. En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos de tratamiento o prevención de malaria que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes de unión específica a HGF y otro agente terapéutico.

En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos de tratamiento o prevención de retinopatía diabética proliferativa que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes de unión específica a HGF. En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos de tratamiento o prevención de retinopatía diabética proliferativa que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes de unión específica a HGF y otro agente terapéutico.

En determinadas realizaciones, se administra un agente de unión específica a HGF solo. En determinadas realizaciones, se administra un agente de unión específica a HGF antes de la administración de al menos otro agente terapéutico. En determinadas realizaciones, se administra un agente de unión específica a HGF de manera simultánea a la administración de al menos otro agente terapéutico. En determinadas realizaciones, se administra un agente de unión específica a HGF posteriormente a la administración de al menos otro agente terapéutico. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, al menos otro agente de terapia contra el cáncer. Los agentes de terapia contra el cáncer a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, radioterapia y quimioterapia.

Pueden administrarse composiciones farmacéuticas de la invención en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. En determinadas realizaciones, la terapia de combinación comprende un agente de unión específica que puede unirse a HGF, en combinación con al menos un agente antiangiogénico. Los agentes incluyen, pero no se limitan a, composiciones químicas preparadas de manera sintética *in vitro*, anticuerpos, regiones de unión a antígeno, radionúclidos y combinaciones y conjugados de los mismos. En determinadas

realizaciones, un agente puede actuar como agonista, antagonista, modulador alostérico o toxina. En determinadas realizaciones, un agente puede actuar inhibiendo o estimulando su diana (por ejemplo, activación o inhibición de receptores o enzimas) y promoviendo de ese modo la muerte celular o deteniendo el crecimiento celular.

Los tratamientos de quimioterapia incluyen, pero no se limitan a agentes antineoplásicos incluyendo, pero sin limitarse a, agentes alquilantes incluyendo: mostazas de nitrógeno, tales como mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán y clorambucilo; nitrosoureas, tales como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU) y semustina (metil-CCNU); Temodal™ (temozolamida), etileniminas/metilmelamina tales como trietilenmelamina (TEM), trietileno, tiofosforamida (tiotepa), hexametilmelamina (HMM, altretamina); sulfonatos de alquilo tales como busulfano; triazinas tales como dacarbazina (DTIC); antimetabolitos incluyendo análogos de ácido fólico tales como metotrexato y trimetrexato, análogos de pirimidina tales como 5-fluorouracilo (5FU), fluorodesoxiuridina, gemcitabina, arabinósido de citosina (AraC, citarabina), 5-azacitidina, 2,2'-difluorodesoxicitidina, análogos de purina tales como 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina, 2'-desoxicoformicina (pentostatina), eritrohidroxinoniladenina (EHNA), fosfato de fludarabina y 2-clorodesoxiadenosina (cladribina, 2-CdA); productos naturales incluyendo fármacos antimitóticos tales como paclitaxel, alcaloides de la vinca incluyendo vinblastina (VLB), vincristina y vinorelbina, taxotere, estramustina y fosfato de estramustina; epipodofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido; antibióticos tales como actinomicina D, daunomicina (rubidomicina), doxorubicina, mitoxantrona, idarubicina, bleomicinas, plicamicina (mitramicina), mitomicina C y actinomicina; enzimas tales como L-asparaginasa; modificadores de la respuesta biológica tales como interferón-alfa, IL-2, G-CSF y GM-CSF; agentes misceláneos incluyendo complejos de coordinación de platino tales como cisplatino y carboplatino, antracenodionas tales como mitoxantrona, urea sustituida tal como hidroxiurea, derivados de metilhidrazina incluyendo N-metilhidrazina (MIH) y procarbazina, supresores suprarrenales tales como mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida; hormonas y antagonistas incluyendo antagonistas de adrenocorticosteroides tales como prednisona y equivalentes, dexametasona y aminoglutetimida; Gemzar™ (gemcitabina), progestina tal como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de megestrol; estrógeno tal como equivalentes de y etinilestradiol y dietilestilbestrol; antiestrógeno tal como tamoxifeno; andrógenos incluyendo propionato de testosterona y fluoximesterona/equivalentes; antiandrógenos tales como flutamida, análogos de hormona liberadora de gonadotropina y leuprolida; y antiandrógenos no esteroideos tales como flutamida.

Las terapias contra el cáncer, que pueden administrarse con un agente de unión específica a HGF, también incluyen, pero no se limitan a, terapias dirigidas. Los ejemplos de terapias dirigidas incluyen, pero no se limitan a, el uso de anticuerpos terapéuticos. Los anticuerpos terapéuticos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de ratón, de ratón-ser humano quiméricos, injertados con CDR, humanizados y completamente humanos, y anticuerpos sintéticos, incluyendo, pero sin limitarse a, los seleccionados examinando bibliotecas de anticuerpos. Los anticuerpos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los que se unen a las proteínas de la superficie celular Her2, CDC20, CDC33, glicoproteína similar a mucina y receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) presentes en células tumorales e inducen opcionalmente un efecto citostático y/o citotóxico sobre las células tumorales que presentan estas proteínas. Los anticuerpos a modo de ejemplo también incluyen HERCEPTIN™ (trastuzumab), que puede usarse para tratar cáncer de mama y otras formas de cáncer y RITUXAN™ (rituximab), ZEVALIN™ (ibritumomab tiuxetano), GLEEVEC™ y LYMPHOCIDE™ (epratuzumab), que pueden usarse para tratar linfoma no Hodgkin y otras formas de cáncer. Determinados anticuerpos a modo de ejemplo también incluyen ERBITUX™ (IMC-C225); ertinolib (Iressa); BEXXAR™ (yodo 131 tositumomab); inhibidores de KDR (receptor de dominio cinasa); antagonistas y anticuerpos anti-VEGF (por ejemplo, Avastin™ y VEGAF-TRAP); anticuerpos anti-receptor de VEGF y regiones de unión a antígeno; anticuerpos anti-Ang-1 y Ang-2 y regiones de unión a antígeno; anticuerpos frente a Tie-2 y otros receptores de Ang-1 y Ang-2; ligandos de Tie-2; anticuerpos contra inhibidores de Tie-2 cinasa; y Campath® (Alemtuzumab). En determinadas realizaciones, agentes de terapia contra el cáncer son polipéptidos que inducen selectivamente apoptosis en células tumorales, incluyendo, pero sin limitarse a, el polipéptido relacionado con TNF TRAIL.

En determinadas realizaciones, agentes de terapia contra el cáncer son agentes antiangiogénicos que disminuyen la angiogénesis. Determinados de tales agentes incluyen, pero no se limitan a, IL-8; Campath, B-FGF; antagonistas de FGF; antagonistas de Tek (Cerretti *et al.*, publicación estadounidense n.° 2003/0162712; Cerretti *et al.*, patente estadounidense n.° 6.413.932 y Cerretti *et al.*, patente estadounidense n.° 6.521.424); agentes anti-TWEAK (que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y regiones de unión a antígeno); antagonistas de receptor de TWEAK soluble (Wiley, patente estadounidense n.° 6.727.225); un dominio de distintegrina de ADAM para antagonizar la unión de integrina a sus ligandos (Fanslow *et al.*, publicación estadounidense n.° 2002/0042368); anticuerpos anti-receptor de eph y anti-efrina; regiones de unión a antígeno o antagonistas (patentes estadounidenses n.ºs 5.981.245; 5.728.813; 5.969.110; 6.596.852; 6.232.447; 6.057.124 y miembros de la familia de patentes de las mismas); agentes anti-VEGF (por ejemplo, anticuerpos o regiones de unión a antígeno que se unen específicamente a VEGF, o receptores de VEGF solubles o regiones de unión a ligando de los mismos) tales como Avastin™ o VEGF-TRAP™ y agentes anti-receptor de VEGF (por ejemplo, anticuerpos o regiones de unión a antígeno que se unen específicamente al mismo), agentes inhibidores de EGFR (por ejemplo, anticuerpos o regiones de unión a antígeno que se unen específicamente al mismo) tales como panitumumab, IRESSA™ (gefitinib), TARCEVA™ (erlotinib), agentes anti-Ang-1 y anti-Ang-2 (por ejemplo, anticuerpos o regiones de unión a antígeno que se unen específicamente a los mismos o a sus receptores, por ejemplo, Tie-2/TEK) y agentes inhibidores anti-Tie-2 cinasa (por ejemplo, anticuerpos o regiones de unión a antígeno que se unen específicamente e inhiben la actividad de

factores de crecimiento, tales como antagonistas del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, también conocido como factor de dispersión) y anticuerpos o regiones de unión a antígeno que se unen específicamente a su receptor "c-met"; antagonistas anti-PDGF-BB; anticuerpos y regiones de unión a antígeno frente a ligandos de PDGF-BB; e inhibidores de PDGFR cinasa.

En determinadas realizaciones, agentes de terapia contra el cáncer son inhibidores de la angiogénesis. Tales inhibidores determinados incluyen, pero no se limitan a, SD-7784 (Pfizer, EE.UU.); cilengitida (Merck KGaA, Alemania, documento EPO 770622); pegaptanib octasodio (Gilead Sciences, EE.UU.); alfastatina (BioActa, RU); M-PGA (Celgene, EE.UU., documento US 5712291); ilomastat (Arriva, EE.UU., documento US 5892112); semaxanib (Pfizer, EE.UU., documento US 5792783); vatalanib (Novartis, Suiza); 2-metoxiestradiol (EntreMed, EE.UU.); TLC ELL-12, (Elan, Irlanda); acetato de anecortave (Alcon, EE.UU.); AcM alfa-D148 (Amgen, EE.UU.); CEP-7055 (Cephalon, EE.UU.); AcM anti-Vn (Crucell, Países Bajos) DAC:antiangiogénico (ConjuChem, Canadá); angiocidina (InKine Pharmaceutical, EE.UU.); KM-2550 (Kyowa Hakko, Japón); SU-0879 (Pfizer, EE.UU.); CGP-79787 (Novartis, Suiza, documento EP 970070); tecnología ARGENT (Ariad, EE.UU.); YIGSR-Stealth (Johnson & Johnson, EE.UU.); fragmento de fibrinógeno-E (BioActa, RU); inhibidor de la angiogénesis (Trigen, RU); TBC-1635 (Encysive Pharmaceuticals, EE.UU.); SC-236 (Pfizer, EE.UU.); ABT-567 (Abbott, EE.UU.); metastatina (EntreMed, EE.UU.); inhibidor de la angiogénesis (Tripep, Suecia); maspina (Sosei, Japón); 2-metoxiestradiol (Oncology Sciences Corporation, EE.UU.); ER-68203-00 (IVAX, EE.UU.); benefina (Lane Labs, EE.UU.); Tz-93 (Tsumura, Japón); TAN-1120 (Takeda, Japón); FR-111142 (Fujisawa, Japón, documento JP 02233610); factor 4 de plaquetas (RepliGen, EE.UU., documento EP 407122); antagonista de factor de crecimiento endotelial vascular (Borean, Dinamarca); terapia contra el cáncer (University of South Carolina, EE.UU.); bevacizumab (pINN), (Genentech, EE.UU.); inhibidores de la angiogénesis (SUGEN, EE.UU.); XL 784 (Exelixis, EE.UU.); XL 647 (Exelixis, EE.UU.); AcM, integrina alfa5beta3, segunda generación (Applied Molecular Evolution, EE.UU. y MedImmune, EE.UU.); terapia génica, retinopatía (Oxford BioMedica, RU); clorhidrato de enzastaurina (USAN), (Lilly, EE.UU.); CEP 7055 (Cephalon, EE.UU. y Sanofi-Synthelabo, Francia); BC 1 (Genoa Institute of Cancer Research, Italia); inhibidor de la angiogénesis (Alchemia, Australia); antagonista de VEGF (Regeneron, EE.UU.); agente antiangiogénico derivado de rBPI 21 y BPI (XOMA, EE.UU.); PI 88 (Progen, Australia); cilengitida (pINN), (Merck KGaA, Alemania; Munich Technical University, Alemania, Scripps Clinic and Research Foundation, EE.UU.); cetuximab (INN), (Aventis, Francia); AVE 8062, (Ajinomoto, Japón); AS 1404 (Cancer Research Laboratory, Nueva Zelanda); SG 292 (Telios, EE.UU.); endostatina (Boston Childrens Hospital, EE.UU.); ATN 161 (Attenuon, EE.UU.); ANGIOSTATINA (Boston Childrens Hospital, EE.UU.); 2-metoxiestradiol (Boston Childrens Hospital, EE.UU.); ZD 6474 (AstraZeneca, RU); ZD 6126 (Angiogene Pharmaceuticals, RU); PPI 2458 (Praecis, EE.UU.); AZD 9935 (AstraZeneca, RU); AZD 2171 (AstraZeneca, RU); vatalanib (pINN), (Novartis, Suiza y Schering AG, Alemania); inhibidores de la ruta de factor tisular (EntreMed, EE.UU.); pegaptanib (Pinn) (Gilead Sciences, EE.UU.); xantorrhizol (Yonsei University, Corea del Sur); vacuna, basada en genes, VEGF-2 (Scripps Clinic and Research Foundation, EE.UU.); SPV5.2 (Supratek, Canadá); SDX 103 (University of California en San Diego, EE.UU.); PX 478 (ProlX, EE.UU.); METASTATINA (EntreMed, EE.UU.); troponina I (Harvard University, EE.UU.); SU 6668 (SUGEN, EE.UU.); OXI 4503 (OXiGENE, EE.UU.); o-guanidinas (Dimensional Pharmaceuticals, EE.UU.); motuporamina C (British Columbia University, Canadá); CDP 791 (Celltech Group, RU); atiprimod (pINN), (GlaxoSmithKline, RU); E 7820 (Eisai, Japón); CYC 381 (Harvard University, EE.UU.); AE 941 (Aeterna, Canadá); vacuna, angiogénesis (EntreMed, EE.UU.); inhibidor del activador de plasminógeno de urocinasa (Dendreon, EE.UU.); oglufanida (pINN), (Melmotte, EE.UU.); inhibidores de HIF-1alfa (Xenova, RU); CEP 5214 (Cephalon, EE.UU.); BAY RES 2622 (Bayer, Alemania); angiocidina (InKine, EE.UU.); A6 (Angstrom, EE.UU.); KR 31372 (Korea Research Institute of Chemical Technology, Corea del Sur); GW 2286 (GlaxoSmithKline, RU); EHT 0101 (ExonHit, Francia); CP 868596 (Pfizer, EE.UU.); CP 564959 (OSI, EE.UU.); CP 547632 (Pfizer, EE.UU.); 786034 (GlaxoSmithKline, RU); KRN 633 (Kirin Brewery, Japón); sistema de suministro de fármacos, intraocular, 2-metoxiestradiol (EntreMed, EE.UU.); anginex (Maastricht University, Países Bajos y Minnesota University, EE.UU.); ABT 510 (Abbott, EE.UU.); AAL 993 (Novartis, Suiza); VEGI (ProteomTech, EE.UU.); inhibidores de factor de necrosis tumoral-alfa (National Institute on Aging, EE.UU.); SU 11248 (Pfizer, EE.UU. y SUGEN EE.UU.); ABT 518 (Abbott, EE.UU.); YH16 (Yantai Rongchang, China); S-3APG (Boston Childrens Hospital, EE.UU. y EntreMed, EE.UU.); AcM, KDR (ImClone Systems, EE.UU.); AcM, alfa5 beta1 (Protein Design, EE.UU.); inhibidor de KDR cinasa (Celltech Group, RU y Johnson & Johnson, EE.UU.); GFB 116 (South Florida University, EE.UU. y Yale University, EE.UU.); CS 706 (Sankyo, Japón); profármaco de combretastatina A4 (Arizona State University, EE.UU.); condroitinasa AC (IBEX, Canadá); BAY RES 2690 (Bayer, Alemania); AGM 1470 (Harvard University, EE.UU., Takeda, Japón y TAP, EE.UU.); AG 13925 (Agouron, EE.UU.); tetratiomolibdato (University of Michigan, EE.UU.); GCS 100 (Wayne State University, EE.UU.) CV 247 (Ivy Medical, RU); CKD 732 (Chong Kun Dang, Corea del Sur); AcM, factor de crecimiento endotelial vascular (Xenova, RU); irsogladina (INN), (Nippon Shinyaku, Japón); RG 13577 (Aventis, Francia); WX 360 (Wilex, Alemania); escualamina (pINN) (Genaera, EE.UU.); RPI 4610 (Sirna, EE.UU.); terapia contra el cáncer (Marinova, Australia); inhibidores de heparanasa (InSight, Israel); KL 3106 (Kolon, Corea del Sur); Honokiol (Emory University, EE.UU.); ZK CDK (Schering AG, Alemania); ZK Angio (Schering AG, Alemania); ZK 229561 (Novartis, Suiza y Schering AG, Alemania); XMP 300 (XOMA, EE.UU.); VGA 1102 (Taisho, Japón); moduladores de receptor de VEGF (Pharmacopeia, EE.UU.); antagonistas de VE-cadherina-2 (ImClone Systems, EE.UU.); vasostatina (National Institutes of Health, EE.UU.); vacuna, Flk-1 (ImClone Systems, EE.UU.); TZ 93 (Tsumura, Japón); tumstatina (Beth Israel Hospital, EE.UU.); FLT 1 soluble truncado (receptor 1 de factor de crecimiento endotelial vascular), (Merck & Co, EE.UU.); ligandos de Tie-2 (Regeneron, EE.UU.); inhibidor de trombospondina 1 (Allegheny Health, Education and Research Foundation, EE.UU.); 2-bencenosulfonamida, 4-(5-(4-clorofenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il)-; Arriva; y C-Met. AVE 8062 (monoclorhidrato de (2S)-2-amino-3-

hidroxi-N-[2-metoxi-5-[(1Z)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil]fenil]propanamida); metelimumab (plNN) (inmunoglobulina G4, anti-(factor de crecimiento transformante humano.beta.1 (cadena gamma-4 de CAT 192 monoclonal humano)), disulfuro con dímero de cadena kappa de CAT 192 monoclonal humano); ligando de Flt3; ligando de CD40; interleucina-2; interleucina-12; ligando de 4-1BB; anticuerpos anti-4-1BB; antagonistas de TNF y antagonistas de receptor de TNF incluyendo TNFR/Fc, antagonistas de TWEAK y antagonistas de TWEAK-R incluyendo TWEAK-R/Fc; TRAIL; antagonistas de VEGF incluyendo anticuerpos anti-VEGF; antagonistas de receptor de VEGF (incluyendo VEGF-R1 y VEGF-R2, también conocido como Flt1 y Flk1 o KDR); agonistas de CD148 (también denominado DEP-1, ECRTP y PTPRJ, véase Takahashi *et al.*, J. Am. Soc. Nephrol. 10: 2135-45 (1999)); inhibidor de trombospondina 1 e inhibidores de uno o ambos de Tie-2 o ligandos de Tie-2 (tal como Ang-2). Se conocen en la técnica varios inhibidores de Ang-2, incluyendo anticuerpos anti-Ang-2 descritos en la solicitud de patente estadounidense publicada n.º 20030124129 (correspondiente a la solicitud PCT n.º WO03/030833) y la patente estadounidense n.º 6.166.185. Adicionalmente, también se conocen en la técnica pepticuerpos frente a Ang-2 y pueden encontrarse en, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense publicada n.º 20030229023 (correspondiente a la solicitud PCT n.º WO03/057134) y la solicitud de patente estadounidense publicada n.º 20030236193.

Determinados agentes de terapia contra el cáncer incluyen, pero no se limitan a: talidomida y análogos de talidomida (N-(2,6-dioxo-3-piperidil)ftalimida); tecogalán sódico (polisacárido peptidoglicano sulfatado); TAN 1120 (8-acetil-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-1-metoxi-10-[[octahidro-5-hidroxi-2-(2-hidroxipropil)-4,10-dimetilpirano[3,4-d]-1,3,6-dioxazocin-8-il]oxi]-5,12-naftacenodiona); suradista (sal de tetrasodio del ácido 7,7'-[carbonilbis[imino(1-metil-1H-pirrol-4,2-diil)carbonilimino(1-metil-1H-pirrol-4,2-diil)carbonilimino]]bis-1,3-naftalenodisulfónico); SU 302; SU 301; SU 1498 ((E)-2-ciano-3-[4-hidroxi-3,5-bis(1-metiletil)fenil]-N-(3-fenilpropil)-2-propenamida); SU 1433 (4-(6,7-dimetil-2-quinoxalinil)-1,2-bencenodiol); ST 1514; SR 25989; Tie-2 soluble; derivados de SERM, Pharmos; semaxanib (plNN)(3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)metilen]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona); S 836; RG 8803; RESTIN; R 440 (3-(1-metil-1H-indol-3-il)-4-(1-metil-6-nitro-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona); R 123942 (1-[6-(1,2,4-tiadiazol-5-il)-3-piridazinil]-N-[3-(trifluorometil)fenil]-4-piperidinamina); inhibidor de prolil hidroxilasa; genes de progresión elevada; prinomastat (INN) (ácido (S)-2,2-dimetil-4-[[p-(4-piridiloxi)fenil]sulfonil]-3-tiomorfolincarbohidroxámico); NV 1030; NM 3 (ácido 8-hidroxi-6-metoxi-alfa-metil-1-oxo-1H-2-benzopiran-3-acético); NF 681; NF 050; MIG; MET 2; MET 1; manassantina B (alfa-[1-[4-[5-[4-[2-(3,4-dimetoxifenil)-2-hidroxi-1-metiletoxi]-3-metoxifenil]tetrahidro-3,4-dimetil-2-furanil]-2-metoxifenoxi]etil]-1,3-benzodioxol-5-metanol); anticuerpo monoclonal frente a KDR; anticuerpo monoclonal frente a alfa5beta3 integrina; LY 290293 (2-amino-4-(3-piridinil)-4H-nafto[1,2-b]piran-3-carbonitrilo); KP 0201448; KM 2550; péptidos específicos de integrina; INGN 401; GYKI 66475; GYKI 66462; greenstatina (101-354-plasminógeno (humano)); terapia génica para artritis reumatoide, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, glioma, endostatina, cáncer colorrectal, ATF BTPI, genes antiangiogénesis, inhibidor de la angiogénesis o angiogénesis; inhibidor de gelatinasa, FR 111142 (éster 5-metoxi-4-[2-metil-3-(3-metil-2-butenil)oxiranil]-1-oxaspiro[2.5]oct-6-ílico del ácido 4,5-dihidroxi-2-hexenoico); forfenimex (plNN) ácido (S)-alfa-amino-3-hidroxi-4-(hidroximetil)bencenoacético); antagonista de fibronectina (1-acetil-L-prolil-L-histidil-L-seril-L-cisteinil-L-aspartamida); inhibidor de receptor de factor de crecimiento de fibroblastos; antagonista de factor de crecimiento de fibroblastos; FCE 27164 (sal de hexasodio de ácido 7,7'-[carbonilbis[imino(1-metil-1H-pirrol-4,2-diil)carbonilimino(1-metil-1H-pirrol-4,2-diil)carbonilimino]]bis-1,3,5-naftalenotrisulfónico); FCE 26752 (ácido 8,8'-[carbonilbis[imino(1-metil-1H-pirrol-4,2-diil)carbonilimino(1-metil-1H-pirrol-4,2-diil)carbonilimino]]bis-1,3,6-naftalenotrisulfónico); polipéptido II de activación de monocitos endotelial; oligonucleótido antisentido de VEGFR; factores tróficos y antiangiogénicos; agente angiostático ANCHOR; endostatina; proteína angiogénica Del-1; CT 3577; contortrostatina; CM 101; condroitinasa AC; CDP 845; canstatina; BST 2002; BST 2001; BLS 0597; BIBF 1000; ARRESTIN; apomigren (1304-1388-colágeno tipo XV (precursor de cadena alfa I del gen humano COL15A1)); angioinhibina; aaATIII; A 36; acetato de 9alfa-fluoromedroxiprogesterona ((6-alfa)-17-(acetiloxi)-9-fluoro-6-metil-pregn-4-eno-3,20-diona); ácido 2-metil-2-ftalimidino-glutárico (ácido 2-(1,3-dihidro-1-oxo-2H-isoindol-2-il)-2-metilpentanodioico); anticuerpo monoclonal BC-1 marcado con itrio 90; semaxanib (3-(4,5-dimetilpirrol-2-ilmetilen)indolin-2-ona) (C15 H14 N2 O); PI 88 (sulfato de fosfomanopentaosa); alvocidib (4H-1-benzopiran-4-ona, 2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-(3-hidroxi-1-metil-4-piperidinil)-cis-(-)-) (C21 H20 Cl N O5); E 7820; SU 11248 ((2-dietilaminoetil)amida) del ácido 5-[3-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (C22 H27 F N4 O2); escualamina (colestano-7,24-diol, 3-[[3-[(4-aminobutil)aminopropil]amino]-,24-(hidrogenosulfato), (3.beta.,5.alfa.,7.alfa.)-) (C34 H65 N3 O5 S); negro de eriocromo T; AGM 1470 (éster cloroacetílico y 5-metoxi-4-[2-metil-3-(3-metil-2-butenil)oxiranil]-1-oxaspiro[2,5]oct-6-ílico del ácido carbámico, [3R-[3alfa, 4alfa(2R,3R), 5beta, 6beta]]) (C19 H28 Cl N O6); AZD 9935; BIBF 1000; AZD 2171; ABT 828; KS-interleucina-2; uteroglobina; A 6; NSC 639366 (fumarato de 1-[3-(dietilamino)-2-hidroxipropilamino]-4-(oxiran-2-ilmetilamino)antraquinona) (C24 H29 N3 O4 . C4 H4 O4); ISV 616; proteínas de fusión anti-ED-B; HUI 77; troponina I; anticuerpo monoclonal frente a BC-1; SPV 5.2; ER 68203; CKD 731 (éster (3R,4S,5S,6R)-4-[2(R)-metil-3(R)-3(R)-(3-metil-2-butenil)oxiran-2-il]-5-metoxi-1-oxaspiro[2.5]oct-6-ílico del ácido 3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2(E)-propenoico) (C28 H38 O8); IMC-1C11; aaATIII; SC 7; CM 101; Angiocol; Kringle 5; CKD 732 (ácido 3-[4-[2-(dimetilamino)etoxi]fenil]-2(E)-propenoico) (C29 H41 N O6); U 995; canstatina; SQ 885; CT 2584 (1-[11-(dodecilamino)-10-hidroxiundecil]-3,7-dimetilxantina) (C30 H55 N5 O3); salmosina; EMAP II; TX 1920 (1-(4-metilpiperazino)-2-(2-nitro-1H-1-imidazoil)-1-etanona) (C10 H15 N5 O3); inhibidor de Alfa-v Beta-x; CHIR 11509 (N-(1-propinil)glicil-[N-(2-naftil)]glicil-[N-(carbamoilmetil)]glicina bis(4-metoxifenil)metilamida) (C36 H37 N5 O6); BST 2002; BST 2001; B 0829; FR 111142; éster (3R,4S,5S,6R)-4-[1(R),2(R)-epoxi-1,5-dimetil-4-hexenil]-5-metoxi-1-oxaspiro[2.5]octan-6-ílico del ácido 4,5-dihidroxi-2(E)-hexenoico (C22 H34 O7); e inhibidores de cinasas incluyendo, pero sin limitarse a, N-(4-clorofenil)-4-(4-piridinilmetil)-1-ftalazinamina; 4-[4-[[[[4-cloro-3-

(trifluorometil)fenil]amino]carbonil]amino]fenoxi]-N-metil-2-piridincarboxamida; N-[2-(dietilamino)etil]-5-[(5-fluoro-1,2-dihidro-2-oxo-3H-indol-3-iliden)metil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxamida; 3-[(4-bromo-2,6-difluorofenil)metoxi]-5-[[[[4-(1-pirrolidinil)butil]amino]carbonil]amino]-4-isotiazolcarboxamida; N-(4-bromo-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[(1-metil-4-piperidinil)metoxi]-4-quinazolinamina; éster 3-[5,6,7,13-tetrahidro-9-[(1-metiletoxi)metil]-5-oxo-12H-indeno[2,1-a]pirrolo[3,4-c]carbazol-12-il]propílico N,N-dimetil-glicina; N-[5-[[[5-(1,1-dimetiletil)-2-oxazolil]metil]tio]-2-tiazolil]-4-piperidincarboxamida; N-[3-cloro-4-[(3-fluorofenil)metoxi]fenil]-6-[5-[[[2-(metilsulfonil)etil]amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina; 4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenil]benzamida; N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxi]-4-quinazolinamina; N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina; N-(3-((((2R)-1-metil-2-pirrolidinil)metil)oxi)-5-(trifluorometil)fenil)-2-((3-(1,3-oxazol-5-il)fenil)amino)-3-piridincarboxamida; 2-(((4-fluorofenil)metil)amino)-N-(3-((((2R)-1-metil-2-pirrolidinil)metil)oxi)-5-(trifluorometil)fenil)-3-piridincarboxamida; N-[3-(azetidin-3-ilmetoxi)-5-trifluorometil-fenil]-2-(4-fluoro-bencilamino)-nicotinamida; 6-fluoro-N-(4-(1-metiletil)fenil)-2-((4-piridinilmetil)amino)-3-piridincarboxamida; 2-((4-piridinilmetil)amino)-N-(3-(((2S)-2-pirrolidinilmetil)oxi)-5-(trifluorometil)fenil)-3-piridincarboxamida; N-(3-(1,1-dimetiletil)-1H-pirazol-5-il)-2-((4-piridinilmetil)amino)-3-piridincarboxamida; N-(3,3-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofuran-6-il)-2-((4-piridinilmetil)amino)-3-piridincarboxamida; N-(3-((((2S)-1-metil-2-pirrolidinil)metil)oxi)-5-(trifluorometil)fenil)-2-((4-piridinilmetil)amino)-3-piridincarboxamida; 2-((4-piridinilmetil)amino)-N-(3-((2-(1-pirrolidinil)etil)oxi)-4-(trifluorometil)fenil)-3-piridincarboxamida; N-(3,3-dimetil-2,3-dihidro-1H-indol-6-il)-2-((4-piridinilmetil)amino)-3-piridincarboxamida; N-(4-(pentafluoroetil)-3-(((2S)-2-pirrolidinilmetil)oxi)fenil)-2-((4-piridinilmetil)amino)-3-piridincarboxamida; N-(3-((3-azetidinilmetil)oxi)-5-(trifluorometil)fenil)-2-((4-piridinilmetil)amino)-3-piridincarboxamida; N-(3-(4-piperidiniloxi)-5-(trifluorometil)fenil)-2-((2-(3-piridinil)etil)amino)-3-piridincarboxamida; N-(4,4-dimetil-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolin-7-il)-2-(1H-indazol-6-ilamino)-nicotinamida; 2-(1H-indazol-6-ilamino)-N-[3-(1-metilpirrolidin-2-ilmetoxi)-5-trifluorometil-fenil]-nicotinamida; N-[1-(2-dimetilamino-acetil)-3,3-dimetil-2,3-dihidro-1H-indol-6-il]-2-(1H-indazol-6-ilamino)-nicotinamida; 2-(1H-indazol-6-ilamino)-N-[3-(pirrolidin-2-ilmetoxi)-5-trifluorometil-fenil]-nicotinamida; N-(1-acetil-3,3-dimetil-2,3-dihidro-1H-indol-6-il)-2-(1H-indazol-6-ilamino)-nicotinamida; N-(4,4-dimetil-1-oxo-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolin-7-il)-2-(1H-indazol-6-ilamino)-nicotinamida; N-[4-(terc-butil)-3-(3-piperidilpropil)fenil][2-(1H-indazol-6-ilamino)(3-piridil)]carboxamida; N-[5-(terc-butil)isoxazol-3-il][2-(1H-indazol-6-ilamino)(3-piridil)]carboxamida; y N-[4-(terc-butil)fenil][2-(1H-indazol-6-ilamino)(3-piridil)]carboxamida e inhibidores de cinasas dados a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 6.258.812; 6.235.764; 6.630.500; 6.515.004; 6.713.485; 5.521.184; 5.770.599; 5.747.498; 5.990.141; la publicación estadounidense n.° US20030105091; y las publicaciones del Tratado de cooperación en materia de patentes n.^{os} WO01/37820; WO01/32651; WO02/68406; WO02/66470; WO02/55501; WO04/05279; WO04/07481; WO04/07458; WO04/09784; WO02/59110; WO99/45009; WO98/35958; WO00/59509; WO99/61422; WO00/12089; y WO00/02871.

En determinadas realizaciones, puede administrarse un agente de unión específica a HGF antes de, simultáneamente a y posteriormente al tratamiento con un agente de terapia contra el cáncer. En determinadas realizaciones, puede administrarse un agente de unión específica a HGF de manera profiláctica para prevenir o mitigar la aparición de pérdida ósea por cáncer metastásico. En determinadas realizaciones, puede administrarse un agente de unión específica a HGF para el tratamiento de un estado existente de pérdida ósea debida a metástasis.

Los cánceres a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer colorrectal, carcinoma gástrico, glioma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma renal papilar esporádico y hereditario, leucemia, linfoma, síndrome de Li-Fraumeni, mesotelioma pleural maligno, melanoma, mieloma múltiple, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, osteosarcoma, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas, sarcoma sinovial, carcinoma de tiroides y carcinoma de células de transición de la vejiga urinaria.

En determinadas realizaciones, puede usarse un agente de unión específica a HGF solo o con al menos un agente terapéutico adicional para el tratamiento de cáncer. En determinadas realizaciones, se usa un agente de unión específica a HGF conjuntamente con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico adicional. Los agentes terapéuticos a modo de ejemplo que pueden administrarse con un agente de unión específica a HGF incluyen, pero no se limitan a, un miembro de la familia de geldanamicina de antibióticos de anisamicina; un Pro-HGF; NK2; un inhibidor de péptido de c-Met; un antagonista de Src de homología 2 de Grb2; un modulador de Gab1; Src dominante negativo; un inhibidor de von-Hippel-Landau, incluyendo, pero sin limitarse a, wortmanina; inhibidores de P13 cinasa, otras terapias anti-receptor, anti EGFR, un inhibidor de COX-2, Celebrex™, Vioxx™; un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un modulador de VEGF, un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), un modulador de FGF, un factor de crecimiento epidérmico (EGF); un modulador de EGF; un factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), una molécula relacionada con KGF, un modulador de KGF; un modulador de metaloproteinasas de la matriz (MMP).

En determinadas realizaciones, se usa un agente de unión específica a HGF con agentes terapéuticos particulares para tratar diversos cánceres. En determinadas realizaciones, se usa un agente de unión específica a HGF con agentes terapéuticos particulares para tratar o prevenir la malaria. En determinadas realizaciones, se usa un agente de unión específica a HGF con agentes terapéuticos particulares para tratar o prevenir la retinopatía diabética proliferativa. En determinadas realizaciones, en vista del estado y el nivel deseado de tratamiento, pueden administrarse dos, tres o más agentes. En determinadas realizaciones, tales agentes pueden proporcionarse juntos mediante inclusión en la misma formulación. En determinadas realizaciones, tales agentes y un agente de unión específica a HGF pueden proporcionarse juntos mediante inclusión en la misma formulación. En determinadas

realizaciones, tales agentes pueden formularse por separado y proporcionarse juntos mediante inclusión en un kit de tratamiento. En determinadas realizaciones, tales agentes y un agente de unión específica a HGF pueden formularse por separado y proporcionarse juntos mediante inclusión en un kit de tratamiento. En determinadas realizaciones, tales agentes pueden proporcionarse por separado. En determinadas realizaciones, cuando se administran mediante terapia génica, los genes que codifican para agentes de proteína y/o un agente de unión específica a HGF pueden incluirse en el mismo vector. En determinadas realizaciones, los genes que codifican para agentes de proteína y/o un agente de unión específica a HGF pueden estar bajo el control de la misma región promotora. En determinadas realizaciones, los genes que codifican para agentes de proteína y/o un agente de unión específica a HGF pueden estar en vectores separados.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un agente de unión específica a HGF junto con un diluyente, portador, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un agente de unión específica a HGF y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, junto con un diluyente, portador, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a terapias que comprenden un agente de unión específica a HGF y al menos un inhibidor de serina proteasa y a métodos de tratamiento usando tales terapias. En determinadas realizaciones, una terapia comprende un agente de unión específica a HGF y un inhibidor de serina proteasa y al menos una molécula adicional descrita en el presente documento.

En determinados casos, una alteración del equilibrio proteasa/inhibidor de proteasa puede conducir a destrucción tisular mediada por proteasa, incluyendo, pero sin limitarse a, invasión tumoral de tejido normal que conduce a metástasis.

En determinadas realizaciones, puede usarse un agente de unión específica a HGF con al menos un agente terapéutico para la inflamación. En determinadas realizaciones, puede usarse un agente de unión específica a HGF con al menos un agente terapéutico para un trastorno inmunitario. Los agentes terapéuticos a modo de ejemplo para la inflamación y los trastornos inmunitarios incluyen, pero no se limitan a inhibidores de ciclooxigenasa tipo 1 (COX-1) y ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2), moduladores de molécula pequeña de proteína cinasa activada por mitógeno de 38 kDa (p38-MAPK); moduladores de molécula pequeña de moléculas intracelulares implicadas en rutas de inflamación, en las que tales moléculas intracelulares incluyen, pero no se limitan a, jnk, IKK, NF-κB, ZAP70 y lck. Se describen determinados agentes terapéuticos a modo de ejemplo para la inflamación, por ejemplo, en CA. Dinarello y L.L. Moldawer Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis: A Primer for Clinicians tercera edición (2001) Amgen Inc. Thousand Oaks, CA.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas incluirán más de un agente de unión específica a HGF diferente. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas incluirán más de un agente de unión específica a HGF en las que los agentes de unión específica a HGF se unen a más de un epítopo.

En determinadas realizaciones, materiales de formulación aceptables son preferiblemente no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o penetración de la composición. En determinadas realizaciones, los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes de volumen (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminatetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, saborizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como plurónicos, PEG, ésteres de sorbitano, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 80, triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1990).

En determinadas realizaciones, un agente de unión específica a HGF y/o una molécula terapéutica se unen a un vehículo que prolonga la semivida conocido en la técnica. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol y dextrano. Tales vehículos se describen, por ejemplo, en la solicitud estadounidense con número de serie 09/428.082 y la solicitud PCT publicada n.º WO 99/25044.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica óptima la determinará un experto en la técnica dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración prevista, el formato de administración y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, citado anteriormente. En determinadas realizaciones, tales composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de aclaramiento *in vivo* de los anticuerpos de la invención.

En determinadas realizaciones, el vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza o bien acuosa o bien no acuosa.

Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección, disolución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. En determinadas realizaciones, solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica son vehículos a modo de ejemplo adicionales. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado para el mismo. En determinadas realizaciones, puede prepararse una composición que comprende un agente de unión específica a HGF, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, para su almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado deseado de pureza con agentes de formulación opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, citado anteriormente) en forma de una torta liofilizada o una disolución acuosa. Además, en determinadas realizaciones, puede formularse una composición que comprende un agente de unión específica a HGF, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden seleccionarse para administración parenteral. En determinadas realizaciones, las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o para administración a través del tracto digestivo, tal como por vía oral. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de la experiencia de la técnica.

En determinadas realizaciones, los componentes de formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. En determinadas realizaciones, se usan tampones para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, normalmente dentro de un intervalo de pH de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8.

En determinadas realizaciones, cuando se contempla la administración parenteral, una composición terapéutica puede estar en forma de una disolución acuosa aceptable por vía parenteral, libre de pirógenos que comprende un agente de unión específica a HGF deseado, con o sin agentes terapéuticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, un vehículo para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que se formula un agente de unión específica a HGF, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, como una disolución estéril, isotónica, conservada apropiadamente. En determinadas realizaciones, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectablees, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico)), perlas o liposomas, que pueden proporcionar la liberación controlada o sostenida del producto que entonces puede administrarse por medio de una inyección de depósito. En determinadas realizaciones, puede usarse también ácido hialurónico y puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. En determinadas realizaciones, pueden usarse dispositivos de administración de fármacos implantables para introducir la molécula deseada.

En determinadas realizaciones, puede formularse una composición farmacéutica para inhalación. En determinadas realizaciones, puede formularse un agente de unión específica a HGF, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, como un polvo seco para inhalación. En determinadas realizaciones, puede formularse una disolución de inhalación que comprende un agente de unión específica a HGF, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, con un propelente para administración mediante aerosol. En determinadas realizaciones, las disoluciones pueden nebulizarse. Se describe adicionalmente la administración pulmonar en la solicitud PCT n.º PCT/US94/001875, que describe la administración pulmonar de proteínas modificadas químicamente.

En determinadas realizaciones, se contempla que las formulaciones puedan administrarse por vía oral. En determinadas realizaciones, puede formularse un agente de unión específica a HGF, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, que se administra de este modo, con o sin los portadores usados habitualmente en la composición de formas farmacéuticas sólidas tales como comprimidos y cápsulas. En determinadas realizaciones, puede diseñarse una cápsula para liberar la parte activa de la formulación en el punto en el tracto gastrointestinal en el que se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. En determinadas realizaciones, puede incluirse al menos un agente adicional para facilitar la absorción de un agente de unión específica a HGF y/o

cualquier agente terapéutico adicional. En determinadas realizaciones, también pueden emplearse diluyentes, saborizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de disgregación de comprimidos y aglutinantes.

En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de un agente de unión específica a HGF, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. En determinadas realizaciones, disolviendo los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, pueden preparase disoluciones en forma de dosis unitaria. En determinadas realizaciones, los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio o bicarbonato, lactosa o fosfato de calcio; o agentes de unión, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Resultarán evidentes composiciones farmacéuticas adicionales para los expertos en la técnica, incluyendo formulaciones que implican agentes de unión específica a HGF, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, en formulaciones de administración sostenida o controlada. En determinadas realizaciones, los expertos en la técnica también conocen técnicas para formular una variedad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como portadores de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito. Véase por ejemplo la solicitud PCT n.° PCT/US93/00829 que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. En determinadas realizaciones, las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir materiales de polímero semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (documentos U.S. 3.773.919 y EP 058.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, Biopolymers, 22:547-556 (1983)), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277 (1981) y Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982)), acetato de etilenvinilo (Langer *et al.*, citado anteriormente) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988). En determinadas realizaciones, las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que pueden prepararse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Eppstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985); documentos EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

La composición farmacéutica que va a usare para administración *in vivo* normalmente es estéril. En determinadas realizaciones, esto puede lograrse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. En determinadas realizaciones, cuando la composición se liofiliza, la esterilización usando este método puede realizarse o bien antes de o bien tras la liofilización y reconstitución. En determinadas realizaciones, la composición para administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en una disolución. En determinadas realizaciones, se colocan composiciones parenterales generalmente en un recipiente que tiene un punto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o un vial de disolución intravenosa que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

En determinadas realizaciones, una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles como una disolución, una suspensión, un gel, una emulsión, un sólido o como un polvo deshidratado o liofilizado. En determinadas realizaciones, tales formulaciones pueden almacenarse o bien en una forma lista para usar o bien en una forma (por ejemplo, liofilizada) que se reconstituye antes de su administración.

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a kits para producir una unidad de administración de dosis única. En determinadas realizaciones, los kits pueden contener cada uno tanto un primer recipiente que tiene una proteína secada como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. En determinadas realizaciones de esta invención, se incluyen kits que contienen jeringas precargadas de cámara única y de múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas de líquidos y liojeringas).

En determinadas realizaciones, la cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un agente de unión específica a HGF, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, que va a emplearse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y de los objetivos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación para el tratamiento, según determinadas realizaciones, variarán por tanto dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la que está usándose un agente de unión específica a HGF, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño de órgano) y/o el estado (la edad y la salud general) del paciente. En determinadas realizaciones, el médico puede valorar la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. En determinadas realizaciones, una dosificación típica puede oscilar entre aproximadamente 0,1 µg/kg y aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En determinadas realizaciones, la dosificación puede oscilar entre 0,1 µg/kg y aproximadamente 100 mg/kg; o entre 1 µg/kg y aproximadamente 100 mg/kg; o entre 5 µg/kg y aproximadamente 100 mg/kg.

En determinadas realizaciones, la frecuencia de dosificación tendrá en cuenta los parámetros de farmacocinética de un agente de unión específica a HGF y/o cualquier agente terapéutico adicional en la formulación usada. En determinadas realizaciones, un médico administrará la composición hasta que se alcanza una dosificación que logra

el efecto deseado. En determinadas realizaciones, la composición puede administrarse por tanto como una única dosis, o como dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de la molécula deseada) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua por medio de un catéter o dispositivo de implantación. Se realiza de manera rutinaria el refinamiento adicional de la dosificación apropiada por los expertos habituales en la técnica y está dentro del ámbito de tareas realizadas de manera rutinaria por los mismos. En determinadas realizaciones, pueden determinarse dosificaciones apropiadas a través del uso de datos de respuesta a la dosis apropiados.

En determinadas realizaciones, la vía de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo por vía oral, a través de inyección por las vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal o intralesional; mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implantación. En determinadas realizaciones, las composiciones pueden administrarse mediante inyección en bolo o de manera continua mediante infusión, o mediante dispositivo de implantación.

En determinadas realizaciones, la composición puede administrarse por vía local por medio de la implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. En determinadas realizaciones, cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado y la administración de la molécula deseada puede ser por medio de difusión, bolo de liberación temporal o administración continua.

En determinadas realizaciones, puede ser deseable usar una composición farmacéutica que comprende un agente de unión específica a HGF, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, de una manera *ex vivo*. En tales caos, se exponen células, tejidos y/u órganos que se han extraído del paciente a una composición farmacéutica que comprende un agente de unión específica a HGF, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, tras lo cual las células, los tejidos y/o los órganos se implantan posteriormente de nuevo en el paciente.

En determinadas realizaciones, puede administrarse un agente de unión específica a HGF y/o cualquier agente terapéutico adicional implantando determinadas células que se han modificado por ingeniería genética, usando métodos tales como los descritos en el presente documento, para expresar y secretar los polipéptidos. En determinadas realizaciones, tales células pueden ser células animales o humanas y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. En determinadas realizaciones, las células pueden inmortalizarse. En determinadas realizaciones, con el fin de disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de tejidos circundantes. En determinadas realizaciones, los materiales de encapsulación son normalmente membranas o recintos poliméricos semipermeables, biocompatibles que permiten la liberación del/de los producto(s) de proteína pero impiden la destrucción de la células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados logrados, se proporcionan para fines ilustrativos únicamente y no han de interpretarse como limitativos de la presente invención.

Ejemplo 1

Generación de hibridomas anti-HGF

Se generaron anticuerpos frente a HGF en ratones XenoMouse® (Abgenix, Fremont, CA), que son ratones que contienen genes de inmunoglobulina humana. Se usaron tres grupos de ratones XenoMouse®, los grupos 1a, 1b y 2, para producir anticuerpos frente a HGF y se resumen en la tabla 1. El grupo 1a consistió en ratones de la variedad XMG2 de XenoMouse®, que produce anticuerpos $IgG2_{\kappa}$ completamente humanos. Se inmunizaron ratones del grupo 1a con HGF. Se preparó HGF usando técnicas recombinantes convencionales usando la secuencia en Nakamura *et al.*, Nature 342: 440-443 (1989).

El grupo 1b también consistió en ratones de la variedad XMG2 de XenoMouse®, pero los ratones del grupo 1b se inmunizaron con HGF que se había conjugado químicamente con un epítopo de célula T (TCE) que tenía la secuencia: Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Cys (SEQ ID NO. 47). Se conjugó el TCE con HGF mediante reticulación a través de la cisteína C-terminal de TCE con el extremo N-terminal de HGF usando Sulfo-SMCC (Pierce, n.° de catálogo 22322) y ditiotreitol (Fisher Scientific). Se separó el TCE-HGF conjugado resultante del péptido no conjugado usando una columna Centricon® (Amicon).

El grupo 2 consistió en ratones de la variedad XMG1 de XenoMouse®, que producen anticuerpos $IgG1_{\kappa}$ completamente humanos. Se inmunizaron ratones del grupo 2 con TCE-HGF conjugado descrito anteriormente.

Se inyectó antígeno (o bien HGF o bien TCE-HGF) en los ratones de los tres grupos ocho veces, según el esquema en la tabla 1. En las inmunizaciones iniciales, se le inyectó a cada ratón un total de 10 µg de antígeno en las almohadillas plantares traseras (5 µg por almohadilla plantar). Esas inyecciones contenían el adyuvante TiterMax® Gold (Sigma, n.° de catálogo T2684). En las inyecciones 2 a 7, se le inyectó a cada ratón un total de 5 µg de antígeno en el adyuvante gel de alumbre (adyuvante de gel de fosfato de aluminio; Superfos Biosector a/s,

distribuido por E.M. Sargent Pulp and Chemical Co., Clifton NJ, n.° de catálogo 1452-250). La inyección final contenía un total de 10 µg de antígeno por ratón y no contenía adyuvante.

Tabla 1. Inmunización de ratones

	Grupo 1a	Grupo 1b	Grupo 2
Variedad	XMG2	XMG2	XMG1
n.° de ratones	8	8	10
Antígeno	HGF	HGF-TCE	HGF-TCE
1ª inyección (día 1)	10 µg/ratón en TiterMax Gold	10 µg/ratón en TiterMax Gold	10 µg/ratón en TiterMax Gold
2° refuerzo (día 7)	5 µg/ratón en gel de alumbre	5 µg/ratón en gel de alumbre	5 µg/ratón en gel de alumbre
3er refuerzo (día 9)	5 µg/ratón en gel de alumbre	5 µg/ratón en gel de alumbre	5 µg/ratón en gel de alumbre
4° refuerzo (día 13)	5 µg/ratón en gel de alumbre	5 µg/ratón en gel de alumbre	5 µg/ratón en gel de alumbre
5° refuerzo (día 16)	5 µg/ratón en gel de alumbre	5 µg/ratón en gel de alumbre	5 µg/ratón en gel de alumbre
6° refuerzo (día 20)	5 µg/ratón en gel de alumbre	5 µg/ratón en gel de alumbre	5 µg/ratón en gel de alumbre
Extracción de sangre (día 22)			
7° refuerzo (día 24)	5 µg/ratón en gel de alumbre	5 µg/ratón en gel de alumbre	5 µg/ratón en gel de alumbre
8° refuerzo (día 27)	5 µg/ratón en D-PBS	5 µg/ratón en D-PBS	5 µg/ratón en D-PBS

Se extrajo sangre de cada ratón dos días tras la sexta inyección. Se sometieron a ensayo las muestras de sangre de esas extracciones mediante ELISA para determinar el título de anticuerpos frente a HGF. En esos ensayos ELISA, se recubrieron placas de 96 pocillos (Fisher Scientific n.° de catálogo 12-565-136) con HGF en tampón carbonato 0,1 M (pH 9,6). Se añadieron las muestras de sangre y se incubaron las placas durante dos horas a temperatura ambiente. Tras la incubación, se lavaron las placas tres veces con disolución de lavado (Tween 20 al 0,05% en PBS) y se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario era anticuerpo de cabra anti-IgGFc humana conjugado con peroxidasa del rábano (Southern Biotech n.° de catálogo 9060-05). Tras la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron las placas y se añadieron 100 µl/pocillo de disolución de revelado de TMB (BioFX Lab n.° de catálogo TMSK-0100-01). Tras 10 minutos, se añadieron 50 µl/pocillo de disolución de parada de TMB (BioFX Lab n.° de catálogo STPR-0100-01). Se leyeron las placas en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

Cuatro días después de la inyección final, se sacrificaron los ratones y se recogieron sus ganglios linfáticos de drenaje y se recuperaron los linfocitos. Se agruparon por separado los linfocitos de los ratones de cada uno de los tres grupos. Para enriquecer las muestras de linfocitos en células B, se agotaron las células T añadiendo perlas magnéticas anti-CD90 (Miltenyi Biotech n.° de catálogo 491-01) y luego haciendo pasar los linfocitos a través de una columna LS^+ (Miltenyi Biotech n.° de catálogo 424-01).

Se fusionó entonces cada una de las tres muestras de linfocitos enriquecidos en células B con células de mieloma P3 usando un dispositivo de fusión Electrocell (Genetronic, Inc., Modelo ECM 2001) para crear hibridomas. Entonces se sembraron en placa los tres grupos de líneas de hibridoma fusionadas en placas de 96 pocillos a una densidad de 1 x 10^6 linfocitos enriquecidos en células B de entrada por pocillo en medios de hibridoma (para los componentes, véase la tabla 2) que contenían hipoxantinina-azaserina (Sigma). Se cultivaron las líneas de hibridoma durante 14 días a 37°C, en el 15% de CO_2.

Tras 14 días, se sometieron a ensayo los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA para detectar la presencia de anticuerpos IgG humanos frente a HGF usando el mismo protocolo que se usó para someter a ensayo las muestras de sangre, descrito anteriormente. Se sometieron a prueba los sobrenadantes de cultivo que dieron positivo en ese ELISA para determinar la presencia de cadena kappa humana en un segundo ELISA. En ese segundo ELISA, las condiciones fueron idénticas a las del primer ELISA, excepto porque el anticuerpo secundario fue un anticuerpo de cabra anti-cadena kappa humana conjugado con peroxidasa del rábano. Se expandieron adicionalmente los hibridomas que dieron positivo en ambos ensayos ELISA para producir 5 ml de sobrenadante para pruebas funcionales *in vitro*, que se comentan en los ejemplos 8 y 9. Se sometieron a prueba los sobrenadantes de 82 clones que correspondían a ratones del grupo 1a, 42 clones que correspondían a ratones del grupo 1b y 176 clones que correspondían a ratones del grupo 2.

Basándose en los resultados de esos ensayos funcionales, se identificaron varias líneas de hibridoma que producían anticuerpos frente a HGF. Se usó dilución limitante para aislar de tres a seis clones de cada línea. Se designaron los

clones mediante el número de línea de hibridoma (por ejemplo 1.24) y el número de clon (por ejemplo 1.24.1). No se ha detectado ninguna diferencia entre los diferentes clones de una línea particular mediante los ensayos funcionales comentados en los ejemplos 8 y 9. Esos clones aislados se expandieron cada uno en 50-100 ml de medios de hibridoma y se permitió que crecieran hasta el agotamiento, (es decir, menos de una viabilidad celular de aproximadamente el 10%). Se determinó la concentración y la potencia de los anticuerpos frente a HGF en los sobrenadantes de esos cultivos mediante ELISA y mediante pruebas funcionales *in vitro*, tal como se comentó en los ejemplos 8 y 9. Se identificaron los diez hibridomas con el título de anticuerpos frente a HGF más alto. Esos hibridomas se designaron 1.24.1, 1.29.1, 1.60.1, 1.61.3, 1.74.3, 1.75.1, 2.4.4, 2.12.1, 2.40.1 y 3.10.1.

Tabla 2. Composición de medios

Medios de hibridoma	
Componente	Fuente
DMEM	Gibco
Suero bovino fetal al 15%	Hyclone, n°. de catálogo SH 30070.03
L-glutamina 200 mM al 1%	Sigma, n.° de catálogo G2150
100X aminoácidos no esenciales al 1%	Sigma, n.° de catálogo M 7145
100X pen/estrep al 1%	Sigma n.° de catálogo P 7539 (penicilina 10.000 U/ml / estreptomicina 10 mg/ml)
IL-6 10 U/ml	Boehringer Mannheim, n.° de catálogo1299972
1 vial/l de complemento de medio OPIT (oxaloacetato, piruvato, insulina bovina)	Sigma, n.° de catálogo O 5003
MEDIO HSFM	
HSFM	Gibco, n.° de catálogo 12045-076
Suero de IgG ultrabajo al 1%	Gibco n.° de catálogo 16250-078
L-glutamina 2 mmol/l	JRH 200 mM n.° de catálogo 59202
100X aminoácidos no esenciales al 1%	JRH 100X n.° de catálogo 58572
100X pen/estrep al 1%	Gemini n.° de catálogo 400-109
MEDIO INTEGRA	
HSFM	Gibco, n.° de catálogo 12045-076
Suero de IgG ultrabajo al 10%	Gibco n.° de catálogo 16250-078
L-glutamina 2 mmol/l	JRH 200 mM n.° de catálogo 59202
NEAA al 1%	JRH 100X n.° de catálogo 58572
Glucosa 4 g/l	JT Baker n.° de catálogo 1920-07

Ejemplo 2

Producción de anticuerpos a partir de los hibridomas

Se prepararon anticuerpos a partir de los diez hibridomas comentados en el ejemplo 1 usando uno de dos sistemas diferentes: frascos Integra y agitadores con burbujeo.

Frascos Integra

Se hicieron crecer siete líneas de hibridoma, 2.12.1, 1.24.2, 1.29.1, 1.74.1, 1.75.1, 1.60.2 y 2.40.1, cada uno por separado, en frascos T75 en 20 ml de medio HSFM (véase la tabla 2 para los componentes del medio). Cuando los hibridomas eran casi confluyentes en los frascos T75, se transfirieron a frascos Integra (Integra Biosciences, Integra CL1000, n.° de catálogo 90 005).

El frasco Integra es un frasco de cultivo celular que está dividido mediante una membrana en dos cámaras, una cámara pequeña y una cámara grande. Se colocó un volumen de 20-30 ml de células de hibridoma a una densidad celular mínima de $1x10^6$ células por ml de cada una de las siete líneas de hibridoma en la cámara pequeña de siete frascos Integra en medio Integra (véase la tabla 2 para los componentes del medio Integra). Se colocó medio Integra solo (1 l) en las cámaras grandes de los frascos Integra. La membrana que separa las dos cámaras es permeable a nutrientes de peso molecular pequeño pero es impermeable a células de hibridoma y a anticuerpos producidos por esas células. Por tanto, las células de hibridoma y los anticuerpos producidos por esas células de hibridoma se mantuvieron en la cámara pequeña.

Tras una semana, se retiró el medio de ambas cámaras de cada uno de los siete frascos Integra y se reemplazó con medio Integra nuevo. Los medios recogidos de las siete cámaras pequeñas se conservaron por separado. Tras una segunda semana de crecimiento, se recogieron de nuevo los medios de las cámaras pequeñas. Se combinaron los medios recogidos de la semana 1 de cada línea de hibridoma con los medios recogidos de la semana 2 de la misma línea de hibridoma. Se centrifugaron las siete muestras de medios recogidas resultantes de las siete líneas de

hibridoma para eliminar células y residuos (15 minutos a 3000 rpm) y se filtraron los sobrenadantes resultantes (0,22 um).

Frascos agitadores con burbujeo (3 l)

Se hicieron crecer por separado tres líneas de hibridoma, 3.10.1, 2.4.4 y 2.12.1 en frascos T75 en 20 ml de medio HSFM. Cuando los hibridomas alcanzaron suficiente densidad celular, se transfirieron a frascos T175. Asimismo, cuando los hibridomas alcanzaron suficiente densidad celular en los frascos T175, se transfirieron a frascos agitadores de 100 ml y luego a frascos agitadores de 500 ml y luego a frascos agitadores de 1 l. Cuando las células alcanzaron suficiente densidad celular en los frascos agitadores de 1 l, se transfirieron a frascos agitadores con burbujeo de 3 l (Bellco Biotechnology, n.° de catálogo 1965-300, con accesorio de brazo lateral, n.° de catálogo 1965-30003).

El frasco centrifugador con burbujeo de 3 l es un recipiente de vidrio donde los cultivos se mezclan con un impulsor controlado por una plataforma magnética. El centrifugador está conectado a una conducción de gas para proporcionar el 5% de CO_2 y aire.

Hibridoma 3.10.1

Se sembraron dos frascos agitadores con burbujeo de 3 l con células de hibridoma de la línea de hibridoma 3.10.1 en medio HSFM con las adiciones indicadas en la tabla 3, que resume las condiciones de crecimiento para esos dos frascos con burbujeo.

Tabla 3. Condiciones para hacer crecer el hibridoma 3.10.1

Condiciones	Agitador 1	Agitador 2
Densidad de siembra (10E6 células/ml)	0,46	0,46
HSFM (Gibco n.° de catálogo 12045-076)	X	X
Suero de IgG ultrabajo (Gibco n.° de catálogo 16250-078)	5%	5%
L-glutamina (JRH n.° de catálogo 59202-500M)	8 mmol/l	2 mmol/l
P/S (Gemini n.° de catálogo 400-109)	1%	1%
NEAA (JRH n.° de catálogo 58572-77P)	1%	1%
Peptona (Difco, n.° de catálogo 211693)	1 g/l	1 g/l
Glucosa 2 M (JT Baker, n.° de catálogo 1920-07)	8 g/l	2 g/l
Antiespumante C (Sigma n.° de catálogo A-8011)	2 ml/l	2 ml/l
Productividad (µg/ml)	24	34

Se hicieron crecer los cultivos durante 15 días y se recogieron cuando la viabilidad estaba por debajo del 20%, tal como se determina mediante exclusión de azul de tripano. La recogida consistió en centrifugación durante 15 minutos a 7000 rpm y posterior filtración del sobrenadante resultante a través de un filtro de 0,22 µm. Se determinó la productividad midiendo la cantidad de proteína presente en las muestras recogidas finales mediante HPLC de proteína A y se notifica en la tabla 3.

Hibridoma 2.4.4

Se sembraron cinco frascos agitadores con burbujeo de 3 l con células de hibridoma de la línea de hibridoma 2.4.4 en medio HSFM con las adiciones indicadas en la tabla 4, que resume las condiciones de crecimiento para esos cinco frascos con burbujeo.

Tabla 4. Condiciones para hacer crecer el hibridoma 2.4.4.

Condiciones	Agitador 1	Agitador 2	Agitador 3	Agitador 4	Agitador 5
Densidad de siembra (10E6 células/ml)	0,3	0,3	0,18	0,18	0,4
HSFM (Gibco n.° de catálogo 12045-076)	X	X	X	X	X
Suero de IgG ultrabajo (Gibco n.° de catálogo 16250-078)	5%	5%	5%	5%	5%
L-glutamina (JRH n.° de catálogo 59202-500M)	8 mmol/l	2 mmol/l	2 mmol/l	8 mmol/l	4 mmol/l
P/S (Gemini n.° de catálogo 400-109)	1%	1%	1%	1%	1%
NEAA (JRH n.° de catálogo 58572-77P)	1%	1%	1%	1%	1%
Peptona	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l
Glucosa 2 M	8 g/l	2 g/l	2 g/l	8 g/l	4 g/l
Antiespumante C	2 ml/l	2 ml/l	2 ml/l	2 ml/l	2 ml/l
Productividad (µg/ml)	41	82	38	45	79
Duración del cultivo (días)	10	10	7	7	8

Se hicieron crecer los cultivos durante 7, 8 ó 10 días tal como se indica en la tabla 4, y se recogieron cuando la viabilidad celular estaba por debajo del 20%, tal como se describió anteriormente.

Hibridoma 2.12.1

Se sembraron seis frascos agitadores con burbujeo de 3 l con células de hibridoma de la línea de hibridoma 2.12.1 en medio HSFM con las adiciones indicadas en la tabla 5, que resume las condiciones de crecimiento para esos seis frascos agitadores con burbujeo.

Tabla 5. Condiciones para hacer crecer el hibridoma 2.12.1

Condiciones	Agitador 1	Agitador 2	Agitador 3	Agitador 4	Agitador 5	Agitador 6
Densidad de siembra (10E6 células/ml)	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4
HSFM (Gibco n.° de catálogo 12045-076)	X	X	X	X	X	X
Suero de IgG ultrabajo (Gibco n.° de catálogo 16250-078)	5%	5%	5%	5%	5%	5%
L-glutamina (JRH n.° de catálogo 59202-500M)	2 mmol/l	8 mmol/l	4 mmol/l	4 mmol/l	4 mmol/l	4 mmol/l
P/S (Gemini n.° de catálogo 400-109)	1%	1%	1%	1%	1%	1%
NEAA (JRH n.° de catálogo 58572-77P)	1%	1%	1%	1%	1%	1%
Peptona	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l
Glucosa 2 M	2 g/l	8 g/l	4 g/l	4 g/l	4 g/l	4 g/l
Antiespumante C	2 ml/l	2 ml/l	2 ml/l	2 ml/l	2 ml/l	2 ml/l
Productividad (µg/ml)	44	49	65	65	65	65
Duración del cultivo (días)	7	7	11	11	11	11

Se hicieron crecer los cultivos durante 7 ó 11 días, tal como se indica en la tabla 5 y se recogieron cuando la viabilidad estaba por debajo del 20%, tal como se describió anteriormente.

Ejemplo 3

Clonación y análisis de secuencia de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos

A. Clonación de cadenas ligeras

Se identificó que diez hibridomas (1.24.1, 1.29.1, 1.60.1, 1.61.3, 1.74.3, 1.75.1, 2.4.4, 2.12.1, 2.40.1 y 3.10.1) expresaban anticuerpos monoclonales frente a HGF, tal como se comentó en el ejemplo 1. Se aisló el ARN total de cada uno de esos diez hibridomas usando el reactivo TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se adaptaron los extremos 5' de esas diez preparaciones de ARN total para la amplificación rápida en 5' de extremos de ADNc (RACE) usando el kit GeneRacer® (Invitrogen). Entonces se usaron esas diez preparaciones de ARN modificadas en el extremo 5' en diez reacciones de RACE separadas, usando cada una un cebador al azar con un adaptador de extensión (5'-GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT -3') (SEQ ID NO: 48), para generar diez moléculas de ADNc.

Entonces se amplificaron las diez moléculas de ADNc en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) separadas para generar diez secuencias de cadena ligera kappa amplificadas. Para cada una de esas reacciones, el cebador directo fue el cebador directo anidado GeneRacer™ (5' GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA -3') (SEQ ID NO: 49). El cebador inverso (5'- GGG GTC AGG CTG GAA CTG AGG -3') (SEQ ID NO 50) se diseñó para unirse a la secuencia complementaria a la cadena ligera kappa.

Entonces se ligaron por separado cada una de las diez secuencias de cadena ligera kappa amplificadas en plásmidos pCR4-TOPO (Invitrogen) separados. Entonces se amplificaron por separado en bacterias los diez plásmidos resultantes, que contenían cada uno una de las diez secuencias de cadena ligera kappa, y se secuenciaron varios clones de cada uno. Se usaron esas secuencias para diseñar cebadores de PCR para amplificar las diez secuencias de marco de lectura abierto de cadena ligera kappa a partir de los plásmidos clonados tal como sigue.

Los conjuntos de cebadores para cada una de las diez PCR comprendían un cebador en 5' y un cebador en 3'. Cada cebador en 5' comprendía una parte complementaria a la secuencia del extremo amino terminal de la secuencia de cadena ligera kappa particular, una secuencia Kozak optimizada y uno o más sitios de restricción. Por ejemplo, la secuencia del cebador en 5' usado en la reacción con el plásmido derivada en última instancia del hibridoma 3.10.1 fue:

5'- ACA ACA AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGA AGC CCC AGC TCA

XbaI Kozak

GCT TCT CTT -3'(SEQ ID: 51)

El cebador en 3' para cada una de las PCR comprendía una parte complementaria al extremo carboxilo terminal de la secuencia de la secuencia de cadena ligera kappa particular, incluyendo el codón de terminación y un sitio de restricción. Por ejemplo, la secuencia del cebador en 3' usado en la reacción con el plásmido derivada en última instancia del hibridoma 3.10.1 fue:

5'-CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT

SalI *

C -3'(SEQ ID NO: 52)

Se usaron conjuntos de cebadores separados en reacciones de PCR separadas con los plásmidos clonados correspondientes para amplificar las diez secuencias de región codificante de cadena ligera kappa. Se aislaron en gel por separado los diez productos de amplificación de esas reacciones y se purificaron usando un kit de extracción de gel QIAquick® (n.° de catálogo 28704, Qiagen, Valencia, CA). Se cortaron entonces cada uno de esos productos purificados con las enzimas de restricción apropiadas para obtener las secuencias de región codificante de cadena ligera kappa libres del plásmido. Por ejemplo, el producto purificado correspondiente al hibridoma 3.10.1 se cortó con *XbaI* y *SalI*, cuyos sitios se introdujeron mediante los cebadores durante la amplificación por PCR de ese plásmido clonado, tal como se comentó anteriormente. Se aislaron en gel por separado de nuevo las secuencias de región codificante de cadena ligera kappa digeridas por restricción resultantes y se purificaron usando un kit de extracción de gel QIAquick® (n.° de catálogo 28704, Qiagen, Valencia, CA).

Entonces se ligaron por separado cada una de esas diez secuencias de región codificante de cadena ligera kappa digeridas por restricción purificadas en un vector de expresión de mamíferos, pDSRα20 (documento WO 90/14363), para crear diez vectores de expresión de cadena ligera kappa separados correspondientes a los diez hibridomas originales. Entonces se secuenciaron los diez insertos de vector de expresión de cadena ligera kappa. Se confirmó que el vector de expresión pDSRα20 que contenía la región codificante de cadena ligera kappa derivada en última instancia del hibridoma 3.10.1 (pDSRα20:3.10.1) comprendía 5473 pares de bases incluyendo un fragmento de PCR de 719 pares de bases, que codificaba para los 235 residuos de aminoácido (incluyendo la secuencia señal de cadena kappa de 20 aminoácidos) de la cadena ligera kappa 3.10.1. Ese vector de expresión comprendía siete regiones funcionales, tal como se describe en la tabla 6.

Tabla 6. Vector de expresión pDSR 20:3.10.1kappa

Número de pares de bases del plásmido:

2 a 881	Una señal de poliadenilación/terminación de la transcripción de la subunidad α de la hormona de glicoproteína hipofisiaria bovina (α-FSH) (Goodwin, *et al.*, 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; número de registro de Genbank X00004)
882 a 2027	Un minigén de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón que contiene el promotor de DHFR de ratón endógeno, las secuencias codificantes de ADNc y las señales de poliadenilación/terminación de la transcripción de DHFR (Gasser *et al*, 1982, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 79:6522-6; Nunberg *et al.*, 1980, Cell 19:355-64; Setzer *et al.*, 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan *et al.*, 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 a 3947	Secuencias de pBR322 que contienen el gen marcador de resistencia a ampicilina y el origen para la replicación del plásmido en *E. coli* (número de registro de Genbank J01749)
3949 a 4292	Un promotor temprano, potenciador y origen de replicación de SV40 (Takebe *et al.*, 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, número de registro de Genbank J02400)
4299 a 4565	Un elemento potenciador de la traducción del dominio LTR de VLTH-1 (Seiki *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:3618-22, número de registro de Genbank J02029)
4574 a 4730	Un intrón de las señales donadoras/aceptoras de corte y empalme de 16S, 19S de SV40

	(Okayama y Berg, 1983. Mol. Cell Biol.: 280-9, número de registro de Genbank J02400)
4755 a 5473	El ADNc de cadena ligera kappa 3.10.1 entre los sitios de *Xba*I y *Sal*I

B. Clonación de cadenas pesadas

Se clonó la región variable de las cadenas pesadas de los anticuerpos frente a HGF de los diez hibridomas usando los mismos métodos que los usados para las cadenas ligeras comentados anteriormente en el ejemplo 3A. Se aisló el ARN total de cada uno de los diez hibridomas, se modificó en 5' para RACE y se usó para generar moléculas de ADNc tal como se describió anteriormente en el ejemplo 3A.

Se amplificaron esas diez moléculas de ADNc en reacciones de PCR separadas tal como se comentó para las cadenas ligeras en el ejemplo 3A, excepto porque el cebador inverso (5'- GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA -3' (SEQ ID NO: 53)) se diseñó para unirse a la secuencia complementaria de la región variable de cadena pesada. El cebador directo fue de nuevo el cebador directo anidado GeneRacer™ (5' GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA -3') (SEQ ID NO: 49).

Se ligaron por separado cada una de las diez secuencias de región variable de cadena pesada amplificadas en plásmidos pCR4-TOPO separados. Entonces se amplificaron por separado en bacterias los diez plásmidos resultantes, que contenían cada uno una de las diez secuencias de región variable de cadena pesada, y se secuenciaron varios clones de cada uno tal como se describió anteriormente para las cadenas ligeras en el ejemplo 3A. Se usaron esas secuencias para diseñar cebadores de PCR para amplificar cada una de las regiones variables de cadena pesada a partir de los plásmidos clonados tal como sigue.

Se diseñaron los conjuntos de cebadores para cada una de las diez PCR usando la misma estrategia que se usó para las cadenas ligeras, comentada anteriormente en el ejemplo 3A. Cada cebador en 5' comprendía una parte complementaria a la secuencia del extremo amino terminal de la secuencia de región variable de cadena pesada particular, una secuencia Kozak optimizada y uno o más sitios de restricción. Por ejemplo, la secuencia del cebador en 5' usado para amplificar la región variable de cadena pesada derivada en última instancia del hibridoma 3.10.1 fue:

5'- AGC AGA AGC TTC TAG ACC ACC ATG AAA CAC CTG TGG TTC

XbaI Kozak

TTC CTC CTC -3' (SEQ ID NO: 54)

El cebador en 3' para cada una de las diez PCR comprendía una parte complementaria al extremo carboxilo terminal de la secuencia consenso de la secuencia de región variable de cadena pesada particular, incluyendo un codón de terminación y un sitio de restricción. Por ejemplo la secuencia del cebador en 3' usado para amplificar la región variable de cadena pesada derivada en última instancia del hibridoma 3.10.1 fue:

5'-GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTG ACC AGG GTT CC -3'

BsmBI

(SEQ ID NO: 55)

Se usaron conjuntos de cebadores separados en reacciones de PCR separadas con los plásmidos clonados correspondientes para amplificar las diez secuencias de región variable de cadena pesada. Se aislaron en gel por separado los diez productos de amplificación de esas reacciones y se purificaron usando un kit de extracción de gel QIAquick y se cortaron con las enzimas de restricción apropiadas tal como se describió para las cadenas ligeras en el ejemplo 3A. Se aislaron en gel las secuencias de región variable de cadena pesada digeridas por restricción resultantes y se purificaron usando un kit de extracción de gel QUIAquick tal como se describió en el ejemplo 3A.

Entonces se ligaron por separado tres de esas diez secuencias de región variable de cadena pesada digeridas por restricción purificadas, las derivadas en última instancia del hibridoma 3.10.1, 1.24.1 y 2.4.4, en el vector de expresión de mamíferos pDSRα20:hIgGC_H para crear tres vectores de expresión de cadena pesada de IgG1. El vector de expresión pDSRα20:hIgGC_H es igual a pDSRα20 excepto porque también contiene la secuencia de región constante de IgG1. El vector de expresión pDSRα20:hIgGC_H se resume en la tabla 7.

Tabla 7. Vector de expresión pDSRα20:hIgGC_H

Número de pares de bases del plásmido:

2 a 881	Una señal de poliadenilación/terminación de la transcripción de la subunidad α de la hormona de glicoproteína hipofisiaria bovina (α-FSH) (Goodwin, *et al.,* 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; número de registro de Genbank X00004)
882 a 2027	Un minigén de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón que contiene el promotor de DHFR de ratón endógeno, las secuencias codificantes de ADNc y las señales de poliadenilación/terminación de la transcripción de DHFR (Gasser *et al*, 1982, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 79:6522-6; Nunberg *et al.*, 1980, Cell 19:355-64; Setzer *et al.*, 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan *et al.*, 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 a 3947	Secuencias de pBR322 que contienen el gen marcador de resistencia a ampicilina y el origen para la replicación del plásmido en *E. coli* (número de registro de Genbank J01749)
3949 a 4292	Un promotor temprano, potenciador y origen de replicación de SV40 (Takebe *et al.,* 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, número de registro de Genbank J02400)
4299 a 4565	Un elemento potenciador de la traducción del dominio LTR de VLTH-1 (Seiki *et al.,* 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:3618-22, número de registro de Genbank J02029)
4574 a 4730	Un intrón de las señales donadoras/aceptoras de corte y empalme de 16S, 19S de SV40 (Okayama y Berg, 1983. Mol. Cell Biol.:280-9, número de registro de Genbank J02400)
4755 a 5791	El ADNc de la cadena pesada pI/hCH1 entre los sitios de *Xba*I y *Sal*I. Cuyas secuencias son las siguientes: XbaI BsmBI **TCTAGA**CCACCGCCATGGGTGAAAATTGAAT**CGTCTC**TA GTGCCTCCACCAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT CGTGGAACTC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCA

GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC
CCAAATCTTG TGACAAAACT CACACATGCC CACCGTGCCC
AGCACCTGAA CTCCTGGGGG GACCGTCAGT
CTTCCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC
TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG
GTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGAGGTC
AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG
GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG
GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC
AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG
CTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAG
CCCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAA
AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC
CCTGCCCCCA TCCCGGGATG AGCTGACCAA
GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA
AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA
GTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAA
CTACAAGACC ACGCCTCCCG TGCTGGACTC
CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ATAGCAAGCT
CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG
GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA
GGCTCTGCAC AACCACTACA CGCAGAAGAG
CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA
SalI
AATGATAA**GT CGAC** (SEQ ID NO: 56)

Se secuenciaron las regiones variables de cadena pesada de los tres insertos de vector de expresión de IgG1. El vector de expresión pDSRα20:hIgGC$_H$ que contenía la región variable de cadena pesada derivada en última instancia del hibridoma 3.10.1 (pDSRα20:hIgGC$_H$:3.10.1) se resume en la tabla 8.

Tabla 8. Vector de expresión pDSRα20:hIgGC$_H$:3.10.1

Número de pares de bases del plásmido:

2 a 881	Una señal de poliadenilación/terminación de la transcripción de la subunidad α de la hormona de glicoproteína hipofisiaria bovina (α-FSH) (Goodwin, *et al.*, 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; número de registro de Genbank X00004)
882 a 2027	Un minigén de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón que contiene el promotor de DHFR de ratón endógeno, las secuencias codificantes de ADNc y las señales de poliadenilación/terminación de la transcripción de DHFR (Gasser *et al*, 1982, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 79:6522-6; Nunberg *et al.*, 1980, Cell 19:355-64; Setzer *et al.*, 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan *et al.*, 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 a 3947	Secuencias de pBR322 que contienen el gen marcador de resistencia a ampicilina y el origen para la replicación del plásmido en *E. coli* (número de registro de Genbank J01749)
3949 a 4292	Un promotor temprano, potenciador y origen de replicación de SV40 (Takebe *et al.*, 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, número de registro de Genbank J02400)
4299 a 4565	Un elemento potenciador de la traducción del dominio LTR de VLTH-1 (Seiki *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:3618-22, número de registro de Genbank J02029)
4574 a 4730	Un intrón de las señales donadoras/aceptoras de corte y empalme de 16S, 19S de SV40 (Okayama y Berg, 1983. Mol. Cell Biol.: 280-9, número de registro de Genbank J02400)
4755 a 6178	El ADNc de la cadena pesada de IgG1 3.10.1 entre los sitios de *Xba*I y *Sal*I

Se ligaron por separado cada una de la diez secuencias de región variable de cadena pesada purificadas en un vector de expresión de mamíferos pDSRα20 junto con secuencias que codifican para la región constante de IgG2 para crear diez vectores de expresión de IgG2. Cada uno de los diez vectores de expresión de IgG2 resultantes (designados pDSRα20:hIgG2:n.° de hibridoma) comprendía secuencias que codifican para la región constante de IgG2 y una de las diez secuencias de región variable de cadena pesada. Se secuenciaron los diez insertos de

secuencia de región variable de cadena pesada para confirmar que comprendían las mismas secuencias de región variable de cadena pesada que se identificaron en los plásmidos clonados a partir de los clones pCR4-TOPO. El vector de expresión pDSRα20:hIgG2 que contenía la región variable de cadena pesada derivada en última instancia del hibridoma 2.12.1 (pDSRα20:hIgG2:2.12.1) se resume en la tabla 9.

Tabla 9. Vector de expresión pDSRα20:IgG2:2.12.1

Número de pares de bases del plásmido:

2 a 881	Una señal de poliadenilación/terminación de la transcripción de la subunidad α de la hormona de glicoproteína hipofisiaria bovina (α-FSH) (Goodwin, *et al.*, 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; número de registro de Genbank X00004)
882 a 2027	Un minigén de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón que contiene el promotor de DHFR de ratón endógeno, las secuencias codificantes de ADNc y las señales de poliadenilación/terminación de la transcripción de DHFR (Gasser *et al*, 1982, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 79:6522-6; Nunberg *et al.*, 1980, Cell 19:355-64; Setzer *et al.*, 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan *et al.*, 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 a 3947	Secuencias de pBR322 que contienen el gen marcador de resistencia a ampicilina y el origen para la replicación del plásmido en *E. coli* (número de registro de Genbank J01749)
3949 a 4292	Un promotor temprano, potenciador y origen de replicación de SV40 (Takebe *et al.*, 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, número de registro de Genbank J02400)
4299 a 4565	Un elemento potenciador de la traducción del dominio LTR de VLTH-1 (Seiki *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:3618-22, número de registro de Genbank J02029)
4574 a 4730	Un intrón de las señales donadoras/aceptoras de corte y empalme de 16S, 19S de SV40 (Okayama y Berg, 1983. Mol. Cell Biol.: 280-9, número de registro de Genbank J02400)
4755 a 6166	El ADNc de la cadena pesada de IgG2 2.12.1 entre los sitios de *Xba*I y *Sal*I

Las secuencias de ADNc para las regiones variables de cadena ligera kappa (SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, y 19), la región constante de cadena ligera kappa (SEQ ID NO: 21), las regiones variables de cadena pesada (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20) y las regiones constantes de cadena pesada de IgG1 e IgG2 (SEQ ID NO: 22 y 23) se muestran en la figura 3.

Se determinaron las secuencias de polipéptido predichas a partir de cada una de esas secuencias de ADNc. Las secuencias de polipéptido predichas para las regiones variables de cadena ligera kappa (SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 y 42), la región constante de cadena ligera kappa (SEQ ID NO 44), la regiones variables de cadena pesada (SEQ. ID NO: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 y 43) y las regiones constantes de cadena pesada de IgG1 y IgG2 (SEQ ID NO: 45 y 46) se muestran en la figura 4.

Basándose en los datos de secuencia, se determinaron los genes de la línea germinal de la que se derivaba cada región variable de cadena pesada o cadena ligera. La identidad de los genes de la línea germinal se indica junto a la línea de hibridoma correspondiente en las figuras 1, 2, 3 y 4. El análisis adicional de la relación de las secuencias (figuras 1 B y 2B) condujo a los dendogramas representados en la figura 1A (regiones variables de cadena ligera kappa) y la figura 2A (regiones variables de cadena pesada).

Ejemplo 4

Expresión transitoria en células 293T

En diez cotransfecciones separadas, se cotransfectaron células 293T con un vector de expresión pDSRα20 que comprende una secuencia de cadena ligera kappa descrita en el ejemplo 3A (vector de cadena ligera) y un vector de expresión pDSRα20 que comprende una secuencia de cadena pesada descrita en el ejemplo 3B (vector de cadena pesada). En esas diez cotransfecciones separadas, se cotransfectaron células 293T tanto con el vector de cadena ligera como con el vector de cadena pesada derivados en última instancia de uno de los hibridomas comentados en el ejemplo 1. Específicamente, para la cotransfección del vector derivado en última instancia del hibridoma 3.10.1, se usó el vector de cadena pesada que comprende IgG1 (pDSRα20:hIgGC_H:3.10.1). Para las cotransfecciones de los vectores derivados en última instancia de los otros nueve hibridomas, se usó la cadena pesada que comprende IgG2 (pDSRα20:hIgG2:n.° de hibridoma). Se realizaron las cotransfecciones usando o bien Fugene 6 o bien X-TremeGene RO-1539 (ambos de Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN) siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante.

Las cotransfecciones se realizaron en primer lugar usando células 293T adherentes en frascos giratorios convencionales. Se sembraron los frascos giratorios con $4x10^7$ a $5x10^7$ células por frasco en DMEM que contenía suero bovino fetal (FBS) al 5%(Hyclone, n.° de catálogo SH 30070.03), 1X aminoácidos no esenciales (Sigma, n.° de catálogo M 7145), 1X penicilina/estreptomicina (Sigma, n.° de catálogo P7539 (penicilina/estreptomicina 10.000 U/ml)) y 1X piruvato de sodio (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cuando las células alcanzaron una confluencia del 60-70%, se cotransfectaron el vector de cadena pesada y el vector de cadena ligera derivado en última instancia de un hibridoma particular en las células durante 24 horas, tras lo cual se cambiaron los medios a los mismos medios

carentes de suero. Se recogieron los medios libres de suero y se reemplazaron con medios libres de suero recientes dos veces, a las 48 y 96 horas tras la transfección, produciendo un volumen total de 1,25 l de medio libre de suero recogido.

Se repitieron las diez cotransfecciones separadas usando células 293T adaptadas libres de suero en suspensión en los mismos medios comentados anteriormente carentes de suero. Se cotransfectaron los vectores de cadena pesada y los vectores de cadena ligera correspondientes a un hibridoma particular en las células en un volumen de cultivo de 500 ml. Se incubaron las células transfectadas durante 7 días, tras lo cual se recogió el medio condicionado libre de suero.

Ejemplo 5

Expresión de anticuerpos y clonación de células CHO

Se usaron células de ovario de hámster chino deficientes en DHFR (CHOd$^-$) para generar expresión estable de anticuerpos recombinantes frente a HGF. En diez cotransfecciones separadas, se cotransfectaron células CHOd$^-$ tanto con el vector de cadena pesada como con el vector de cadena ligera derivados en última instancia de uno de los hibridomas comentados en el ejemplo 1, tal como se comentó en el ejemplo 4. Las cotransfecciones se lograron usando un método de fosfato de calcio convencional.

Se hicieron crecer por separado las células transfectadas de cada una de las diez cotransfecciones en medios de selección que contenían DMEM con alto contenido en glucosa carentes de hipoxantina-timidina (Gibco/BRL, Carlsbad, CA n.º de catálogo 11965) con suero bovino fetal dializado al 5%. Tales medios carentes de hipoxantina-timidina seleccionan para crecimiento de células que expresan la enzima DHFR recombinante. Se examinaron los medios de cada uno de los transfectantes crecidos usando ensayos ELISA convencionales para detectar la presencia de los anticuerpos humanos.

Ejemplo 6

Expresión de anticuerpos frente a HGF en clones CHOd$^-$

Se hicieron crecer por separado seis muestras de cada uno de los diez clones CHOd$^-$ estables diferentes descritos en el ejemplo 5, expresando cada clon diferente uno de los diez anticuerpos frente a HGF diferentes, en medios de crecimiento. Los medios de crecimiento fueron DMEM con alto contenido en glucosa (Gibco/BRL, Carlsbad, CA n.º de catálogo 11965), complementado con FBS dializado al 5%, aminoácidos no esenciales y L-glutamina (Life Technologies, Carlsbad, CA). Se hicieron crecer las células a 37ºC bajo el 5% de CO_2.

Cuando los clones de CHOd$^-$ alcanzaron la fase de crecimiento en seis pocillos, se añadió metotrexato 10 nM a los medios de crecimiento para amplificar la expresión de los anticuerpos. Una vez que las células llegaron a ser confluentes, se trasladaron a placas de 100 mm. Se aumentó la concentración de metotrexato desde 10 nM hasta 20 nM, hasta 50 nM, hasta 100 nM, hasta 250 nm, hasta 500 nM, hasta 1 μM, hasta 2 μM, hasta 4 μM y finalmente hasta 10 μM. Se mantuvieron las células a cada concentración durante un mínimo de una semana y hasta que estuvieron suficientemente adaptadas a una concentración dada de metotrexato, tal como se determinó visualmente.

Se sometieron a ensayo medios condicionados de cada uno de los clones en cada concentración de metotrexato para determinar el nivel de expresión de cada anticuerpo frente a HGF. Se sometieron a ensayo los medios mediante ensayos de tipo sándwich de fluorescencia de resolución temporal (TRF) y ELISA convencionales para medir de manera semicuantitativa la unión de los anticuerpos frente a HGF a placas recubiertas con HGF humano.

Los clones amplificados con metotrexato con los niveles de expresión de anticuerpo superiores se adaptaron a crecer en medio de producción libre de suero tal como sigue. Se sometieron los clones a tripsinización del recipiente de cultivo, se centrifugaron y se resuspendieron en 50 ml de medio de producción libre de suero a $4x10^5$ células/ml en un frasco de agitación con tapa sólida de 250 ml. Se incubaron los cultivos en una sala cálida a 37ºC y se agitaron a aproximadamente 125 RPM. Cada 3-4 días, se centrifugaron las células y se diluyeron hasta $4x10^5$ células/ml con medio de producción libre de suero reciente. Se añadió medio de producción libre de suero reciente aproximadamente diez veces por cada uno de los cultivos hasta completar esta fase de adaptación.

Ejemplo 7

Purificación de anticuerpos a partir de medios condicionados de células recombinantes

Se recogieron medios de los hibridomas descritos en el ejemplo 1, de las células 293 T de expresión transitoria descritas en el ejemplo 4, de los transfectantes estables descritos en el ejemplo 5 y de los clones amplificados con metotrexato descritos en el ejemplo 6. Se concentraron por separado medios de cada una de estas fuentes aproximadamente 10 veces usando un cartucho enrollado en espiral YM30 (Milipore, Bedford, MA n.º de catálogo S10Y30) siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante. Se estimó la concentración de anticuerpo presente en cada muestra de medios concentrados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Se purificaron los anticuerpos de las muestras de medios concentrados mediante purificación en resina de afinidad usando proteína A recombinante-Sepharose (rProA) (Amersham, Piscataway, NJ, n.° de catálogo 17-1279-03). En primer lugar se lavó rProA cuatro veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Tras el último lavado, se obtuvo una suspensión de rProA lavada en PBS mezclando un volumen igual de rProA y PBS. Se añadió esa suspensión de rProA a cada muestra de medios concentrados en una cantidad de aproximadamente 1 µl de suspensión de rProA por cada 5 µg de anticuerpo en la muestra de medios, pero no inferior a 50 µl de suspensión de rProA por cualquier muestra de medios. Se incubaron las muestras de medios/suspensión resultantes durante la noche at 4°C con agitación. Entonces se centrifugaron las muestras de medios/suspensión para sedimentar la rProA. Se descartaron las fracciones de sobrenadante que contenían proteínas no unidas. Se resuspendieron por separado los sedimentos de rProA en 0,5 ml de PBS cada uno. Entonces se transfirieron las muestras de rProA resuspendidas a tubos Spin-X de 0,45 µm (CoStar, Corning NY, n.° de catálogo 8162) y se centrifugaron para eliminar el PBS. Entonces se lavó la rProA en los tubos Spin-X 3 veces con 0,5 ml de PBS por lavado.

Se eluyeron las fracciones de anticuerpo de la rProA en los tubos Spin-X añadiendo 1,5 volúmenes de glicina 0,1 M, pH 2,7 e incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Entonces se centrifugaron los tubos Spin-X y se recogieron por separado los eluatos de cada tubo Spin-X. Se repitió la elución y se reunieron los dos elutatos de cada tubo Spin-X. Se neutralizó el pH de los eluatos reunidos con un 1/25° del volumen de Tris 1,0 M, pH 9,2. Entonces se filtró cada muestra a través de un nuevo tubo Spin-X para eliminar los materiales particulados.

Se determinó la concentración de proteínas de las preparaciones finales mediante el ensayo de Bradford usando IgG humana como patrón. Para evaluar la pureza, se hicieron correr muestras de cada una de las preparaciones finales en carriles separados de un gel de SDS-PAGE gel, se tiñeron con Coomassie y se inspeccionaron visualmente.

Ejemplo 8

Caracterización de la unión de anticuerpos frente a HGF

A. Mediciones de afinidad

Usando un instrumento BIAcore®3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ), se realizó un análisis de afinidad de seis de los anticuerpos frente a HGF descritos en el ejemplo 6 (los derivados en última instancia de los hibridomas 3.10.1, 2.4.4, 2.12.1, 1.29.1, 1.75.1 y 1.74.3) según las instrucciones del fabricante. El tampón de transferencia para esos análisis fue PBS con tensioactivo P20 al 0,005% (BIAcore, Inc. Piscataway, NJ). Se inmovilizó la proteína G recombinante (Pierce, Rockford, IL) en un chip sensor CM5 de calidad para investigación (Biacore, Inc. Piscataway, NJ) a través de grupos amina primaria usando el kit de acoplamiento de amina (Biacore, Inc. Piscataway, NJ), según las instrucciones del fabricante.

En seis muestras separadas, se unieron por separado aproximadamente 200 unidades de resonancia (RU) de cada uno de los seis anticuerpos frente a HGF a proteína G inmovilizada siguiendo las instrucciones del fabricante. Se inyectaron muestras que comprendían diversas concentraciones (0 - 100 nM) de HGF humano sobre la superficie del anticuerpo unido a una velocidad de flujo de 50 µl/min durante 3 minutos. Se determinaron los parámetros cinéticos de unión de anticuerpos incluyendo k_a (constante de velocidad de asociación), k_d (constante de velocidad de disociación) y K_D (constante de equilibrio de disociación) usando el programa informático BIA evaluation 3.1 (BIAcore, Inc. Piscataway, NJ). Las constantes de equilibrio de disociación inferiores indican mayor afinidad del anticuerpo por HGF. Los datos se representan en la figura 6A.

También se midieron los valores de K_D de cada uno de cuatro anticuerpos frente a HGF (los derivados en última instancia de los hibridomas 2.4.4, 1.29.1, 1.74.2 y 2.12.1) usando un método de unión en equilibrio. Se realizó este método con un instrumento BIAcore®3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) usando PBS con tensioactivo P20 al 0,005% (BIAcore, Inc. Piscataway, NJ) como tampón de transferencia. Se inmovilizaron por separado los cuatro anticuerpos frente a HGF en chips sensores CM5 de calidad para investigación (Biacore, Inc. Piscataway, NJ) a través de grupos amina primaria usando un kit de acoplamiento de amina (Biacore, Inc. Piscataway, NJ) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En ensayos separados, se incubaron por separado cada uno de los cuatro anticuerpos frente a HGF, a lo largo de un intervalo de concentraciones (desde 0,01 nM hasta 50 nM) con cada una de dos concentraciones diferentes (0,05 nM y 1 nM) de HGF humano en PBS con P-20 al 0,005% y BSA 0,1 mg/ml a temperatura ambiente durante al menos seis horas. Entonces se inyectó cada una de esas muestras sobre una superficie de un chip sensor CM5 sobre el que se había inmovilizado el mismo anticuerpo frente a HGF. La señal de unión obtenida fue proporcional al HGF libre en disolución. Se obtuvo la constante de equilibrio de disociación (K_D) del análisis de regresión no lineal de las curvas de competencia usando un modelo de unión homogéneo de un sitio de curva doble (software KinExA, Sapidyne Instruments Inc., Boise ID). Estos valores de constante de equilibrio de disociación se presentan en la figura 6B.

B. Especificidad de unión de anticuerpos frente a HGF

O bien se expresó HGF humano en células CHO o bien se adquirió de R&D Systems (R & D Systems, Minneapolis

MN, n.° de catálogo 294-HG-005). Se preparó HGF de ratón recombinante usando la secuencia en Liu *et al.*, Molecular cloning and characterization of cDNA encoding mouse hepatocyte growth factor, Biochim Biophys Acta. 16:1216(2):299-300 (1993). Se obtuvo HGF de ratón recombinante o bien mediante la expresión en células de insecto usando un vector de baculovirus o bien mediante la expresión en células 293T. En cada caso, se purificó el HGF de ratón mediante cromatografía de afinidad con sulfato de heparina.

Se mostró que cada una de las preparaciones de HGF humano y de ratón es biológicamente activa. El HGF humano indujo una fosforilación de Met humana dependiente de la dosis en células PC3 humanas (ATCC Manassas, VA n.° CRL 1435) y en células 4T1 de ratón (ATCC Manassas, VA n.° CRL 2531). El HGF de ratón indujo fosforilación de Met en células 4T1 de ratón, pero no en células PC3 humanas.

Se hicieron correr HGF humano y HGF de ratón en carriles separados de geles de SDS PAGE. Se hicieron correr HGF humano y HGF de ratón por separado a 100 ng/carril y a 10 ng/carril. Se hicieron correr algunos geles en condiciones no reductoras y se hicieron correr otros geles separados en condiciones reductoras usando beta-mercaptoetanol. Se transfirieron el HGF humano y el HGF de ratón en los geles de SDS PAGE a membranas de nitrocelulosa. Se incubaron estas membranas por separado con uno de los diez anticuerpos frente a HGF descritos en el ejemplo 6. Se incubó por separado cada uno de los diez anticuerpos frente a HGF con membranas de nitrocelulosa a partir de geles que contenían HGF humano y HGF de ratón en condiciones reductoras y con membranas de nitrocelulosa a partir de geles que contenían HGF humano y HGF de ratón en condiciones no reductoras. Entonces se incubaron las membranas con un anticuerpo de cabra anti-IgG humana unido a HRP (Pierce, Rockford, IL, n.° de catálogo 31412). Se detectó la señal de ese anticuerpo de cabra anti-IgG humana unido a HRP mediante electroquimioluminiscencia (ECL™; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, n.° de catálogo RPN2106) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La figura 7 muestra fotografías de geles que someten a prueba cada uno de los diez anticuerpos frente a HGF descritos en el ejemplo 6. Los paneles de la izquierda muestran geles que someten a prueba cada anticuerpo contra 100 ng de HGF humano (carril 1), 10 ng de HGF humano (carril 2), 100 ng de HGF de ratón y 10 ng de HGF de ratón (carril 4) en condiciones no reductoras. Los paneles de la derecha muestran geles que someten a prueba cada anticuerpo contra 100 ng de HGF humano (carril 5), 10 ng de HGF humano (carril 6), 100 ng de HGF de ratón (carril 7) y 10 ng de HGF de ratón (carril 8) en condiciones reductoras. Cada uno de los anticuerpos frente a HGF sometido a prueba se unió a HGF humano en condiciones no reductoras (carriles 1 y 2). Ninguno de los anticuerpos frente a HGF sometido a prueba se unió significativamente a HGF de ratón en condiciones no reductoras (carriles 3 y 4) o a HGF humano (carriles 5 y 6) o HGF de ratón (carriles 7 y 8) en condiciones reductoras.

C. Mapeo de epítopos usando proteínas de fusión

Se construyó un vector de expresión de mamíferos que comprende una secuencia de ADNc que codifica para avidina de pollo adyacente al sitio de clonación múltiple del vector pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, n.° de catálogo V044-50) usando técnicas moleculares convencionales (figura 9A). Este vector incluía la secuencia señal de avidina de pollo (figura 9B) para permitir la secreción de proteínas de fusión expresadas posteriormente. Se construyeron vectores de expresión insertando secuencias que codifican para una proteína diana particular en el sitio de clonación múltiple del vector de expresión de la proteína de fusión. Los constructos de fusión resultantes codificaban cada uno para una proteína avidina en el extremo N-terminal de una proteína diana.

Usando esta técnica, se prepararon proteínas de fusión que comprendían avidina fusionada a las siguientes proteínas diana: HGF humano de longitud completa; HGF d5, que es una variante de corte y empalme que se produce de manera natural de HGF humano (Rubin, J. *et al.* PNAS 88:415-419 (1991)); HGF de ratón de longitud completa; quimera n.° 1 que comprende una parte N-terminal de HGF humano (aminoácidos 32-505) y una parte C-terminal de HGF de ratón (aminoácidos 508-728); quimera n.° 2 que comprende una parte N-terminal de HGF de ratón (aminoácidos 33-506) y una parte C-terminal de HGF humano (aminoácidos 506-728); y quimera n.° 3 que comprende una parte N-terminal de HGF humano (aminoácidos 32-582) y una parte C-terminal de HGF de ratón (aminoácidos 583-728).

Una representación esquemática de las proteínas de fusión se muestra en la figura 10. El dominio N-terminal de HGF contiene cuatro dominios kringle, representados por cuadrados marcados K1-K4. El dominio C-terminal de HGF comparte homología con serina proteasas. Este dominio se representa mediante barras. Los cuadrados abiertos y las barras continuas indican secuencias de HGF humano. Los cuadrados sombreados y las barras rayadas indican secuencias de ratón.

Se expresaron de manera transitoria las proteínas de fusión individuales en células 293T transfectando por separado las células con uno de los vectores de expresión de proteína de fusión individual usando Lipofectamine (Gibco BRL, Carlsbad, CA, n.° de catálogo18324) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Aproximadamente 48 horas tras la transfección, se recogieron y se sometieron a ensayo los medios condicionados.

En muestras separadas, se incubaron por separado cinco de los diez anticuerpos frente a HGF descritos en el ejemplo 6 (los derivados en última instancia de los hibridomas 2.4.4, 1.74.1, 1.75.1, 3.10.1 y 2.12.1) con proteínas de fusión que comprendían cada uno de las siguientes proteínas diana: HGF humano de longitud completa, HGF d5 y

HGF de ratón. Tras la incubación, se capturaron por separado las proteínas de fusión en cada muestra usando perlas recubiertas con biotina (Spherotech Inc., Libertyville, IL, n.° de catálogo TP-60-5). Se marcaron los complejos de perla-proteína resultantes añadiendo anticuerpo anti-avidina marcado con FITC (Vector Lab, Burlingame, CA, n.° de catálogo SP-2040). Se determinó la presencia de anticuerpos frente a HGF añadiendo anticuerpo de cabra anti-F(ab')2 humano marcado con ficoeritrina (PE) (Southern Biotech Associates, Inc., Birmingham, AL, n.° de catálogo 2043-09).

Se sometieron entonces esas muestras a análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se detectaron complejos de perlas marcados mediante FITC (que indicaban la presencia de avidina) y/o PE (que indicaban la presencia de anticuerpo frente a HGF) en un instrumento FACScan de Becton Dickinson Bioscience (BD, Franklin Lakes, NJ). En la figura 8 se presentan representaciones de dispersión de FACS para los cinco anticuerpos frente a HGF sometidos a prueba.

En muestras separadas, se incubaron por separado dos de los diez anticuerpos frente a HGF descritos en el ejemplo 6 (los derivados en última instancia de los hibridomas 2.12.1 y 2.4.4) con proteínas de fusión que comprenden cada una de las siguientes proteínas diana: HGF humano de longitud completa, HGF d5 y HGF de ratón, quimera n.° 1, quimera n.° 2 y quimera n.° 3. Se sometieron esas muestras a análisis de FACS tal como se describió anteriormente.

Los resultados de esos experimentos de unión se resumen en la figura 10A, a la derecha del diagrama esquemático. Ni el anticuerpo 2.12.1 ni el 2.4.4 se unieron a la quimera n.° 1. Tanto el anticuerpo 2.12.1 como el anticuerpo 2.4.4 se unieron a la quimera n.° 2. El anticuerpo 2.4.4 se unió a la quimera n.° 3. El anticuerpo 2.12.1 no se unió a la quimera n.° 3.

D. Mapeo de epítopos adicional usando proteínas de fusión

Para proporcionar información adicional sobre el/los epítopo(s) de HGF al/a los que se une(n) los anticuerpos 2.4.4 y 2.12.1, se construyeron y sometieron a ensayo quimeras de ser humano/ratón adicionales tal como se describió anteriormente en el ejemplo 8C (figura 10B). Los cebadores usados para generar las quimeras se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Oligonucleótidos usados para generar quimeras de HGF de ser humano/ratón y mutantes puntuales, inserciones y deleciones

SEQ ID NO.	Oligo. n.°	Secuencia	n	Constructo	Puntos de ruptura o mutación
124	3201-76	ATG CGT CTC CCT TGA TGA TGC TGG CTG CAT TTC	33	Mutante punt.	hHGFR647Q
125	3201-75	ATG CGT CTC TCA AGG GAA GGT GAC TCT GAA TGA	33	Mutante punt.	hHGFR647Q
126	3201-72	ATG CGT CTC TAA CTA GGT AAA TCA ATC GTA CTA ACA	36	Mutante punt.	hHGFN601S
127	3201-71	ATG CGT CTC TAG TTA TGG ATG CAC AAT TCC TGA AA	35	Mutante punt.	hHGFN601S
128	3201-70	ATG CGT CTC AAT TAT CCA GGA CAG CAG GCC TG	32	Mutante punt.	hHGFD592N
129	3201-69	ATG CGT CTC ATA ATT TTG TTA GTA CGA TTG ATT TAC	37	Mutante punt.	hHGFD592N
130	3201-68	ATG CGT CTC GCG TTT CTC ATC TCC TCT TCC GT	32	Mutante punt.	hHGFC561R
131	3201-67	ATG CGT CTC AAA CGC AAA CAG GTT CTC AAT GTT T	34	Mutante punt.	hHGFC561R
132	3201-66	ATG CGT CTC CTT TCG TGG ACA TCA TGA ATT CCA A	34	Mutante punt.	hHGFG555E
133	3201-65	ATG CGT CTC CGA AAG AGG AGA TGA GAA ATG CAA A	34	Mutante punt.	hHGFG555E
134	3201-64	GAG CAG CTG CTA GCA AGC TTG CTA	24	sitio de restricción	hHGF n-terminal + NotI
135	3167-41	ATG CGT CTC AGA GAC TTG AAA GAC TAT GAA GCT TG	35	deleción	deleción de mHGF DK
136	3167-42	ATG CGT CTC GTC TCT GGC TGG AAA ACA TTG TCT T	34	deleción	deleción de mHGF DK
137	3167-44	ATG CGT CTC AAC AAA GAC TTG AAA GAT TAT GAA GCT TG	38	inserción	inserción de hHGF DK
138	3167-43	ATG CGT CTC TTT GTT TCG AGA AGG GAA ACA CTG TCG	36	inserción	inserción de hHGF DK

139	3167-37	ATG CGT CTC AAG CTT GCC AGG CCT GCT GT	29	quimera 9	aa586-3' de hHGF
140	3167-40	ATG CGT CTC AAG CTT CAG TAA AAC CAA GTC TGA	33	quimera 9	5'-aa585 de mHGF
141	3167-38	ATG CGT CTC AAG CTT GCT CGA CCT GCA ATC	30	quimera 8	aa586-3' de mHGF
142	3167-39	ATG CGT CTC AAG CTT CAT TAA AAC CAG ATC TGA	33	quimera 8	5'-aa585 de hHGF
143	3167-37	ATG CGT CTC AAG CTT GCC AGG CCT GCT GT	29	quimera 7	aa586-3' de hHGF
144	3167-40	ATG CGT CTC AAG CTT CAG TAA AAC CAA GTC TGA	33	quimera 7	5'-aa585 de mHGF
145	3167-38	ATG CGT CTC AAG CTT GCT CGA CCT GCA ATC	30	quimera 3	aa586-3' de mHGF
146	3167-39	ATG CGT CTC AAG CTT CAT TAA AAC CAG ATC TGA	33	quimera 3	5'-aa585 de hHGF
147	3167-35	ATG CGT CTC TAG GAT GGA TGG TTA GTT TGA GAT	33	quimera 2	aa507-3' de hHGF
148	3167-36	ATG CGT CTC ATC CTA CTG TTG TTT GTG TTG GAA T	34	quimera 2	5'-aa506 de mHGF
149	3144-31	ATG CGT CTC TAG GAT GGA TGG TTA GTT TGA AAT A	34	quimera 1	aa507-3' de mHGF
150	3080-16	ATG CGT CTC ATC CTA TCT TTG TTC GTG TTG G	31	quimera 1	5'-aa506 de hHGF
151	3080-04	ATG CGT CTC ATG CAT CCA AGG TCA AGG AGA AG	32	quimera 6	aa307-3' de hHGF
152	3144-28	ATG CGT CTC ATG CAT TCA GTT GTT TCC ATA GG	32	quimera 6	5'-aa306 de mHGF
153	3079-84	ATG CGT CTC ATG CAT GAC CTG CAA TGG GGA G	31	quimera 5	aa213-3' de hHGF
154	3144-27	ATG CGT CTC ATG CAT TCA ACT TCT GAA. CAC TGA	33	quimera 5	5'-aa212 de mHGF
155	3079-77	ATG CGT CTC ATG CAT CAT TGG TAA AGG ACG C	31	quimera 4	aa129-3' de hHGF
156	3079-78	ATG CGT CTC ATG CAG TTT CTA ATA TAG TCT TTG TTT TC	38	quimera 4	5'-aa128 de mHGF
157	3079-83	ATG GGA TCC CTA TGA CTG TGG TAC CTT ATA TG	32	sitio de restricción	c-terminal de hHGF + BamHI
158	2870-60	ATG CGG CCG CAC AAA GGA AAA GAA GAA ATA CAA TTC	36	sitio de restricción	n-terminal de hHGF + NotI
159	3013-96	CGG GAT CCT TAC AAC TTG TAT GTC AAA ATT AC	32	sitio de restricción	c-terminal de mHGF + BamHI
160	3013-95	ATG ATG GCG GCC GCT CAG AAG AAA AGA AGA AAT ACA CTT C	40	sitio de restricción	n- terminal de mHGF + NotI

La figura 10B muestra dibujos esquemáticos de las moléculas quiméricas de HGF humano y de ratón creadas para el estudio, indicándose el comportamiento de unión de los anticuerpos 2.12.1 y 2.4.4 frente a cada quimera a la derecha de la figura. Las quimeras n.ºs 1 -3 en este estudio fueron idénticas a las quimeras n.ºs 1-3 descritas en el ejemplo 8C y en la figura 10A. Las quimeras n.ºs 4-6 incorporaron cantidades crecientes del extremo N-terminal de HGF de ratón en una molécula de HGF por lo demás enteramente humana. La quimera n.°7 utilizó los aminoácidos 507-585 de HGF de ratón en una molécula de HGF por lo demás humana, y la quimera n.° 8 utilizó los aminoácidos 507-585 de HGF humano en una molécula de HGF por lo demás de ratón. La quimera n.° 9 se construyó a partir de los aminoácidos 1-585 de HGF de ratón y los aminoácidos 586-731 de HGF humano.

Se sometió a ensayo la unión de los anticuerpos 2.4.4 y 2.12.1 a las proteínas quiméricas tal como se describió en el ejemplo 8C. Tras la incubación de o bien el anticuerpo 2.4.4 o bien el anticuerpo 2.12.1 con una de las proteínas de fusión, se capturaron por separado las proteínas de fusión en cada muestra usando perlas recubiertas con biotina (Spherotech Inc., Libertyville, IL, n.° de catálogo TP-60-5). Se marcaron los complejos de perla-proteína resultantes añadiendo anticuerpo anti-avidina marcado con FITC (Vector Lab, Burlingame, CA, n.° de catálogo SP-2040). Se determinó la presencia de anticuerpos frente a HGF añadiendo anticuerpo de cabra anti-F(ab')2 humano marcado con ficoeritrina (PE) (Southern Biotech Associates, Inc., Birmingham, AL, n.° de catálogo 2043-09). Se sometieron entonces esas muestras a análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se detectaron complejos de perlas marcados mediante FITC (que indicaban la presencia de avidina) y/o PE (que indicaban la

presencia de anticuerpo frente a HGF) en un instrumento FACScan de Becton Dickinson Bioscience (BD, Franklin Lakes, NJ). En algunos casos, tras la normalización de la expresión usando FITC, se realizó análisis de FACS de color único siguiendo la unión del anticuerpo mediante el marcador de PE. Este método aumentó la sensibilidad del ensayo y ayudó a la medición de la unión con constructos que no se expresaban a niveles muy altos.

Tal como se muestra en la figura 10B, ambos anticuerpos 2.4.4 y 2.12.1 se unen a la quimera n.° 8 (figura 10B), que contiene los aminoácidos 507-585 de HGF humano. Estos resultados sugirieron que esa región contiene residuos implicados directa o indirectamente en la unión del anticuerpo 2.4.4 y 2.12.1 a HGF. Las quimeras que contenían la secuencia de ratón en esta misma región 507-585 (quimeras 7 y 9) no se unieron a los anticuerpos 2.12.1 ó 2.4.4. La quimera 3 no se unió al anticuerpo 2.12.1 pero se unió al anticuerpo 2.4.4, pese a la presencia de los aminoácidos 507-585 de HGF humano.

Para obtener información adicional sobre los aminoácidos 507-585 de HGF humano (GWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR--DLKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLM (SEQ ID NO: 123) (véase la figura 10D)), se crearon HGF mutantes que contenían mutaciones puntuales específicas que cambiaban el residuo humano por el residuo de ratón dentro de la región de los aminoácidos 507-585 (figura 10C), usando los cebadores expuestos en la tabla 10. Se construyeron proteínas de fusión HGF humano-avidina que contenían cinco cambios de aminoácidos individuales, no conservativos, desde la secuencia de HGF humano hasta la secuencia de HGF de ratón (n.° de registro de Genbank NM_000601 y NM_010427, respectivamente). También se crearon dos constructos adicionales, conteniendo uno una inserción de dos aminoácidos en la secuencia de HGF humano, y conteniendo el otro una deleción de dos aminoácidos de la secuencia de ratón (figura 10C).

Estos constructos se expresaron y se sometieron a análisis de unión tal como se describió en los ejemplos 8C y 8D. Tras la incubación de o bien el anticuerpo 2.4.4 o bien el anticuerpo 2.12.1 con una de las proteínas mutadas, se capturaron por separado las proteínas mutadas en cada muestra usando perlas recubiertas con biotina (Spherotech Inc., Libertyville, IL, n.° de catálogo TP-60-5). Se marcaron los complejos de perla-proteína resultantes añadiendo anticuerpo anti-avidina marcado con FITC (Vector Lab, Burlingame, CA, n.° de catálogo SP-2040). Se determinó la presencia de anticuerpos frente a HGF añadiendo anticuerpo de cabra anti-F(ab')2 humano marcado con ficoeritrina (PE) (Southern Biotech Associates, Inc., Birmingham, AL, n.° de catálogo 2043-09). Se sometieron entonces esas muestras a análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se detectaron complejos de perlas marcados mediante FITC (que indicaban la presencia de avidina) y/o PE (que indicaban la presencia de anticuerpo frente a HGF) en un instrumento FACScan de Becton Dickinson Bioscience (BD, Franklin Lakes, NJ). En algunos casos, tras la normalización de la expresión usando FITC, se realizó análisis de FACS de color único siguiendo la unión del anticuerpo mediante el marcador de PE. Este método aumentó la sensibilidad del ensayo y ayudó a la medición de la unión con constructos que no se expresaban a niveles muy altos.

Se encontró que las mutaciones en el aminoácido 561, pero no en los aminoácidos 592, 601 ó 647, alteraban la unión entre el HGF humano mutado y el anticuerpo 2.12.1 así como entre el HGF humano mutado y el anticuerpo 2.4.4. La mutación en el aminoácido 555 alteró la unión del anticuerpo 2.12.1, pero no interfirió con la unión del anticuerpo 2.4.4. La inserción de los dos aminoácidos 540N y 541K de ratón, no presentes en la secuencia humana (véase la figura 10D), alteró la unión a cualquier anticuerpo. La deleción de esos dos aminoácidos de la secuencia de HGF de ratón, no dio como resultado la unión de cualquier anticuerpo al HGF de ratón.

E. Mapeo de epítopos mediante ensayos de protección frente a proteasa

También se realizaron ensayos de protección frente a proteasa clásicos complementarios para identificar los epítopos de HGF unidos mediante el anticuerpo 2.12.1. Véase Yi y Skalka, Mapping Epitopes of Monoclonal Antibodies Against HIV-1 Integrase with Limited Proteolysis and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, Biopolimers (Peptide Science) 55: 308-318 (2000). Se mezcló HGF humano (30 ug/10 ul) con anticuerpo 2.12.1 (40 μg/4 ul) en 200 ul de tampón Tris 0,1 M, pH 7,5 y se incubó en hielo durante 30 minutos. Se llevó a cabo digestión con tripsina (1 μg) a 37°C durante 1 hora. Se sometió el material digerido a HPLC de fase inversa para la separación de péptidos. Se llevó a cabo en paralelo una digestión con tripsina similar de HGF humano solo, sin anticuerpo 2.12.1. Se ejecutó la columna de HPLC (Vydac C18, 2,1 x 150 mm, Vydac Inc., Hesperia CA) en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% con un gradiente de elución del 2-35% de acetonitrilo en TFA al 0,1%. Se registró el trazado UV de los péptidos que eluían mediante un dispositivo de HPLC HP 1090 (Hewlett Packard, Palo Alto). Se compararon los dos mapas de HPLC para investigar los péptidos que estaban protegidos mediante la unión al anticuerpo 2.12.1 (figura 11 A).

Se realizaron la secuenciación N-terminal y la espectrometría de masas posteriores para identificar los péptidos protegidos específicos. Se realizó la secuenciación peptídica N-terminal mediante degradación de Edman en un secuenciador de proteínas ABI-Procise (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se identificaron los aminoácidos en cada ciclo mediante el tiempo de retención en el dispositivo de HPLC acoplado y la comparación con patrones de aminoácidos. Se realizó la espectrometría de masas de los fragmentos protegidos en un espectrómetro de masas Perceptive Voyager (Applied Biosystems, Framingham, MA). Se realizó desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI) usando la matriz ácido 4-hidroxicianocinámico (HCCA) o ácido sinápico. Se determinaron los pesos moleculares mediante calibración en relación con patrones conocidos (cadena beta de insulina oxidada y citocromo

c).

La subunidad α de HGF humano abarca los aminoácidos 32-494 y la subunidad β abarca los aminoácidos 495-728 (véase la entrada P14210 de Swiss-Prot para HGF humano). El anticuerpo 2.12.1 que se une a HGF humano protegió dos picos, T33 y T38.6 (figura 11A). El pico T38.6 contenía dos péptidos, correspondiendo ambos a las secuencias en o cerca del comienzo de la subunidad β de HGF maduro (véase la figura 10D, comenzando la secuencia en el texto en negrita, subrayado (VVNGIPTRTN (SEQ ID NO: 172)) y la figura 11C). T33 se derivó de la subunidad α (figura 11C). Basándose en la espectrometría de masas, se midió que las masas observadas de los dos péptidos en el pico T38.6 eran 7165 y 6840 Daltons, respectivamente. Basándose en los posibles sitios de escisión de tripsina presentes en la secuencia de HGF (véase, por ejemplo, el residuo de arginina en negrita, subrayado, en el aminoácido 559 de HGF humano en la figura 10D), se predice que el residuo de arginina número 559 define el extremo C-terminal de los péptidos protegidos.

También se diseñó otro experimento complementario para investigar péptidos que se unen a anticuerpos. Se digirió la mezcla de HGF y anticuerpo 2.12.1, tal como se describió anteriormente, con tripsina durante una hora y entonces se sometió a filtración mediante Microcon® 10 (Millipore Corp., Bedford, MA) para eliminar los péptidos no unidos. Se esperaba que los péptidos unidos quedaran capturados por la membrana junto con el anticuerpo 2.12.1. Se añadió HGF humano intacto (15 µg) a la mezcla de péptido-anticuerpo 2.12.1 para eluir el/los péptido(s) unido(s) del complejo. Se incubó la muestra durante la noche a 4°C y se sometió de nuevo a filtración mediante Microcon® 10 para separar el HGF-péptidos eluidos del anticuerpo y el HGF intacto. Se analizaron ambas muestras (péptidos unidos y no unidos) mediante HPLC de fase inversa (figura 11B).

Se aislaron los péptidos unidos mediante HPLC y se sometieron a secuenciación N-terminal y espectrometría de masas tal como se describió anteriormente.

Cuando se usó HGF para eluir los péptidos unidos, se observó que eluía un gran pico de péptidos (T48 en la figura 11B) del complejo anticuerpo-HGF y se identificó mediante secuenciación peptídica N-terminal que contenía las mismas dos secuencias de subunidad β que las encontradas en T38.6, anteriormente. El tamaño del/de los péptido(s) en el pico T48 fue heterogéneo basándose en la espectrometría de masas y por tanto no pudo predecirse un extremo C-terminal preciso a partir de estos datos. Otros tres picos (marcados con # en la figura 11B) o bien no contenían péptido o bien un péptido de origen desconocido, no relacionado con HGF.

Juntos, estos dos experimentos indicaron que la región N-terminal de la subunidad beta de HGF forma parte del epítopo para el anticuerpo 2.12.1. Estos datos complementan los datos en el ejemplo 8D, donde se encontró que los epítopos implicados en la unión estaban ubicados dentro de los aminoácidos 507-585 de HGF humano. El análisis mutacional y las masas moleculares de los péptidos protegidos muestran que el epítopo de unión a anticuerpo de HGF humano está ubicado dentro de los aminoácidos 495-556 de HGF humano.

F. Unión de competencia de anticuerpos

Se marcaron con FITC anticuerpos frente a HGF descritos en el ejemplo 6 derivados en última instancia del hibridoma 2.4.4 (anticuerpo 2.4.4) y anticuerpos frente a HGF derivados en última instancia del hibridoma 2.12.1 (anticuerpo 2.12.1) para su uso en ensayos de competencia tal como sigue. Se dializaron por separado anticuerpos 2.4.4 y 2.12.1 en PBS pH 8,5. Se añadió marcador de FITC (isómeros mixtos de éster succinimidílico de ácido [6-fluorescein-5-(y-6)-carboxamido]hexanoico (5(6)-SFX)) (Molecular Probes. n.° de catálogo F-2181) a cada uno de los dos anticuerpos dializados a una razón molar 5:1 (marcador:anticuerpo) de una disolución madre de marcador FITC a 5 mg/ml en DMSO. Se incubaron esas mezclas a temperatura ambiente (20-22°C) durante la noche en la oscuridad. Entonces se procesaron las mezclas por separado a través de columnas Pharmacia PD-10 (Amersham, Piscataway, NJ) que se habían equilibrado con PBS. Se leyeron las preparaciones resultantes en un espectrofotómetro a 280 nM y 495 nM. Se calcularon las concentraciones de anticuerpo de esas preparaciones usando absorbancia a 280 nm. Se calculó la razón de anticuerpo marcado con respecto a anticuerpo no marcado usando la siguiente fórmula:

$$\frac{Ax}{E} X \frac{PM\ de\ anticuerpo}{mg\ de\ anticuerpo/ml} = \frac{mol\ de\ anticuerpo\ marcado}{mol\ de\ anticuerpo\ no\ marcado}$$

donde Ax = absorbancia de marcador a 495 nm, y E = coeficiente de extinción del marcador = 77500. Normalmente, el anticuerpo se marcó aproximadamente 3:1 (anticuerpo marcado con FITC:anticuerpo no marcado).

Se evaluó la capacidad de cada uno de los dos anticuerpos marcados para competir por la unión con cada uno de los otros nueve anticuerpos frente a HGF. Se incubó con HGF por separado cada uno de los dos anticuerpos frente a HGF marcados y también se incubó con HGF por separado cada uno de los dos anticuerpos frente a HGF marcados en presencia de un exceso molar de 50 veces de uno de los otros nueve anticuerpos frente a HGF que no se habían marcado. Por tanto, en nueve muestras separadas, se incubó con HGF por separado el anticuerpo 2.4.4 marcado junto con cada uno de los otros nueve anticuerpos frente a HGF que no se habían marcado. Asimismo, en nueve muestras separadas, se incubó por separado el anticuerpo 2.12.1 marcado con HGF junto con cada uno de

los otros nueve anticuerpos frente a HGF que no se habían marcado. También se repitió cada una de esas combinaciones usando la variante de corte y empalme d5 de HGF en lugar de HGF de longitud completa.

El control de competencia positivo para esos ensayos de competencia fue incubar cada anticuerpo marcada con un exceso molar de 50 veces del mismo anticuerpo que no estaba marcado. Por tanto, se incubó el anticuerpo 2.12.1 marcado con FITC en presencia de, y por separado en ausencia de, un exceso molar de 50 veces de anticuerpo 2.12.1 no marcado. Asimismo, se incubó el anticuerpo 2.4.4 marcado con FITC en presencia de, y en ausencia de, un exceso molar de 50 veces de anticuerpo 2.4.4 no marcado. Tal como se esperaba, las señales de fluorescencia de las muestras en presencia de un exceso molar de 50 veces de los anticuerpos marcados fueron significativamente inferiores que las señales de fluorescencia de las muestras en las que no se añadieron anticuerpos no marcados.

En la figura 12 se proporcionan perfiles de unión. Las figuras 12A y 12B muestran experimentos usando el anticuerpo 2.12.1 marcado. Explicación para las curvas en todos los paneles de 12A y 12B: A: control negativo (anticuerpo 2.12.1 marcado con FITC sin HGF); B: control positivo (anticuerpo 2.12.1 marcado con FITC con HGF); C: anticuerpo 1.74.1; D: anticuerpo 1.75.1; E: anticuerpo 1.29.1; F: anticuerpo 3.10.1; G: anticuerpo 1.61.3; H: anticuerpo 1.24.1; I: anticuerpo 1.60.1; J: anticuerpo 2.40.1; K: anticuerpo 2.12.1; L: anticuerpo 2.4.4. La figura 12A muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva usando el anticuerpo 2.12.1 fluorescente con la proteína diana variante de corte y empalme de HGF d5. La figura 12B muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva usando el anticuerpo 2.12.1 fluorescente con la proteína diana HGF de longitud completa. Las figuras 12C y 12D muestran experimentos usando el anticuerpo 2.4.4 marcado. Explicación para las curvas en todos los paneles de 12C y 12D: A: control negativo (anticuerpo 2.4.4 marcado con FITC sin HGF); B: control positivo (anticuerpo 2.4.4 marcado con FITC con HGF); C: anticuerpo 1.74.1; D: anticuerpo 1.75.1; E: anticuerpo 1.29.1; F: anticuerpo 3.10.1; G: anticuerpo 1.61.3; H: anticuerpo 1.24.1; I: anticuerpo 1.60.1; J: anticuerpo 2.40.1; K: anticuerpo 2.12.1; L: anticuerpo 2.4.4. La figura 12C muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva usando el anticuerpo 2.4.4 fluorescente con la proteína diana variante de corte y empalme de HGF d5. La figura 12D muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva usando el anticuerpo 2.4.4 fluorescente con la proteína diana HGF de longitud completa.

Los datos indican que cada uno de los diez anticuerpos frente a HGF compite con cada uno de los dos anticuerpos marcados para unirse a HGF de longitud completa o d5. Algunos de los anticuerpos mostraron competencia completa con el anticuerpo marcado, (por ejemplo los anticuerpos 2.12.1, 1.24.1 y 2.4.4 compiten completamente con el anticuerpo 2.12.1 marcado con FITC, figuras 12A y 12B, picos H, K y L, respectivamente). Otros anticuerpos sólo compiten parcialmente por la unión (por ejemplo los anticuerpos 2.12.1, 2.40.1 y 1.61.3 compiten parcialmente con 2.4.4 marcado con FITC, figuras 12C y 12D, picos K, J y G, respectivamente).

Ejemplo 9

Ensayos ELISA de neutralización

Se desarrolló un ensayo ELISA de neutralización para evaluar si los anticuerpos comentados en el ejemplo 6 podrían interrumpir la unión de Met-HGF. Se recubrieron placas Delphia de 96 pocillos (n.° de catálogo: AAAND-0001, Wallac Inc., Gaithersburg, MD) con HGF mediante la adición de 100 µl de HGF a 6,25 µg/ml por pocillo. Se incubaron las placas a 37°C durante 1 hora o a 4°C durante la noche. Entonces se bloquearon las placas con BSA al 5% (n.° de catálogo 50-61-00, KPL, Gaithersburg, MD) en PBS que contenía Tween 20 al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

Se prepararon muestras de prueba mezclando por separado Met soluble (2 nM, 0,256 µg/ml) con diferentes concentraciones de un anticuerpo particular frente a HGF que estaba sometiéndose a prueba. Las concentraciones sometidas a prueba fueron: 667 nM, 223 nM, 74,1 nM, 24,7 nM, 8,2 nM, 2,7 nM, 0,91 nM, 0,30 nM, 0,10 nM y 0,034 nM. Se añadió un volumen de 100 µl de una muestra de prueba a cada pocillo de las placas. Entonces se incubaron las placas a 4°C durante la noche y luego se lavaron 4 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%. A continuación, se añadieron 100 µl por pocillo de anticuerpo anti-cMetR biotinilado (n.° de catálogo: BAF358, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) a 2 µg/ml. Este anticuerpo se une a los complejos de Met-HGF en la placa, pero no se une al anticuerpo anti-HGF unido al HGF en la placa. Entonces se incubaron las placas durante 2 horas con agitación y se lavaron 4 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%. Se añadió Eu-estreptavidina (dilución 1:1000 en tampón de ensayo) (n.° de catálogo 1244-360, Wallac Inc., Gaithersburg, MD) y se agitaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Entonces se lavaron las placas 4 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%. A continuación, se añadieron 100 µl de tampón de potenciación (Wallac Inc., n.° de catálogo: 1244-105, Gaithersburg, MD). Tras al menos 5 minutos, se leyeron las placas usando el método de Europio en el instrumento Victor 2 (1420 Multilabel Counter, Wallac Inc., Gaithersburg, MD).

Se calculó la inhibición en porcentaje de la unión de Met a HGF (es decir, la neutralización) y se determinaron los valores de CI_{50} usando la ecuación de ajuste de 4 parámetros Excelfit, Versión 2.0.6, (Microsoft Inc., Seattle, WA). En presencia de los anticuerpos frente a HGF comentados en el ejemplo 6, se neutralizó la unión de Met a HGF. En la figura 13 se muestran los datos para los dos experimentos.

Ejemplo 10

Neutralización en células

A. fosforilación de Met

HGF induce la fosforilación de Met en células PC-3 (ATCC, Manassas, VA n.º CRL 1435). Se hicieron crecer células PC-3 en placas de cultivo tisular Falcon de 96 pocillos (VWR, San Diego, CA, n.º de catálogo 62740-081) añadiendo $1x10^4$ células PC-3 por pocillo en 100 µl de RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, n.º de catálogo 11875-093) que contenía suero bovino fetal al 5% (Hyclone, Logan, UT, n.º de catálogo SH 30070,03) y 1x penicilina, estreptomicina, glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA, n.º de catálogo 10378-016). Tras 24 horas de crecimiento a 37ºC bajo el 5% de CO_2 se aclararon las células una vez con DMEM con bajo contenido en glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA, n.º de catálogo11885-084) que contenía albúmina sérica bovina al 0,1% (Sigma, Louis, MO, n.º de catálogo A-3156) y se incubaron durante de 18 a 20 horas con 100 µl de medio DMEM con bajo contenido en glucosa que contenían albúmina sérica bovina al 0,1% (Sigma, Louis, MO, n.º de catálogo A-3156).

Se prepararon por separado ocho diluciones diferentes de cada uno de los diez anticuerpos frente a HGF del ejemplo 6 mediante dilución en serie en los medios (DMEM con bajo contenido en glucosa con albúmina sérica bovina al 0,1%) que contenían HGF 200 ng/ml. Las concentraciones de los anticuerpos frente a HGF en las diluciones separadas fueron: 200 nM, 67 nM, 22 nM, 7 nM, 2,5 nM, 1 nM, 0,3 nM y 0,1 nM de un anticuerpo particular frente a HGF. Se incubaron esas diluciones de anticuerpo/HGF durante 30 minutos a 37ºC.

Se aclararon las células PC-3 una vez con 100 µl de DMEM con bajo contenido en glucosa que contenía albúmina sérica bovina al 0,1%. Entonces, se añadieron por separado 100 µl de cada una de las diluciones de anticuerpo/HGF a pocillos separados de células PC-3. Tras la incubación durante 10 minutos a 37ºC bajo un 5% de CO_2, se aspiraron las diluciones de anticuerpo/HGF de los pocillos y se colocaron las placas en hielo durante 1-2 minutos. Se aclararon las células una vez con 100 µl de PBS helado que contenía ortovanadato de sodio 0,3 mM (Sigma, Louis, MO, n.º de catálogoS-6508). Se incubaron las células lavadas durante 15-30 minutos en hielo en 60 µl de tampón de lisis que contenía Triton X-100 al 1% (Pierce, Rockford, IL, n.º de catálogo 28314), Tris 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, ortovanadato de sodio 0,3 mM (Sigma, Louis, MO, n.º de catálogo S-6508) y 1X cóctel inhibidor de proteasas (Sigma n.º de catálogo P-8340).

Se prepararon perlas recubiertas con anticuerpo anti-Met incubando Dynabeads M-280 Streptavidin (IGEN International, Gaithersburgh, MD, n.º de catálogo110029) con 4 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-Met-biotina (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, n.º de catálogo BAF 358) durante 30 minutos a temperatura ambiente en PBS que contenía albúmina sérica bovina al 1% (Sigma, St. Louis, MO, n.º de catálogo A-7888), Tween 20 al 0,1% (Biorad, Hercules, CA, n.º de catálogo 170-6531). Se colocó un volumen de 25 µl de perlas recubiertas con anticuerpo anti-Met por pocillo en placas de ensayo Costar de 96 pocillos (Corning, NY, n.º de catálogo 3365).

Se añadió por separado un volumen de 25 µl de cada uno de los diferentes lisados de células PC-3 a cada pocillo que contenía perlas recubiertas con anticuerpo anti-Met. Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se añadió un volumen de 12,5 µl de PBS que contenía albúmina sérica bovina al 1% (Sigma, Louis, MO, n.º de catálogo A-7888), Tween 20 al 0,1% (Biorad, Hercules, CA, n.º de catálogo 170-6531) y 0,04 µg del anticuerpo 4G10 anti-fosfotirosina (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, n.º de catálogo 05-321) por pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se añadió un volumen de 12,5 µl de PBS que contenía albúmina sérica bovina al 1%, Tween 20 al 0,1% y 8 µg/ml de anticuerpo anti-ORI-TAG-marcador de ratón (IGEN International, Gaithersburgh, MD, n.º de catálogo 110087) y se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se determinó la señal (expresada en recuentos de IGEN) en el lector IGEN M8 (IGEN International, Gaithersburgh, MD). Se calcularon los valores de CI_{50} usando la ecuación de ajuste de cuatro parámetros y el paquete de software Excelfit, versión 2.0.6, (Microsoft Inc., Seattle WA). En la figura 14 se muestran los datos para dos experimentos usando el formato de IGEN. Para cada uno de los diez de los anticuerpos frente a HGF, los valores de CI_{50} estuvieron en el intervalo de nanomolar bajo a subnanomolar.

B. Neutralización del crecimiento/supervivencia de U-87 MG

Las células U-87 MG (ATCC n.º HTB-14) son una línea de glioblastoma humano que expresa tanto Met como HGF. El crecimiento/supervivencia de esas células en cultivo no está potenciado por HGF exógeno. Sin embargo, Met endógena parece activarse por HGF endógeno en condiciones de crecimiento. La alteración de la unión de HGF endógeno a Met endógena puede dar como resultado disminución del crecimiento y/o supervivencia.

Se hicieron crecer células U-87 MG en placas de ensayo Costar de 96 pocillos (Corning, NY, n.º de catálogo 3365) añadiendo 800 células por pocillo en medio IMEM (Gibco BRL, Rockville, MD, n.º de catálogo 11125-028) que contenía FBS al 5%. Tras aproximadamente 24 horas, se añadió cada una de once concentraciones diferentes de cada uno de los diez anticuerpos frente a HGF del ejemplo 6 a pocillos separados de células U-87 MG. Las concentraciones de los anticuerpos frente a HGF en las diluciones separadas fueron: 100 µg/ml, 33,3 µg/ml, 11,1 µg/ml, 3,7 µg/ml, 1,2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,14 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,015 µg/ml, 5,1 ng/ml y 1,7 ng/ml de un anticuerpo particular frente a HGF.

Siete días tras la adición de los anticuerpos frente a HGF, se retiraron los medios de las placas y se fijaron las células con 100 µl de ácido tricloroacético al 10% (Sigma Inc., St Louis, MO n.º de catálogo: T-9159) por pocillo y se incubaron a 4ºC durante 1-2 horas. Se aclararon los pocillos 5 veces con agua del grifo. Se tiñeron las células fijadas con 100 µl de sulforrodamina B al 0,4% (Sigma, St Louis, MO n.º de catálogo: S-9012) en ácido acético al 1% (Fisher, Pittsburgh, PA n.º de catálogo: UN2789) mediante una incubación de diez minutos a temperatura ambiente. Tras la tinción, se lavaron las células 5 veces con ácido acético al 1% y se secaron al aire. Se leyó la densidad óptica de las placas a 540 nm en un lector de placas de microtitulación (SpectraMax PLUS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La densidad óptica es proporcional a la cantidad total de proteína presente en la monocapa de células, y por tanto es una medida de la supervivencia/proliferación celular a lo largo del periodo de ensayo de 7 días. Para calcular los valores de CI_{50}, se calculó la inhibición en porcentaje en comparación con las células incubadas con un anticuerpo control de isotipo o sin anticuerpo. Se calcularon los valores de CI_{50} usando la ecuación de ajuste de cuatro parámetros y el paquete de software Excelfit, versión 2.0.6, (Microsoft Inc., Seattle WA).

En la figura 15 se muestran los datos para dos experimentos. Los diez anticuerpos frente a HGF descritos en el ejemplo 6 inhibían el crecimiento/supervivencia de las células U-87 MG. Los valores de CI_{50} de cada uno de los anticuerpos fueron normalmente inferiores a 100 nM.

Ejemplo 11

Neutralización en tumores por xenoinjerto

A. Modelo de enfermedad residual mínima por xenoinjerto de U-87 MG

Se hicieron crecer células U-87 MG hasta casi la confluencia y entonces se suspendieron en medio libre de suero a una concentración de $25x10^6$ células/ml. Se evaluó visualmente que las células eran >98,5% viables, tal como se determinó mediante exclusión de azul trípano. Para someter a prueba un anticuerpo individual frente a HGF, se inyectaron $5x10^6$ células U-87 MG en medios libres de suero por vía subcutánea en el costado derecho de cincuenta ratones atímicos hembra (CD1 Nu/Nu, Charles River Laboratories, Wilmington, Mass.). Se colocaron los cincuenta ratones en cinco grupos de diez ratones cada uno.

Se trató cada ratón dentro de un grupo particular de diez ratones mediante inyección intraperitoneal con la misma dosis del mismo anticuerpo frente a HGF comentado en el ejemplo 7, o con la región constante de IgG1 (control de isotipo). Las dosis de anticuerpo sometidas a prueba fueron: 1 µg, 3 µg, 10 µg y 30 µg por inyección. Las inyecciones de anticuerpo se realizaron dos veces por semana durante cuatro semanas, comenzando en el día 2 tras la inyección de las células U-87 MG. Se registraron las mediciones tumorales y los pesos corporales dos veces por semana durante 30 días y se calcularon los volúmenes tumorales usando la fórmula: longitud x anchura x altura. Se analizaron los resultados con el programa estadístico StatView® (SAS Institute, Inc., Cary, N.C.) usando ANOVA de medidas repetidas, seguido por la prueba de comparaciones múltiples a posteriores de Scheffe.

En experimentos separados, se sometió a prueba cada uno de los diez anticuerpos frente a HGF comentados en el ejemplo 6 en este modelo. En la figura 16A se muestra un experimento de respuesta a la dosis para el anticuerpo 2.4.4. Las flechas indican el momento de dosificación y las dosis se muestran en la leyenda. El número de animales en cada dosis (de 10) con tumor no medible se indica entre paréntesis. Para las dos dosis más altas sometidas a prueba, 10 µg administrados dos veces por semana y 30 µg administrados dos veces por semana, la inhibición del crecimiento tumoral fue estadísticamente significativa cuando se comparó con animales control que recibieron el control de isotipo a 30 µg dos veces por semana (IgG2 humana n.º PK16.3.1, Abgenix Inc. Fremont, CA). Se observó una ligera inhibición del crecimiento, pero no estadísticamente significativa, con las 2 dosis inferiores (1 y 3 µg dos veces por semana) de 2.4.4. Los datos se presentan como la media ± error estándar; n=10 animales por grupo y $p<0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los experimentos que sometían a prueba los otros nueve anticuerpos frente a HGF del ejemplo 6 mostraron inhibición completa similar del crecimiento tumoral a las dosis superiores.

B. Modelo de enfermedad establecida por xenoinjerto de U-87 MG

Se inyectaron células U-87 MG en medios libres de suero en ratones atímicos, siguiendo el procedimiento comentado anteriormente en el ejemplo 11 A. Se permitió que los tumores crecieran durante aproximadamente dos semanas hasta que alcanzaron un volumen de ~200 mm^3 antes de que comenzara la dosificación intraperitoneal con anticuerpos frente a HGF. Se trataron los ratones dos veces por semana con anticuerpo 2.4.4 a 200 µg, 100 µg o 30 µg dos veces por semana comenzando en el día 16, tal como se indica mediante las flechas en la figura 16B. Se midió y se evaluó el volumen tumoral tal como se describió anteriormente. El número de animales (de 10) sin tumor medible en el día 30 se indica entre paréntesis. Se observó inhibición completa de crecimiento tumoral de U-87 MG en todas las dosis. Se logró una regresión estadísticamente significativa de los tumores establecidos hacia el día 29. En experimentos separados, se sometió a prueba cada uno de los diez anticuerpos frente a HGF comentados en el ejemplo 6 en este modelo y se observó inhibición completa a las dosis superiores de cada anticuerpo.

C. Clasificación de anticuerpos en el modelo de enfermedad residual mínima de U-87 MG

Para determinar la potencia relativa de los diez anticuerpos frente a HGF comentados en el ejemplo 6 en el modelo de tumor U-87 MG comentado en el ejemplo 11 A, se eligió una dosis baja que sólo inhibía parcialmente el crecimiento tumoral en el modelo de enfermedad residual mínima. Estudios preliminares de respuesta a la dosis (figura 16A) sugirieron que 5 µg dos veces por semana producirían inhibición parcial mediante los anticuerpos frente a HGF. Se realizaron una serie de experimentos comparativos que comparaban hasta 5 anticuerpos diferentes frente a HGF. En las figuras 16C y 16D se muestran los resultados de dos de estos experimentos. El * indica aquellos anticuerpos frente a HGF que inhibieron significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el anticuerpo IgG2 de control de isotipo y PBS ($p<0,0001$).

Se realizaron experimentos de orden de clasificación similares usando el modelo de enfermedad U-87 establecido comentado en el ejemplo 11 B. En esos experimentos, se usó una dosis de 10 µg, 2X por semana. En las figuras 16E y 16F se muestran los resultados de dos de esos experimentos.

Lista de secuencias

<110> AMGEN INC.
ABGENIX, INC.
BURGESS, TERESA L.
COXON, ANGELA
GREEN, LARRY L.
ZHANG, KE

<120> AGENTES DE UNIÓN ESPECÍFICA AL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS

<130> 6843.51-304

<140>
<141>

<150> Documento US 60/488.681
<151> 18-07-2003

<160> 194

<170> PatentIn Ver. 3.2

<210> 1
<211> 87
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 1.24.1 frente a HGF sintética (Vk, 1-L15)

<400> 1
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggtt cccaggttcc 60
agatgcgaca tccagatgac ccagtctcca tcttccgtgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgtcgggc gagtcagggt attagcagct ggttagcctg gtatcagcag 180
aaaccaggga aagcccctaa cctcctgatc tatgaagcat ccagtttgca aagtggggtc 240
ccatcaaggt tcggcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
cagcctgaag attttgcaac ttactattgt caacaggcta acggtttccc gtggacgttc 360
ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaa 387

<210> 2
<211> 423
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 1.24.1 frente a HGF sintética (Vh, H3-11)-región c de hulgG2)

<400> 2

```
atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctatta taaaaggtgt ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtcaagcctg gagggtccct gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac cttcagtgac tactacatga gctggatccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggagtgggt ttcatacatt agtagtagtg gtagtaccat atactacgca 240
gactctgtga agggccgatt caccatctcc agggacaacg ccaagaactc actgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatgagtat 360
aacagtggct ggtacgtcct ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctct 420
agt                                                               423
```

<210> 3
<211> 399
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 1.29.1 frente a HGF sintética (Vk, 4-B3)

<400> 3

```
atggtgttgc agacccaggt cttcatttct ctgttgctct ggatctctga tgcctacgga 60
gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 120
atcaactgca agtccagcca gagtattttt tacagctcca ccaataagaa ctacttagct 180
tggtatcaga agaaaccggg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctacccgg 240
gaatccgggg tccctgaccg gttcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 300
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 360
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa                         399
```

<210> 4
<211> 411
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 1.29.1 frente a HGF sintética (Vh, 3-33)-región C de hulgG2

<400> 4

```
atggagtttg ggctgaactg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccaggctccg 180
ggcaagggac tggagtgggt ggcagttata tggtatgatg gaagtgataa atactatgca 240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agaggactac 360
ggcgagggtt ttgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctctag t          411
```

<210>5
<211> 397
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 1.29.1 frente a HGF sintética (Vk, 1-A20)

<400> 5

```
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg ggactcctgc tgctctggct cccagatacc 60
agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgtatctgt cggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc gagtcagggc attagcagtt atttagcctg gtatcagcag 180
aaaccaggga aagttcctaa gctcctgatc tatgttgcat ccactttgca atcaggggtc 240
ccgtctcggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
cagcctgaag atgttgcaac ttattactgt caaaactata acagtgaccc gctcactttc 360
ggcggcggga ccaaggtgga gatcaaa                                     387
```

<210> 6
<211> 417
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 1.60.1 frente a HGF sintética (Vh, H1-02)-región C de hulgG2

<400> 6
atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcccag 60
gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120
tgcaaggctt ctggatacac cttcaccggc tactatataa actgggtgcg acaggccccc 180
ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aaccctaaca gtggtggcac aaactatgca 240
cagaagtttc agggcagggt caccatgacc agggacacgt ccatcaccac agcctacatg 300
gagctgagca ggctgagagc tgacgacacg gccgtgtact actgtgcgag agaactggaa 360
ctacgctact acggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctctagt 417

<210> 7
<211> 387
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 1.61.3 frente a HGF sintética (Vk, 1-018/08)

<400> 7
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct ctcaggtgcc 60
agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccaggc gagtcaggac attagcaact atttaaattg gtatcagcag 180
aaaccaggga cagcccctaa actcctgatc tacggtgcat ccgatttgga aacgggggtc 240
ccatcaaggt tcagtggaag tggatctggg acagatttta ctttcgccat cagcagcctg 300
cagcctgaag atattgcaac atattactgt caacagtatg ataatctccc gtacaatttt 360
ggccagggga ccaagctgga gatcaaa 387

<210> 8
<211> 444
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 1.61.3 frente a HGF sintética (Vh, 4-31)-región C de hulgG2

<400> 8
atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cacagaccct gtccctcacc 120
tgcactgtct ctggtggctc catcagcagt gatggttact actggagctg gatccgccag 180
cacccaggga agggcctgga gtggattggg tacatctatt acagtgggag cacctactac 240
aacccgtccc tcaagagtcg agtcaccata tcagtagaca cgtctaagaa ccagttctcc 300
ctgaagctga gctctgtgac tgccgcggac acggccgtct attactgtgc gagatcccac 360
cttcattact atgatagtag tggttattac tacggcggtg cttttgatat ctggggccaa 420
gggacaatgg tcaccgtctc tagt 444

<210> 9
<211> 387
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 1.74.3 frente a HGF sintética (Vk, 1-012/02)

<400> 9
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagagc attaacagcg atttaaattg gtatcagcag 180
aaaccaggga aagtccctaa gctcctgatc tatgttgcat ccagtttgca aaatggggtc 240
ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagtctg 300
caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacggagtt acagtacccc tcccactttc 360
ggccctggga ccaaagtgga tatcaaa 387

<210> 10
<211> 417
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 1.74.3 frente a HGF sintética (Vh, VG1-02)-región C de hulgG2

<400> 10
atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcccag 60
gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120
tgcaaggctt ctggatacac cttcaccggc tactatatac actgggtgcg acaggcccct 180
ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aaccctaaca gtggtggcac aaactatgca 240
cagaagtttc agggcagggt caccatgacc agggacacgt ccatcagcac agcctacatg 300
gagctgagca ggctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag agaactggaa 360
ctacgctact acggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctctagt 417

<210> 11
<211> 387
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 1.75.1 frente a HGF sintética (Vk, 1-A30)

<400> 11
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggtt cccaggtgcc 60
aggtgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagaaatg atttaggctg gtttcagcag 180
aaaccaggga aagcccctaa gcgcctgatc tatgctgcat ccagtttgca aagtggggtc 240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagaattca ctctcacaat cagcagcctg 300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt ctacagcatg atagttaccc gctcactttc 360
ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaa 387

<210> 12
<211> 432
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 1.75.1 frente a HGF sintética (Vh, VG4-21)-región C de hulgG2

<400> 12

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cacagaccct gtccctcacc 120
tgcactgtct ctggtggctc catcagcagt ggtggttact actggagctg gatccgccag 180
cacccaggga agggcctgga gtggattggg tacatctatt acagtgggag cacctactac 240
aacccgtccc tcaagagtcg agttaccata tcagtagaca cgtctaagaa ccagttctcc 300
ctgaaggtga gctctgtgac tgccgcggac acggccgtgt attactgtgc gagagaccca 360
ctatggttcg gggagttcga ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 420
accgtctcta gt 432

<210> 13
<211> 399
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 2.4.4 frente a HGF sintética (Vk, 4-B3)

<400> 13
atggtgttgc agacccaggt cttcatttct ctgttgctct ggatctctgg tgcctacggg 60
gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 120
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta ttcagctcca acaataagaa ttacttagct 180
tggtatcagc agaaaccagg acagcctcct aagttgctca tttactgggc atctacccgg 240
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 300
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttagtcct 360
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa 399

<210> 14
<211> 426
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 2.4.4 frente a HGF sintética (Vh, VG 4-31)-región C de hulgG2

<400> 14
atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatggat cctgtcccag 60
gtgcagctga aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cacagaccct gtccctcacc 120
tgcactgtct ctggtggctc catcagcagt ggtgtttact actggagctg gatccgccag 180
cacccaggga agggcctgga gtggattggg tacttctatt atagtgggaa cacctaccac 240
aacccgtccc tcaagagtcg agtgaccata tcagtagaca cgtctaagaa ccagttctcc 300
ctgaagctga gctctgtgac tgccgcggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcgt 360
agtggctacg atcaccctga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 420
tctagt 426

<210> 15
<211> 384
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 2.12.1 frente a HGF sintética (Vk, 3-L2/L16)

<400> 15

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccactgga 60
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttgac agcaacttag cctggtaccg gcagaaacct 180
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggactgag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tatattaact ggcctccgat caccttcggc 360
caagggacac gactggagat taaa 384

<210> 16
<211> 417
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 2.12.1 frente a HGF sintética (Vh4-59)-región C de hulgG2

<400> 16
atgaaacacc tgtggttctt ccttctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
tgcactgtct ctggtggctc catcagtatt tactactgga gctggatccg gcagcccccа 180
gggaagggac tggagtggat tgggtatgtc tattacagtg ggagcaccaa ttacaacccc 240
tccctcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaag 300
ctgaactctg tgaccgctgc ggacacggcc gtgtattact gtgcgagagg gggatacgat 360
ttttggagtg gttattttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctagt 417

<210> 17
<211> 387
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 2.40.1 frente a HGF sintética (Vk, 1A20)

<400> 17
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggtt cccaggtgcc 60
aggtgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagaaatg atttaggctg gtatcagcag 180
aaaccaggga aagcccctaa gcgcctgatc tatgttgcat ccagtttgca aagtggggtc 240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagaattca ctctcacaat cagcagcctg 300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt ctacaacata atagttaccc gctcactttc 360
ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaa 387

<210> 18
<211> 420
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 3.10.1 frente a HGF sintética (Vh, VG 4-34)-región C de hulgG2

<400> 18

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cacagaccct gtccctcacc 120
tgcactgtct ctggtggctc catcagcagt ggtggttact actggagctg gatccgtcag 180
cacccaggga agggcctgga gtggattggg aacatctatt acagtgggat cacctactac 240
aacccgtccc tcaagagtcg agttaccatg tcagtagaca cgtctaagaa ccagttctcc 300
ctgaagctga gttctgtgac tgccgcggac acggccgtgt attactgtgc gagagatccc 360
ctctacggtg actacgggtt cgacccctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctctagt 420

<210> 19
<211> 384
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 3.10.1 frente a HGF sintética (Vk, 3-12/L16)

<400> 19
atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccactgga 60
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctcctgggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 180
ggccaggctc ccaggctcct catgtatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggcctccgat caccttcggc 360
caagggacac gactggagat taaa 384

<210> 20
<211> 417
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 3.10.1 frente a HGF sintética (Vh, VG 4-34)-región C de hulgG1

<400> 20
atgaaacacc tgtggttctt cctcctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcagctac agcagtgggg cgcaggactg ttgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
tgcgctgtct atggtgggtc cttcagtact tactactgga gctggatccg ccagcccccа 180
gggaaggggc tggagtggat tggggaaatc aatcatagtg gaagcaccaa ctacaacccg 240
tccctcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaag 300
ctgagctctg tgaccgccgc ggacacggct gtgtattact gtgcgagagg ggggtacgat 360
ttttggagtg gttattatga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctagt 417

<210> 21
<211> 324
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región constante kappa humana sintética

<400> 21
cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg ttga 324

<210> 22
<211> 993
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región Constante de IgG1 humana sintética

<400> 22
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccc 420
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag 720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 993

<210> 23
<211> 981
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región constante de IgG2 humana sintética

<400> 23
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg cacccagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
aaatgttgtg tcgagtgccc accgtgccca gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccccctga ggtcacgtgc 420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 480
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg 660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 960
tccctgtctc cgggtaaatg a 981

<210> 24
<211> 129
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 1.24.1 frente a HGF sintética (Vk, 1-L15)

<400> 24

```
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1               5                  10                  15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
            20                  25                  30

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
        35                  40                  45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
    50                  55                  60

Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
65                  70                  75                  80

Pro Ser Arg Phe Gly Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
                85                  90                  95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
            100                 105                 110
Ala Asn Gly Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
        115                 120                 125

Lys
```

<210> 25
<211> 141
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 1.24.1 frente a HGF sintética (Vh, H3-11)-región C de hulgG2

<400> 25

```
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ile Lys Gly
 1               5                  10                  15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
        35                  40                  45

Ser Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala
65                  70                  75                  80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
                85                  90                  95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Glu Tyr Asn Ser Gly Trp Tyr Val Leu Phe
        115                 120                 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    130                 135                 140
```

<210> 26
<211> 133
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 1.29.1 frente a HGF sintética (Vk, 4-B3)

<400> 26

```
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1               5                  10                  15

Asp Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
            20                  25                  30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Ile Phe Tyr Ser Ser Thr Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Lys
    50                  55                  60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65                  70                  75                  80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
                85                  90                  95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125

Lys Val Glu Ile Lys
    130
```

<210> 27
<211> 137
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 1.29.1 frente a HGF sintética (Vh, 3-33)-región C de hulgG2

<400> 27

```
Met Glu Phe Gly Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1               5                  10                  15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
            20                  25                  30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
        35                  40                  45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala
65                  70                  75                  80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
                85                  90                  95
```

```
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
        115                 120                 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    130                 135
```

<210> 28
<211> 129
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 1.60.1 frente a HGF sintética (Vk, 1-A20)

<400> 28

```
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
  1               5                  10                  15

Leu Pro Asp Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
            20                  25                  30

Leu Ser Val Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
        35                  40                  45

Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
    50                  55                  60

Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val
65                  70                  75                  80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
                85                  90                  95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn
            100                 105                 110

Tyr Asn Ser Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
        115                 120                 125

Lys
```

<210> 29
<211> 139
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 1.60.1 frente a HGF sintética (Vh, H1-02)-región C de hulgG2

<400> 29

```
Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1               5                  10                  15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
            20                  25                  30

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

Thr Gly Tyr Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala
65                  70                  75                  80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Thr
                85                  90                  95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Leu Glu Leu Arg Tyr Tyr Gly Met Asp Val
        115                 120                 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    130                 135
```

<210> 30
<211> 129
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 1.61.3 frente a HGF sintética (Vk, 1-018/08)

<400> 30

```
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1               5                  10                  15

Leu Ser Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
            20                  25                  30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser
        35                  40                  45

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr
    50                  55                  60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asp Leu Glu Thr Gly Val
65                  70                  75                  80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Ala
                85                  90                  95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
            100                 105                 110

Tyr Asp Asn Leu Pro Tyr Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
        115                 120                 125

Lys
```

<210> 31
<211> 148
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 1.61.3 frente a HGF sintética (Vg, 4-31)-región C de hulgG2

<400> 31

```
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1               5                  10                  15

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

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
        35                  40                  45

Ser Ser Asp Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys
    50                  55                  60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
65                  70                  75                  80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
                85                  90                  95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
            100                 105                 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser His Leu His Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly
        115                 120                 125

Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
    130                 135                 140

Thr Val Ser Ser
145
```

<210> 32
<211> 129
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera (Vk, 1-012/02) de 1.74.3 frente a HGF sintética

<400> 32

```
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1               5                  10                  15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
            20                  25                  30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
        35                  40                  45

Gln Ser Ile Asn Ser Asp Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
    50                  55                  60

Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Asn Gly Val
65                  70                  75                  80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
                85                  90                  95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg
            100                 105                 110

Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
        115                 120                 125

Lys
```

<210> 33
<211> 139
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 1.74.3 frente a HGF sintética (Vh, VG1-02)-región C de hulgG2

<400> 33

```
Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1               5                  10                  15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
            20                  25                  30

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

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

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala
65                  70                  75                  80
```

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Leu Glu Leu Arg Tyr Tyr Gly Met Asp Val
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 34
<211> 129
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 1.75.1 frente a HGF sintética (Vk, 1-A30)

<400> 34
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
100 105 110

His Asp Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys

<210> 35
<211> 144
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 1.75.1 frente a HGF sintética (Vh, VG4-31)-región C de hulgG2

<400> 35

```
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1               5                  10                  15

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

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
        35                  40                  45

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

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
65                  70                  75                  80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
                85                  90                  95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Val Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
            100                 105                 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Leu Trp Phe Gly Glu Phe Asp Tyr
        115                 120                 125

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    130                 135                 140
```

<210> 36
<211> 133
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 2.4.4 frente a HGF sintética (Vk, 4-B3)

<400> 36

```
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1               5                  10                  15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
            20                  25                  30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Val Leu Phe Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
    50                  55                  60
```

```
Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65                  70                  75                  80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
                85                  90                  95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125

Lys Val Glu Ile Lys
    130
```

<210> 37
<211> 142
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 2.4.4 frente a HGF sintética (Vh, VG 4-31)-región C de hulgG2

<400> 37

```
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
  1               5                  10                  15

Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
            20                  25                  30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
        35                  40                  45

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

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr His
 65                  70                  75                  80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
                85                  90                  95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
            100                 105                 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Gly Tyr Asp His Pro Asp Ala
        115                 120                 125

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
    130                 135                 140
```

<210> 38
<211> 128
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 2.12.1 frente a HGF sintética (Vk, 3-12/116)

<400> 38

```
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1               5                  10                  15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
            20                  25                  30

Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Val Asp Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
    50                  55                  60

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65                  70                  75                  80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                85                  90                  95

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile
            100                 105                 110

Asn Trp Pro Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
        115                 120                 125
```

<210> 39
<211> 139
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 2.12.1 frente a HGF sintética (Vg, 4-59)-región C de hulgG2

<400> 39

```
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1               5                  10                  15

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

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
        35                  40                  45

Ser Ile Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60
```

```
Glu Trp Ile Gly Tyr Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
 65                  70                  75                  80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
                 85                  90                  95

Phe Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr
        115                 120                 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    130                 135
```

<210> 40
<211> 129
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 2.40.1 frente a HGF sintética (Vk, 1A20)

<400> 40

```
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
  1               5                  10                  15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
            20                  25                  30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
        35                  40                  45

Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
    50                  55                  60

Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65                  70                  75                  80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
                 85                  90                  95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
            100                 105                 110

His Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
        115                 120                 125

Lys
```

<210> 41
<211> 140
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 2.40.1 frente a HGF sintética (Vh, VG 4-31)-región C de hulgG2

<400> 41

```
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1               5                  10                  15

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

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
        35                  40                  45

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

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr
65                  70                  75                  80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys
                85                  90                  95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
            100                 105                 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Leu Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Asp
        115                 120                 125

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    130                 135                 140
```

<210> 42
<211> 128
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena ligera de 3.10.1 frente a HGF sintética (Vk, 3-L2/L16)

<400> 42

```
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1               5                  10                  15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
            20                  25                  30

Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Val Ser Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
    50                  55                  60
```

```
Arg Leu Leu Met Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65                  70                  75                  80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                85                  90                  95

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn
            100                 105                 110

Asn Trp Pro Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
        115                 120                 125
```

<210> 43
<211> 139
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región V de la cadena pesada de 3.10.1 frente a HGF sintética (Vh, VG 4-34)-región C de hulgG1

<400> 43

```
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
  1               5                  10                  15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
            20                  25                  30

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

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

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
65                  70                  75                  80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
                85                  90                  95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr
        115                 120                 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    130                 135
```

<210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región constante kappa humana sintética

<400> 44

```
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1               5                  10                  15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
            20                  25                  30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
        35                  40                  45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
    50                  55                  60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65                  70                  75                  80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
                85                  90                  95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            100                 105
```

<210> 45
<211> 330
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región Constante de IgG1 humana sintética

<400> 45

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1               5                  10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95
```

```
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225                 230                 235                 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 46
<211> 326
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Región constante de IgG2 humana sintética

<400> 46

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1               5                  10                  15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        115                 120                 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    130                 135                 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145                 150                 155                 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
                165                 170                 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
            180                 185                 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
        195                 200                 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
    210                 215                 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225                 230                 235                 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
                245                 250                 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
            260                 265                 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
        275                 280                 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
    290                 295                 300
```

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 47
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido del epítopo de células T sintético

<400> 47
Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys
1 5 10 15

Lys Cys

<210> 48
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base modificada
<222> (18) .. (23)
<223> a, t, c o g

<400> 48
ggccggatag gcctccannn nnnt 24

<210> 49
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 49
ggacactgac atggactgaa ggagta 26

<210> 50
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 50
ggggtcaggc tggaactgag g 21

<210> 51
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 51
acaacaaagc ttctagacca ccatggaagc cccagctcag cttctctt 48

<210> 52
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 52
cttgtcgact caacactctc ccctgttgaa gctc 34

<210> 53
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 53
ggacactgac atggactgaa ggagta 26

<210> 54
<211> 48
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 54
agcagaagct tctagaccac catgaaacac ctgtggttct tcctcctc 48

<210> 55
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 55
gtggaggcac tagagacggt gaccagggtt cc 32

<210> 56
<211> 1043
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada pI/hCh1 sintética

<400> 56

```
tctagaccac cgccatgggt gaaaattgaa tcgtctctag tgcctccacc aagggcccat 60
cggtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct 120
gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca ggcgccctga 180
ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac tccctcagca 240
gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc aacgtgaatc 300
acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt gacaaaactc 360
acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc 420
ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg 480
tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg 540
tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca 600
gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct 660
ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc 720
gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca 780
gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca 840
atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct 900
tcttcctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct 960
catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt 1020
ctccgggtaa atgataagtc gac                                        1043
```

<210> 57
<211> 540
<212> ADN
<213> *Gallus gallus*

<220>
<221> CDS

<222> (2) .. (520)

<400> 57

```
c ccc acc atg gtg cac gca acc tcc ccg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctc 49
  Pro Thr Met Val His Ala Thr Ser Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
    1               5                  10                  15
```

```
agc ctg gct ctg gtg gct ccc ggc ctc tct gcc aga aag tgc tcg ctg   97
Ser Leu Ala Leu Val Ala Pro Gly Leu Ser Ala Arg Lys Cys Ser Leu
            20                  25                  30

act ggg aaa tgg acc aac gat ctg ggc tcc aac atg acc atc ggg gct  145
Thr Gly Lys Trp Thr Asn Asp Leu Gly Ser Asn Met Thr Ile Gly Ala
        35                  40                  45

gtg aac agc aaa ggt gaa ttc aca ggc acc tac acc aca gcc gta aca  193
Val Asn Ser Lys Gly Glu Phe Thr Gly Thr Tyr Thr Thr Ala Val Thr
    50                  55                  60

gcc aca tca aat gag atc aaa gag tca cca ctg cat ggg aca caa aac  241
Ala Thr Ser Asn Glu Ile Lys Glu Ser Pro Leu His Gly Thr Gln Asn
65                  70                  75                  80

acc atc aac aag agg acc cag ccc acc ttt ggc ttc act gtc aat tgg  289
Thr Ile Asn Lys Arg Thr Gln Pro Thr Phe Gly Phe Thr Val Asn Trp
                85                  90                  95

aag ttt tca gag tcc acc act gtc ttc acg ggc cag tgc ttc ata gac  337
Lys Phe Ser Glu Ser Thr Thr Val Phe Thr Gly Gln Cys Phe Ile Asp
            100                 105                 110

agg aac ggg aag gag gtc ctg aag acc atg tgg ctg ctg cgg tca agt  385
Arg Asn Gly Lys Glu Val Leu Lys Thr Met Trp Leu Leu Arg Ser Ser
        115                 120                 125

gtt aat gac att ggt gat gac tgg aaa gct acc agg gtc ggc atc aac  433
Val Asn Asp Ile Gly Asp Asp Trp Lys Ala Thr Arg Val Gly Ile Asn
    130                 135                 140

atc ttc act cgc ctg cgc aca cag aag gag cag ctg cta gca agc ttg  481
Ile Phe Thr Arg Leu Arg Thr Gln Lys Glu Gln Leu Leu Ala Ser Leu
145                 150                 155                 160

cta gcg gcc gct cga ggc cgg caa ggc cgg atc cag aca tgataagata   530
Leu Ala Ala Ala Arg Gly Arg Gln Gly Arg Ile Gln Thr
                165                 170

cattgatgag                                                      540
```

<210> 58
<211> 540
<212> ADN
<213> *Gallus gallus*

<400> 58

```
ctcatcaatg tatcttatca tgtctggatc cggccttgcc ggcctcgagc ggccgctagc 60
aagcttgcta gcagctgctc cttctgtgtg cgcaggcgag tgaagatgtt gatgccgacc 120
ctggtagctt tccagtcatc accaatgtca ttaacacttg accgcagcag ccacatggtc 180
ttcaggacct ccttcccgtt cctgtctatg aagcactggc ccgtgaagac agtggtggac 240
tctgaaaact tccaattgac agtgaagcca aaggtgggct gggtcctctt gttgatggtg 300
ttttgtgtcc catgcagtgg tgactctttg atctcatttg atgtggctgt tacggctgtg 360
gtgtaggtgc ctgtgaattc acctttgctg ttcacagccc cgatggtcat gttggagccc 420
agatcgttgg tccatttccc agtcagcgag cactttctgg cagagaggcc gggagccacc 480
```

agagccaggc tgagcagcag cagcagcagc agcggggagg ttgcgtgcac catggtgggg 540

<210> 59
<211> 173
<212> PRT
<213> *Gallus gallus*

<400> 59

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

<210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 60

Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp	Leu	Ala
1				5				10	

<210> 61
<211> 17

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 61

Lys Ser Ser Gln Ser Ile Phe Tyr Ser Ser Thr Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 62
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 62

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 63

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 64

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Asp Leu Asn
1 5 10

<210> 65
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 65

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly
1 5 10

<210> 66
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 66
Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 67
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 67
Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 68
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 68
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly
1 5 10

<210> 69
<211> 11
<212> PAT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 69
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 70
Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 71
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 72
Val Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 73
Gly Ala Ser Asp Leu Glu Thr
1 5

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 74
Val Ala Ser Ser Leu Gln Asn
1 5

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 75
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 76
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 77
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 78
Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 79
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 80

<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 80
Gln Gln Ala Asn Gly Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 81
Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 82
Gln Asn Tyr Asn Ser Asp Pro Leu Thr
1 5

<210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 83
Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Tyr Asn
1 5

<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 84
Gln Arg Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 85
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 85
Leu Gln His Asp Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 86
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 86
Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro Trp Thr
1 5

<210> 87
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la· Secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 87
Gln Gln Tyr Ile Asn Trp Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 88
Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 89
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena ligera, sintético

<400> 89

Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 90
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 90
Asp Tyr Tyr Met Ser
1 5

<210> 91
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 91
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 92
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 92
Gly Tyr Tyr Ile Asn
1 5

<210> 93
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 93
Ser Asp Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 94
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 94
Gly Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 95
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 95
Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 96
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 96
Ser Gly Val Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 97
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 97
Ile Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 98
Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 99
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 99

Thr Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 100
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 100

Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 101
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 101

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 102
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 102

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 103
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 103

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 104
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 104
Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 105
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 105
Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 106
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 106
Tyr Phe Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 107
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 107
Tyr Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 108
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 108
Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 109
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 109
Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 110
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 110
Asp Glu Tyr Asn Ser Gly Trp Tyr Val Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 111
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 111
Glu Asp Tyr Gly Glu Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 112
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 112
Glu Leu Glu Leu Arg Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 113
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 113
Ser His Leu His Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ala
1 5 10 15

Phe Asp Ile

<210> 114
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 114
Glu Leu Glu Leu Arg Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 115
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 115
Asp Pro Leu Trp Phe Gly Glu Phe Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 116
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 116
Asp Arg Ser Gly Tyr Asp His Pro Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 117
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 117
Gly Gly Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 118
<211> 11
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 118

Asp Pro Leu Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 119
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de la CDR de la región variable de la cadena pesada, sintético

<400> 119

Gly Gly Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr
1 5 10

<210> 120
<211> 279
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 120

```
Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro
 1               5                  10                  15

Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp
            20                  25                  30

His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn
        35                  40                  45

Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr
    50                  55                  60

Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val
65                  70                  75                  80

Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu
                85                  90                  95

Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys
            100                 105                 110

Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser
        115                 120                 125

Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe
    130                 135                 140

Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys
145                 150                 155                 160

Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr
                165                 170                 175

Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys
            180                 185                 190

Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile
        195                 200                 205

Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr
    210                 215                 220

Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly
225                 230                 235                 240
```

```
Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile
                245                 250                 255

Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile Leu
            260                 265                 270

Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser
        275
```

<210> 121
<211> 278
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 121

```
Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro
 1               5                  10                  15

Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp
            20                  25                  30

His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn
        35                  40                  45

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

Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val
65                  70                  75                  80

Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ala Arg Asn Lys Asp Leu Lys Asp
                85                  90                  95

Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Glu Arg Gly Glu Glu
            100                 105                 110

Lys Arg Lys Gln Ile Leu Asn Ile Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu
        115                 120                 125

Gly Ser Asp Leu Val Leu Leu Lys Leu Ala Arg Pro Ala Ile Leu Asp
    130                 135                 140

Asn Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Ser Tyr Gly Cys Thr Ile Pro
145                 150                 155                 160

Glu Lys Thr Thr Cys Ser Ile Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile
                165                 170                 175

Asn Ala Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn
            180                 185                 190

Glu Lys Cys Ser Gln His His Gln Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser
        195                 200                 205

Glu Leu Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly
    210                 215                 220
```

```
Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Ile Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val
225                 230                 235                 240

Leu Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro
                245                 250                 255

Gly Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Val
            260                 265                 270

Ile Leu Thr Tyr Lys Leu
        275
```

<210> 122
<211> 278
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia consenso

<220>
<221> MOD_RES
<222> (53) .. (53)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES
<222> (55) .. (55)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES
<222> (91) .. (92)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES
<222> (108) .. (108)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES
<222> (114) .. (114)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES
<222> (145) .. (145)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD·RES
<222> (154) .. (154)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES
<222>(178) .. (178)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable
92

<220>
<221> MOD_RES

<222> (200) .. (200)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<400> 122

```
Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro
 1               5                  10                  15

Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp
            20                  25                  30

His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn
        35                  40                  45

Gly Ile Pro Thr Xaa Thr Xaa Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Lys Tyr
    50                  55                  60

Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val
65                  70                  75                  80

Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ala Arg Xaa Xaa Asp Leu Lys Asp
                85                  90                  95

Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Xaa Arg Gly Asp Glu
            100                 105                 110

Lys Xaa Lys Gln Ile Leu Asn Ile Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu
        115                 120                 125

Gly Ser Asp Leu Val Leu Leu Lys Leu Ala Arg Pro Ala Ile Leu Asp
    130                 135                 140

Xaa Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Xaa Tyr Gly Cys Thr Ile Pro
145                 150                 155                 160

Glu Lys Thr Ser Cys Ser Ile Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile
                165                 170                 175

Asn Xaa Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn
            180                 185                 190

Glu Lys Cys Ser Gln His His Xaa Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser
        195                 200                 205

Glu Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly
    210                 215                 220

Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Ile Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val
225                 230                 235                 240
```

```
Leu Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro
                245                 250                 255

Gly Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile
            260                 265                 270

Ile Leu Thr Tyr Lys Leu
        275
```

<210> 123
<211> 77
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 123

```
Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly
  1               5                  10                  15

Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro
            20                  25                  30

Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val
        35                  40                  45

His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln
    50                  55                  60

Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu Met
65                  70                  75
```

<210> 124
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 124
atgcgtctcc cttgatgatg ctggctgcat ttc 33

<210> 125
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 125
atgcgtctct caagggaagg tgactctgaa tga 33

<210> 126
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 126
atgcgtctct aactaggtaa atcaatcgta ctaaca 36

<210> 127
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 127
atgcgtctct agttatggat gcacaattcc tgaaa 35

<210> 128
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 128
atgcgtctca attatccagg acagcaggcc tg 32

<210> 129
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 129
atgcgtctca taattttgtt'agtacgattg atttacc 37

<210> 130
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 130
atgcgtctcg cgtttctcat ctcctcttcc gt 32

<210> 131
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 131
atgcgtctca aacgcaaaca ggttctcaat gttt 34

<210> 132
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 132
atgcgtctcc tttcgtggac atcatgaatt ccaa 34

<210> 133
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 133
atgcgtctcc gaaagaggag atgagaaatg caaa 34

<210> 134
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 134
gagcagctgc tagcaagctt gcta 24

<210> 135
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 135
atgcgtctca gagacttgaa agactatgaa gcttg 35

<210> 136
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 136
atgcgtctcg tctctggctg gaaaacattg tctt 34

<210> 137
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 137
atgcgtctca acaaagactt gaaagattat gaagcttg 38

<210> 138
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 138
atgcgtctct ttgtttcgag aagggaaaca ctgtcg 36

<210> 139
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 139
atgcgtctca agcttgccag gcctgctgt 29

<210> 140
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 140
atgcgtctca agcttcagta aaaccaagtc tga 33

<210> 141
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 141
atgcgtctca agcttgctcg acctgcaatc 30

<210> 142
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 142
atgcgtctca agcttcatta aaaccagatc tga 33

<210> 143
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 143
atgcgtctca agcttgccag gcctgctgt 29

<210> 144
<311> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 144
atgcgtctca agcttcagta aaaccaagtc tga 33

<210> 145
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 145
atgcgtctca agcttgctcg acctgcaatc 30

<210> 146
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 146
atgcgtctca agcttcatta aaaccagatc tga 33

<210> 147
<211>33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 147
atgcgtctct aggatggatg gttagtttga gat 33

<210> 148
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 148
atgcgtctca tcctactgtt gtttgtgttg gaat 34

<210> 149
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 149
atgcgtctct aggatggatg gttagtttga aata 34

<210> 150
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 150
atgcgtctca tcctatgttt gttcgtgttg g 31

<210> 151
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 151
atgcgtctca tgcatccaag gtcaaggaga ag 32

<210> 152
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 152
atgcgtctca tgcattcagt tgtttccata gg 32

<210> 153
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 153
atgcgtctca tgcatgacct gcaatgggga g 31

<210> 154
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 154
atgcgtctca tgcattcaac ttctgaacac tga 33

<210> 155
<211> 31
212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 155
atgcgtctca tgcatcattg gtaaaggacg c 31

<210> 156
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 156
atgcgtctca tgcagtttct aatatagtct ttgttttc 38

<210> 157
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 157
atgggatccc tatgactgtg gtaccttata tg 32

<210> 158
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 158
atgcggccgc acaaaggaaa agaagaaata caattc 36

<210> 159
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 159
cgggatcctt acaacttgta tgtcaaaatt ac 32

<210> 160
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 160
atgatggcgg ccgctcagaa gaaaagaaga aatacacttc 40

<210> 161
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 161

Val Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg His Gly Arg
1 5 10

<210> 162
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 162

Gly Ile Pro Thr Arg Thr His Gly Arg
1 5

<210> 163
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 163

Val Asn Thr Leu Asp Gln
1 5

<210> 164
<211> 62
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 164

Val Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser
1 5 10 15

Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu
20 25 30

Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys
35 40 45

Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg
50 55 60

<210> 165
<211> 59
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 165

```
Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr
  1               5                  10                  15

Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val
            20                  25                  30

Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu
        35                  40                  45

Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg
    50                  55
```

<210> 166
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia consenso de la CDR1 de la cadena ligera (CDR1a)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> lisina, arginina o glutamina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)
<223> serina o alanina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)
<223> serina, glicina o ácido aspártico

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)
<223> valina o isoleucina o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)
<223> leucina o fenilalanina o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)
<223> fenilalanina, tirosina o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9) .. (10)
<223> serina o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)
115
<223> asparagina, treonina o no está presente

<220>
<221> MOD_RES

<222> (12)
<223> asparagina, isoleucina o valina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)
<223> lisina, arginina, asparagina o ácido aspártico

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)
<223> asparagina o serina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)
<223> tirosina, ácido aspártico, triptófano o asparagina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)
<223> alanina, glicina o asparagina

<400> 166

```
Xaa Xaa Ser Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu
  1               5                  10                  15

Xaa
```

<210> 167
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia consenso de la CDR2 de la cadena ligera (CDR2a)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> triptófano, alanina, valina, ácido glutámico o glicina

<220>
<221> MOD_RES
<222:> (4)
<223> treonina, serina o ácido aspártico

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)
<223> arginina o leucina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)
<223> ácido glutámico, glutamina o alanina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)
<223> serina, asparagina o treonina

<400> 167

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 168
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia consenso de la CDR3 de la cadena ligera (CDR3a)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> glutamina o leucina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)
<223> glutamina, asparagina o arginina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)
<223> tirosina, histidina, alanina o serina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)
<223> fenilalanina, tirosina, ácido aspártico, asparagina o isoleucina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)
<223> serina, glicina o asparagina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)
<223> prolina, tirosina, treonina, fenilalanina, ácido aspártico, leucina o triptófano

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)
<223> prolina o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)
<223> triptófano, leucina, prolina, tirosina o isoleucina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)
<223> treonina o asparagina

<400> 168
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 169
<211> 7

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia consenso de la CDR1 de la cadena pesada (CDR1b)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> serina o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)
<223> ácido aspártico o glicina, o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)
<223> ácido aspártico, glicina, serina, valina, treonina o isoleucina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)
<223> tirosina o glicina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)
<223> isoleucina, metionina o triptófano

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)
<223> histidina, asparagina o serina

<400> 169

Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 170
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia consenso de la CDR2 de la cadena pesada (CDR2b)

<220>
<221> MOD_RES.
<222> (1)
<223> triptófano, tirosina, valina, asparagina o ácido glutámico

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)
<223> isoleucina, fenilalanina o valina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)
<223> asparagina, serina, triptófano o tirosina

<220>
<221> MOD_RES

<222> (4)
<223> prolina, serina, tirosina o histidina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)
<223> asparagina, serina o ácido aspártico

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)
<223> serina o glicina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)
<223> glicina o serina, o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)
<223> glicina, treonina, ácido aspártico, serina, isoleucina o asparagina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)
<223> treonina, isoleucina o lisina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)
<223> asparagina o tirosina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)
<223> tirosina o histidina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)
<223> alanina o asparagina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)
<223> glutamina, ácido aspártico o prolina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)
<223> lisina o serina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)
<223> fenilalanina, valina o leucina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)
<223> glutamina o lisina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)

<223> glicina o serina

<400> 170

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa

<210> 171
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia consenso de la CDR3 de la cadena ligera (CDR3b)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> ácido glutámico, ácido aspártico, serina o glicina o no está presente

<220>
<221>.MOD_RES
<222> (2)
<223> leucina, ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, prolina o glicina o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)
<223> ácido glutámico, tirosina o leucina, o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)
<223> leucina, asparagina, glicina, histidina, tirosina o triptófano, o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)
<223> arginina, serina, ácido glutámico, tirosina, glicina o fenilalanina o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)
<223> glicina o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)
<223> triptófano o tirosina, o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)
<223> ácido aspártico o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)
<223> serina o arginina, o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)

<223> serina o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)
<223> glicina o tirosina, o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)
<223> tirosina, ácido glutámico o ácido aspártico, o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)
<223> tirosina, fenilalanina o ácido aspártico, o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)
<223> tirosina, ácido aspártico, histidina o triptófano, o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)
<223> tirosina, glicina, ácido aspártico, prolina o serina, o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)
<223> glicina, valina, tirosina o ácido aspártico, o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)
<223> leucina, alanina, glicina o tirosina, o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (18)
<223> metionina, fenilalanina o tirosina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)
<223> valina, tirosina, isoleucina o prolina

<400> 171
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Asp Xaa
20

<210> 172
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 172

```
Val Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn
  1               5                  10
```

<210> 173
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena ligera kappa sintética

<400> 173

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
  1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Ser
             20                  25                  30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
         35                  40                  45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
     50                  55                  60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65                  70                  75                  80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
                 85                  90                  95

Tyr Phe Ser Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
            100                 105                 110

Lys
```

<210> 174
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena ligera kappa sintética

<400> 174

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Phe Tyr Ser
            20                  25                  30

Ser Thr Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln
        35                  40                  45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
                85                  90                  95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
            100                 105                 110

Lys
```

<210> 175
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena ligera kappa sintética

<400> 175

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
            20                  25                  30

Leu Gly Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Ser Tyr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 176
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena ligera kappa sintética

<400> 176

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
            20                  25                  30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 177
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena ligera kappa sintética

<400> 177

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Gly Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Gly Phe Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 178
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena ligera kappa sintética

<400> 178

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Val Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Tyr Asn Ser Asp Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 179
<211> 107
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena ligera kappa sintética

<400> 179

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Asp
            20                  25                  30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
            100                 105
```

<210> 180
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena ligera kappa sintética

<400> 180

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
```

```
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Asp Gln Ile Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Asp Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Ala Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Tyr
                85                  90                  95

Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 181
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena ligera kappa sintética

<400> 181

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 182
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena ligera kappa sintética

<400> 182

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Met
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 183
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia consenso de la cadena ligera kappa sintética

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13) .. (13)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES
<222> (29) .. (34)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES
<222> (36) .. (38)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES
<222> (56) .. (56)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES
<222> (98) .. (98)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES

<222> (100) .. (100)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES
<222> (102) .. (103)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<400> 183

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Xaa Ser Val Gly
  1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
             20                  25                  30

Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
         35                  40                  45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val
     50                  55                  60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65                  70                  75                  80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
                 85                  90                  95

Tyr Xaa Ser Xaa Pro Xaa Xaa Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
            100                 105                 110

Ile Lys
```

<210> 184
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena pesada gamma sintética

<400> 184

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
  1               5                  10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
             20                  25                  30
```

```
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
      50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                 85                  90                  95

Ala Arg Glu Leu Glu Leu Arg Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
        115
```

<210> 185
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena pesada gamma sintética

<400> 185

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
  1               5                  10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
            20                  25                  30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
      50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
 65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                 85                  90                  95

Ala Arg Glu Leu Glu Leu Arg Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
        115
```

<210> 186
<211> 120
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena pesada gamma sintética

<400> 186

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
            20                  25                  30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asp Glu Tyr Asn Ser Gly Trp Tyr Val Leu Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
        115                 120
```

<210> 187
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena pesada gamma sintética

<400> 187

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val
        115
```

<210> 188
<211> 127
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena pesada gamma sintética

<400> 188

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
  1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asp
            20                  25                  30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
    50                  55                  60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65                  70                  75                  80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Ser His Leu His Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
            100                 105                 110

Gly Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
        115                 120                 125
```

<210> 189
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena pesada gamma sintética

<400> 189

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
            20                  25                  30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
    50                  55                  60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65                  70                  75                  80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Asp Pro Leu Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Asp Pro Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
        115
```

<210> 190
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena pesada garma sintética

<400> 190

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
            20                  25                  30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
    50                  55                  60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65                  70                  75                  80

Ser Leu Lys Val Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Asp Pro Leu Trp Phe Gly Glu Phe Asp Tyr Tyr Gly Met
            100                 105                 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
        115                 120
```

<210> 191
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena pesada gamma sintética

<400> 191

```
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
            20                  25                  30

Val Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

Trp Ile Gly Tyr Phe Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr His Asn Pro Ser
    50                  55                  60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65                  70                  75                  80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Asp Arg Ser Gly Tyr Asp His Pro Asp Ala Phe Asp Ile
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
        115                 120
```

<210> 192
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena pesada gamma sintética

<400> 192

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Thr Tyr
            20                  25                  30
```

```
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
          35                  40                  45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
      50                  55                  60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65                  70                  75                  80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                 85                  90                  95

Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val
        115
```

<210> 193
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de la proteína de la cadena pesada gamma sintética

<400> 193

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
  1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ile Tyr
            20                  25                  30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
          35                  40                  45

Gly Tyr Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
      50                  55                  60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65                  70                  75                  80

Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                 85                  90                  95

Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val
        115
```

<210> 194
<211> 128

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia consenso de la cadena pesada gamma sintética

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16) .. (16)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES
<222> (31) .. (32)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES
<222> (42) .. (42)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES
<222> (58) .. (58)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES
<222> (102) .. (112)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES
<222> (114) .. (114)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<220>
<221> MOD_RES
<222> (116) .. (116)
<223> Residuo de consenso no determinado; aminoácido variable

<400> 194

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Xaa
  1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Xaa Xaa
             20                  25                  30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Xaa Pro Gly Lys Gly Leu Glu
         35                  40                  45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Xaa Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro
     50                  55                  60

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 65                  70                  75                  80
```

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Tyr Xaa Gly Xaa Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115 120 125

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado que puede unirse a al menos un polipéptido seleccionado de

• SEQ ID NO: 164;

• SEQ ID NO: 165;

• SEQ ID NO: 123;

• aminoácidos 495-556 de HGF humano;

• aminoácidos 507-585 de HGF humano; y

• aminoácidos 506-728 de HGF humano,

en el que el anticuerpo puede neutralizar la unión de HGF a c-Met.

2. Anticuerpo aislado según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo puede unirse a un polipéptido de HGF quimérico de ser humano/ratón,

en el que el polipéptido quimérico comprende una molécula de HGF de ratón que tiene los aminoácidos 506-728 de HGF humano en lugar de la secuencia de ratón homóloga, y

en el que el anticuerpo no se une significativamente a HGF de ratón.

3. Anticuerpo aislado según la reivindicación 2, en el que el polipéptido quimérico comprende una molécula de HGF de ratón que tiene los aminoácidos 507-585 de HGF humano en lugar de la secuencia de ratón homóloga.

4. Anticuerpo aislado, en el que el anticuerpo puede unirse al factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), en el que el anticuerpo puede neutralizar la unión de HGF a c-Met y el anticuerpo se selecciona de:

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 60, 70 y 80 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 90, 100 y 110;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 61, 71 y 81 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 91, 101 y 111;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 62, 72 y 82 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 92, 102 y 112;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 63, 73 y 83 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 93, 103 y 113;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 64, 74 y 84 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 94, 104 y 114;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 65, 75 y 85 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 95, 105 y 115;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 66, 76 y 86 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 96, 106 y 116;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 67, 77 y 87 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 97, 107 y 117;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 68, 78 y 88 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 98, 108 y 118; y

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 69, 79 y 89 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 99, 109 y 119.

5. Anticuerpo según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 60, 70 y 80 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 90, 100 y 110.

6. Anticuerpo según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 61, 71 y 81 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 91, 101 y 111.

7. Anticuerpo según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 62, 72 y 82 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 92, 102 y 112.

8. Anticuerpo según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 63, 73 y 83 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 93, 103 y 113.

9. Anticuerpo según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 64, 74 y 84 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 94, 104 y 114.

10. Anticuerpo según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 65, 75 y 85 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 95, 105 y 115.

11. Anticuerpo según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 66, 76 y 86 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 96, 106 y 116.

12. Anticuerpo según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 67, 77 y 87 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 97, 107 y 117.

13. Anticuerpo según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 68, 78 y 88 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 98, 108 y 118.

14. Anticuerpo según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 69, 79 y 89 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 99, 109 y 119.

15. Anticuerpo según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo se selecciona de:

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 desde el residuo 20 hasta el residuo 141;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 desde el residuo 20 hasta el residuo 137;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 desde el residuo 20 hasta el residuo 148;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 desde el residuo 20 hasta el residuo 144;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 desde el residuo 20 hasta el residuo 142;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 desde el residuo 20 hasta el residuo 140; y

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 desde el residuo 20 hasta el residuo 139.

16. Anticuerpo según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 desde el residuo 20 hasta el residuo 141.

17. Anticuerpo según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende

la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 desde el residuo 20 hasta el residuo 137.

18. Anticuerpo según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 desde el residuo 20 hasta el residuo 139.

19. Anticuerpo según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 desde el residuo 20 hasta el residuo 148.

20. Anticuerpo según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 desde el residuo 20 hasta el residuo 139.

21. Anticuerpo según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 desde el residuo 20 hasta el residuo 144.

22. Anticuerpo según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 desde el residuo 20 hasta el residuo 142.

23. Anticuerpo según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 desde el residuo 20 hasta el residuo 139.

24. Anticuerpo según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 desde el residuo 20 hasta el residuo 140.

25. Anticuerpo según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 desde el residuo 20 hasta el residuo 139.

26. Anticuerpo según la reivindicación 23, en el que la cadena ligera comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44 y la cadena pesada comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

27. Anticuerpo aislado que puede neutralizar la unión de HGF a c-Met y que compite por la unión a HGF con al menos un anticuerpo seleccionado de:

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 desde el residuo 20 hasta el residuo 141;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 desde el residuo 20 hasta el residuo 137;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 desde el residuo 20 hasta el residuo 148;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 33 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 desde el residuo 20 hasta el residuo 144;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 desde el residuo 20 hasta el residuo 142;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 desde el residuo 20 hasta el residuo 140; y

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 desde el residuo 20 hasta el residuo 139.

28. Anticuerpo según la reivindicación 27, en el que el anticuerpo compite por la unión a HGF con un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 desde el residuo 20 hasta el residuo 142.

29. Anticuerpo según la reivindicación 27, en el que el anticuerpo compite por la unión a HGF con un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 desde el residuo 20 hasta el residuo 139.

30. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, que es un anticuerpo de cadena sencilla.

31. Anticuerpo según la reivindicación 30, en el que el anticuerpo de cadena sencilla es un anticuerpo Fv de cadena sencilla.

32. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, que es un anticuerpo Fab.

33. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, que es un anticuerpo Fab'.

34. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, que es un anticuerpo $F(ab')_2$.

35. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, que es un anticuerpo completamente humano.

36. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 ó 27-29, que es un anticuerpo humanizado.

37. Composición que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36 y un portador farmacéuticamente aceptable.

38. Composición según la reivindicación 37 y al menos un agente para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un paciente, y en la que el al menos un agente se selecciona de: un miembro de la familia de geldanamicina de antibióticos de anisamicina; un antagonista de Src de homología 2 de Grb2; un modulador de Gab1; Src dominante negativo; un inhibidor de von-Hippel-Landau; un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE); un inhibidor de COX-2; Celebrex™ (celecoxib); Vioxx™ (rofecoxib); un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); un modulador de VEGF; un modulador de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); un modulador de factor de crecimiento epidérmico (EGF); un factor de crecimiento de queratinocitos (KGF); una molécula relacionada con KGF; un modulador de KGF; un modulador de metaloproteinasas de la matriz (MMP); IL-2; Proluekin; Herceptin; Rituxan; Zevalin; Erbitux; epratuzumab; un anticuerpo frente a OPGL; un inhibidor de Ang-2; un anticuerpo frente a VEGF-2; avastina; un agente antineoplásico; un agente antimitótico; un antimetabolito; y un sulfonato de alquilo.

39. Composición según la reivindicación 37 y al menos un agente para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido en un paciente, y en la que el al menos un agente se selecciona de: un miembro de la familia de geldanamicina de antibióticos de anisamicina; un antagonista de Src de homología 2 de Grb2; un modulador de Gab1; Src dominante negativo; un inhibidor de von-Hippel-Landau; un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE); un inhibidor de COX-2; Celebrex™ (celecoxib); Vioxx™ (rofecoxib); un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); un modulador de VEGF; un modulador de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); un modulador de factor de crecimiento epidérmico (EGF); un factor de

crecimiento de queratinocitos (KGF); una molécula relacionada con KGF; un modulador de KGF; un modulador de metaloproteinasas de la matriz (MMP); IL-2; Proluekin; Herceptin; Rituxan; Zevalin; Erbitux; epratuzumab; un anticuerpo frente a OPGL; un inhibidor de Ang-2; un anticuerpo frente a VEGF-2; avastina; un agente antineoplásico; un agente antimitótico; un antimetabolito; y un sulfonato de alquilo.

40. Composición según la reivindicación 37 para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un paciente.

41. Composición según la reivindicación 37 para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido en un paciente.

42. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36 y al menos un agente quimioterápico para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un paciente.

43. Anticuerpo según la reivindicación 42, en el que el método comprende la administración del anticuerpo antes de la administración del tratamiento quimioterápico.

44. Anticuerpo según la reivindicación 42, en el que el método comprende la administración del anticuerpo simultáneamente a la administración del tratamiento quimioterápico.

45. Anticuerpo según la reivindicación 42, en el que el método comprende la administración del anticuerpo posteriormente a la administración del tratamiento quimioterápico.

46. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36 y radioterapia para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un paciente.

47. Anticuerpo según la reivindicación 46, en el que el método comprende la administración del anticuerpo antes de la administración de la radioterapia.

48. Anticuerpo según la reivindicación 46, en el que el método comprende la administración del anticuerpo simultáneamente a la administración de la radioterapia.

49. Anticuerpo según la reivindicación 46, en el que el método comprende la administración del anticuerpo posteriormente a la administración de la radioterapia.

50. Método de detección del nivel de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36.

51. Polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de

- SEQ ID NO: 164,
- SEQ ID NO: 165;
- SEQ ID NO: 123;
- aminoácidos 495-556 de HGF humano; y
- aminoácidos 507-585 de HGF humano.

52. Método de obtención de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, que puede unirse a factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), que comprende administrar al menos un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de

- SEQ ID NO: 164;
- SEQ ID NO: 165;
- SEQ ID NO: 123;
- aminoácidos 495-556 de HGF humano; y
- aminoácidos 507-585 de HGF humano

a un animal no humano y obtener un anticuerpo que puede unirse a HGF del animal.

53. Célula huésped que comprende un primer polinucleótido que codifica para una cadena ligera y un segundo polinucleótido que codifica para una cadena pesada, en la que la cadena ligera y la cadena pesada forman un anticuerpo que puede unirse a factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el anticuerpo se selecciona de:

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 60, 70 y 80 y una cadena

pesada que comprende SEQ ID NO: 90, 100 y 110;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 61, 71 y 81 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 91, 101 y 111;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 62, 72 y 82 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 92, 102 y 112;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 63, 73 y 83 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 93, 103 y 113;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 64, 74 y 84 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 94, 104 y 114;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 65, 75 y 85 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 95, 105 y 115;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 66, 76 y 86 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 96, 106 y 116;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 67, 77 y 87 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 97, 107 y 117;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 68, 78 y 88 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 98, 108 y 118; y

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 69, 79 y 89 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 99, 109 y 119.

54. Célula huésped según la reivindicación 53, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 60, 70 y 80 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 90, 100 y 110.

55. Célula huésped según la reivindicación 53, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 61, 71 y 81 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 91, 101 y 111.

56. Célula huésped según la reivindicación 53, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 62, 72 y 82 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 92, 102 y 112.

57. Célula huésped según la reivindicación 53, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 63, 73 y 83 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 93, 103 y 113.

58. Célula huésped según la reivindicación 53, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 64, 74 y 84 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 94,104 y 114.

59. Célula huésped según la reivindicación 53, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 65, 75 y 85 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 95, 105 y 115.

60. Célula huésped según la reivindicación 53, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 66, 76 y 86 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 96, 106 y 116.

61. Célula huésped según la reivindicación 53, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 67, 77 y 87 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 97, 107 y 117.

62. Célula huésped según la reivindicación 53, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 68, 78 y 88 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 98, 108 y 118.

63. Célula huésped según la reivindicación 53, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 69, 79 y 89 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 99, 109 y 119.

64. Célula huésped según la reivindicación 53, en la que el anticuerpo se selecciona de:

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 desde el residuo 20 hasta el residuo 141;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 desde el residuo 20 hasta el residuo 137;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO: 28 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 desde el residuo 20 hasta el residuo 148;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 desde el residuo 20 hasta el residuo 144;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 desde el residuo 20 hasta el residuo 142;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 desde el residuo 20 hasta el residuo 140; y

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID'NO: 42 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 desde el residuo 20 hasta el residuo 139.

65. Célula huésped según la reivindicación 64, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 desde el residuo 20 hasta el residuo 141.

66. Célula huésped según la reivindicación 64, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 desde el residuo 20 hasta el residuo 137.

67. Célula huésped según la reivindicación 64, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 desde el residuo 20 hasta el residuo 139.

68. Célula huésped según la reivindicación 64, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 desde el residuo 20 hasta el residuo 148.

69. Célula huésped según la reivindicación 64, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 desde el residuo 20 hasta el residuo 139.

70. Célula huésped según la reivindicación 64, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 desde el residuo 20 hasta el residuo 144.

71. Célula huésped según la reivindicación 64, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 desde el residuo 20 hasta el residuo 142.

72. Célula huésped según la reivindicación 64, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 desde el residuo 20 hasta

el residuo 139.

73. Célula huésped según la reivindicación 64, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 desde el residuo 20 hasta el residuo 140.

74. Célula huésped según la reivindicación 64, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 desde el residuo 20 hasta el residuo 139.

75. Célula huésped según la reivindicación 72, en la que la cadena ligera comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44 y la cadena pesada comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

76. Célula huésped que comprende un primer polinucleótido que codifica para una cadena ligera y un segundo polinucleótido que codificada para una cadena pesada, en la que la cadena ligera y la cadena pesada forman un anticuerpo que puede unirse a un polipéptido de HGF quimérico de ser humano/ratón,

en la que el polipéptido quimérico comprende una molécula de HGF de ratón que tiene los aminoácidos 506-728 de HGF humano en lugar de la secuencia de ratón homóloga,

en la que el anticuerpo no se une significativamente a HGF de ratón y en la que el anticuerpo puede neutralizar la unión de HGF a c-Met.

77. Célula huésped según la reivindicación 76, en la que el polipéptido quimérico comprende una molécula de HGF de ratón que tiene los aminoácidos 507-585 de HGF humano en lugar de la secuencia de ratón homóloga.

78. Célula huésped que comprende un primer polinucleótido que codifica para una cadena ligera y un segundo polinucleótido que codifica para una cadena pesada, en la que la cadena ligera y la cadena pesada forman un anticuerpo que puede neutralizar la unión de HGF a c-Met y que compite por la unión a HGF con al menos un anticuerpo seleccionado de:

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 desde el residuo 20 hasta el residuo 141;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 desde el residuo 20 hasta el residuo 137;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 desde el residuo 20 hasta el residuo 148;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 desde el residuo 20 hasta el residuo 144;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 desde el residuo 20 hasta el residuo 142;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 desde el residuo 20 hasta el residuo 139;

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 desde el residuo 23 hasta el residuo 129 y una cadena pesada que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 41 desde el residuo 20 hasta el residuo 140; y

un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 desde el residuo 20 hasta el residuo 139.

79. Célula huésped según la reivindicación 78, en la que el anticuerpo compite por la unión a HGF con un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 desde el residuo 21 hasta el residuo 133 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 desde el residuo 20 hasta el residuo 142.

80. Célula huésped según la reivindicación 78, en la que el anticuerpo compite por la unión a HGF con un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 desde el residuo 21 hasta el residuo 128 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 desde el residuo 20 hasta el residuo 139.

81. Célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 53 a 80, en la que el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido están unidos operativamente de manera que codifican para un anticuerpo de cadena sencilla.

82. Célula huésped según la reivindicación 81, en la que el anticuerpo de cadena sencilla es un anticuerpo Fv de cadena sencilla.

83. Célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 53 a 80, que codifica para un anticuerpo Fab.

84. Célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 53 a 80, que codifica para un anticuerpo Fab'.

85. Célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 53 a 80, que codifica para un anticuerpo $F(ab')_2$.

86. Célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 53 a 80, que codifica para un anticuerpo completamente humano.

87. Célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 76-80, que es un anticuerpo humanizado.

88. Método de producción de un anticuerpo que puede unirse a factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), que comprende expresar un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido en una célula huésped aislada, en el que el primer polinucleótido codifica para una cadena ligera y el segundo polinucleótido codifica para una cadena pesada, en el que la cadena ligera y la cadena pesada forman un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36.

Figura 1A

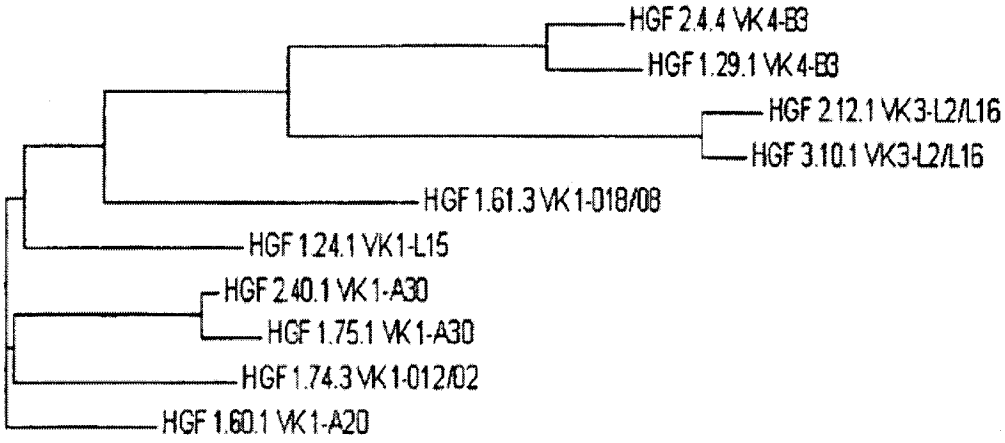

HGF 2.4.4 VK4-B3
HGF 1.29.1 VK4-B3
HGF 2.12.1 VK3-L2/L16
HGF 3.10.1 VK3-L2/L16
HGF 1.61.3 VK1-018/08
HGF 1.24.1 VK1-L15
HGF 2.40.1 VK1-A30
HGF 1.75.1 VK1-A30
HGF 1.74.3 VK1-012/02
HGF 1.60.1 VK1-A20

Figura 1B

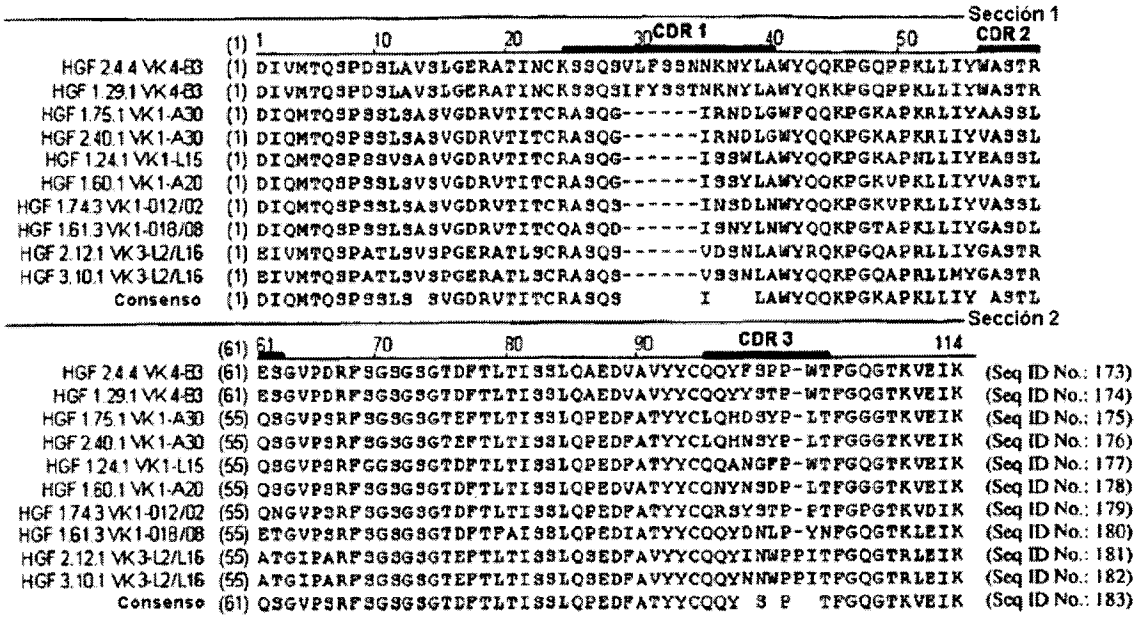

Sección 1
CDR 1
CDR 2
HGF 2.4.4 VK4-B3 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
HGF 1.29.1 VK4-B3 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIFYSSTNKNYLAWYQKKPGQPPKLLIYWASTR
HGF 1.75.1 VK1-A30 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQG------IRNDLGWFQQKPGKAPKRLIYAASSL
HGF 2.40.1 VK1-A30 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQG------IRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYVASSL
HGF 1.24.1 VK1-L15 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQG------ISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSL
HGF 1.60.1 VK1-A20 DIQMTQSPSSLSVSVGDRVTITCRASQG------ISSYLAWYQQKPGKVPKLLIYVASTL
HGF 1.74.3 VK1-012/02 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQS------INSDLNWYQQKPGKVPKLLIYVASSL
HGF 1.61.3 VK1-018/08 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQD------ISNYLNWYQQKPGTAPKLLIYGASDL
HGF 2.12.1 VK3-L2/L16 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQS------VDSNLAWYRQKPGQAPRLLIYGASTR
HGF 3.10.1 VK3-L2/L16 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQS------VSSNLAWYQQKPGQAPRLLMYGASTR
Consenso DIQMTQSPSSLS SVGDRVTITCRASQS I LAWYQQKPGKAPKLLIY ASTL
Sección 2
CDR 3
HGF 2.4.4 VK4-B3 ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYFSPP-WTFGQGTKVEIK (Seq ID No.: 173)
HGF 1.29.1 VK4-B3 ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTP-WTFGQGTKVEIK (Seq ID No.: 174)
HGF 1.75.1 VK1-A30 QSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHDSYP-LTFGGGTKVEIK (Seq ID No.: 175)
HGF 2.40.1 VK1-A30 QSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYP-LTFGGGTKVEIK (Seq ID No.: 176)
HGF 1.24.1 VK1-L15 QSGVPSRFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFP-WTFGQGTKVEIK (Seq ID No.: 177)
HGF 1.60.1 VK1-A20 QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQNYNSDP-LTFGGGTKVEIK (Seq ID No.: 178)
HGF 1.74.3 VK1-012/02 QNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQRSYSTP-FTFGPGTKVDIK (Seq ID No.: 179)
HGF 1.61.3 VK1-018/08 ETGVPSRFSGSGSGTDFTFAISSLQPEDIATYYCQQYDNLP-YNFGQGTKLEIK (Seq ID No.: 180)
HGF 2.12.1 VK3-L2/L16 ATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYINWPPITFGQGTRLEIK (Seq ID No.: 181)
HGF 3.10.1 VK3-L2/L16 ATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPITFGQGTRLEIK (Seq ID No.: 182)
Consenso QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQY S P TFGQGTKVEIK (Seq ID No.: 183)

Figura 2A

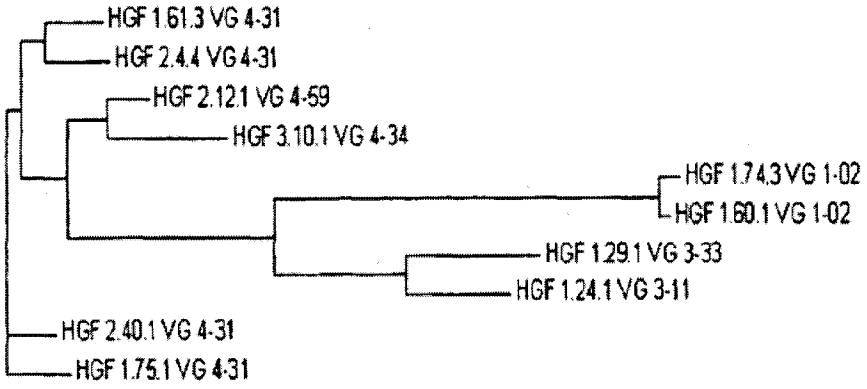

HGF 1.61.3 VG 4-31
HGF 2.4.4 VG 4-31
HGF 2.12.1 VG 4-59
HGF 3.10.1 VG 4-34
HGF 1.74.3 VG 1-02
HGF 1.60.1 VG 1-02
HGF 1.29.1 VG 3-33
HGF 1.24.1 VG 3-11
HGF 2.40.1 VG 4-31
HGF 1.75.1 VG 4-31

Figura 2B

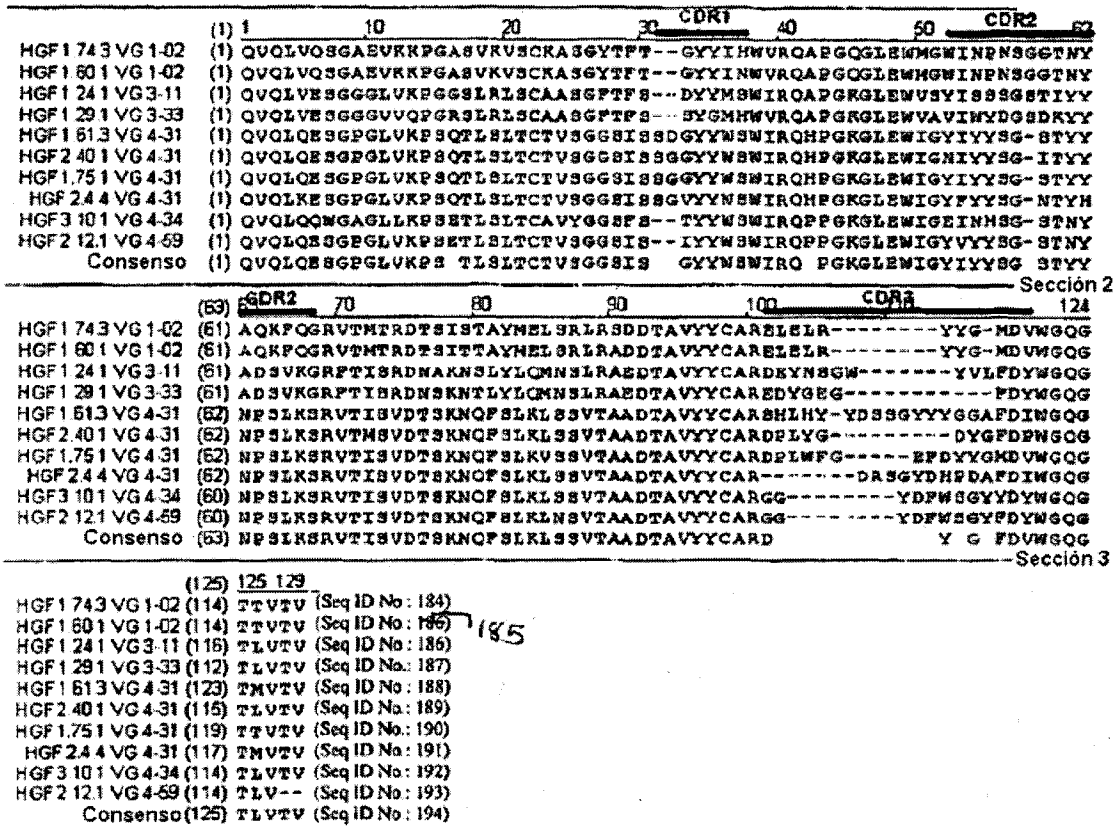

CDR1
CDR2
Sección 2
CDR3
Sección 3
HGF1 74.3 VG1-02
HGF1 60.1 VG1-02
HGF1 24.1 VG3-11
HGF1 29.1 VG3-33
HGF1 61.3 VG4-31
HGF2 40.1 VG4-31
HGF1.75.1 VG4-31
HGF 2.4.4 VG4-31
HGF3 10.1 VG4-34
HGF2 12.1 VG4-59
Consenso
(Seq ID No : 184)
(Seq ID No : 185)
(Seq ID No : 186)
(Seq ID No : 187)
(Seq ID No : 188)
(Seq ID No : 189)
(Seq ID No : 190)
(Seq ID No : 191)
(Seq ID No : 192)
(Seq ID No : 193)
(Seq ID No : 194)

Figura 3

Región V de la cadena ligera de 1.24.1 frente a HGF (Vk, 1-L15)

ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGTTCCCAGGTTCCAGATGC
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT
TGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCT
AACCTCCTGATCTATGAAGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCGGCGGCAGTGGA
TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGT
CAACAGGCTAACGGTTTCCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 01)

Región V de la cadena pesada de 1.24.1 frente a HGF (Vh, H3-11)-región C de hulgG2)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTTGTTGCTATTATAAAAGGTGTCCAGTGTCAGGTGCAG
CTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG
GTTTCATACATTAGTAGTAGTGGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACC
ATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG
GCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGAGTATAACAGTGGCTGGTACGTCCTCTTTGACTACTGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTAGT (SEQ ID NO: 02)

Región V de la cadena ligera de 1.29.1 frente a HGF (Vk, 4-B3)

ATGGTGTTGCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGATGCCTACGGAGACATC
GTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAG
TCCAGCCAGAGTATTTTTTACAGCTCCACCAATAAGAACTACTTAGCTTGGTATCAGAAGAAACCG
GGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGGTTC
AGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCA
GTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACTCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATC
AAA (SEQ ID NO: 03)

Región V de la cadena pesada de 1.29.1 frente a HGF (Vh, 3-33)-región C de hulgG2

ATGGAGTTTGGGCTGAACTGGGTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCAGGTGCAG
CTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCT
GGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGCAAGGGACTGGAGTGG
GTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTGATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACC
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG
GCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGACTACGGCGAGGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCTAGT (SEQ ID NO: 04)

Región V de la cadena ligera de 1.60.1 frente a HGF (Vk, 1-A20)

ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGACTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGATACCAGATGT
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGTATCTGTCGGAGACAGAGTCACCATCACT
TGCCGGGCGAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCT
AAGCTCCTGATCTATGTTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCGTCTCGGTTCAGTGGCAGTGGA
TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGT
CAAAACTATAACAGTGACCCGCTCACTTTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 05)

Figura 3 (continuación)

Región V de la cadena pesada de 1.60.1 frente a HGF (Vh, H1-02)- región C de hulgG2

ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCCCACTCCCAGGTGCAG
CTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT
GGATACACCTTCACCGGCTACTATATAAACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGG
ATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACC
ATGACCAGGGACACGTCCATCACCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGAGCTGACGACACG
GCCGTGTACTACTGTGCGAGAGAACTGGAACTACGCTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCTAGT **(SEQ ID NO: 06)**

Región V de la cadena ligera de 1.61.3 frente a HGF (Vk, 1-018/08)

ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCTCAGGTGCCAGATGT
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT
TGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGCAACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACAGCCCCT
AAACTCCTGATCTACGGTGCATCCGATTTGGAAACGGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGAAGTGGA
TCTGGGACAGATTTTACTTTCGCCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGT
CAACAGTATGATAATCTCCCGTACAATTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA **(Seq. ID NO: 07)**

Región V de la cadena pesada de 1.61.3 frente a HGF (Vh, 4-31)- región C de hulgG2

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG
CTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCT
GGTGGCTCCATCAGCAGTGATGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTG
GAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTC
ACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGAC
ACGGCCGTCTATTACTGTGCGAGATCCCACCTTCATTACTATGATAGTAGTGGTTATTACTACGGC
GGTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTAGT **(SEQ ID NO: 08)**

Región V de la cadena ligera de 1.74.3 frente a HGF (Vk, 1-012/02)

ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTGCCAGATGT
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAACAGCGATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCCT
AAGCTCCTGATCTATGTTGCATCCAGTTTGCAAAATGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGA
TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGT
CAACGGAGTTACAGTACCCCTCCCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA **(SEQ ID NO: 09)**

Región V de la cadena pesada de 1.74.3 frente a HGF (Vh, VG1-02)- región C de hulgG2

ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCCCACTCCCAGGTGCAG
CTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT
GGATACACCTTCACCGGCTACTATATACACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGG
ATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACC
ATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACG
GCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAACTGGAACTACGCTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCTAGT **(SEQ ID NO: 10)**

Figura 3 (continuación)

Región V de la cadena ligera de 1.75.1 frente a HGF (Vk, 1-A30)

ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGTTCCCAGGTGCCAGGTGT
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCT
AAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGA
TCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGT
CTACAGCATGATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 11)

Región V de la cadena pesada de 1.75.1 frente a HGF (Vh, VG4-31)-región C de hulgG2

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG
CTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCT
GGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTG
GAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTT
ACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGGTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGACCCACTATGGTTCGGGGAGTTCGACTACTACGGTATGGAC
GTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTAGT (SEQ ID NO: 12)

Región V de la cadena ligera de 2.4.4 frente a HGF (Vk, 4-B3)

ATGGTGTTGCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGGGACATC
GTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAG
TCCAGCCAGAGTGTTTTATTCAGCTCCAACAATAAGAATTACTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCA
GGACAGCCTCCTAAGTTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTC
AGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCA
GTTTATTACTGTCAGCAATATTTTAGTCCTCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATC
AAA (SEQ ID NO: 13)

Región V de la cadena pesada de 2.4.4 frente a HGF (Vh, VG4-31)-región C de hulgG2

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGATCCTGTCCCAGGTGCAG
CTGAAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCT
GGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGTTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTG
GAGTGGATTGGGTACTTCTATTATAGTGGGAACACCTACCACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTG
ACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGTAGTGGCTACGATCACCCTGATGCTTTTGATATCTGG
GGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTAGT (SEQ ID NO: 14)

Región V de la cadena ligera de 2.12.1 frente a HGF (Vk, 3-L2/L16)

ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACTGGAGAAATA
GTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG
GCCAGTCAGAGTGTTGACAGCAACTTAGCCTGGTACCGGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC
CTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG
ACTGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAG
TATATTAACTGGCCTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (SEQ ID NO: 15)

Figura 3 (continuación)

Región V de la cadena pesada de 2.12.1 frente a HGF (Vh4-59)-región C de huIgG2

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG
CTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCT
GGTGGCTCCATCAGTATTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGG
ATTGGGTATGTCTATTACAGTGGGAGCACCAATTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATA
TCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGATACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGA
ACCCTGGTCACCGTCTCTAGT **(SEQ ID NO: 16)**

Región V de la cadena ligera de 2.40.4 frente a HGF (Vk, 1A20)

ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGTTCCCAGGTGCCAGGTGT
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCT
AAGCGCCTGATCTATGTTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGA
TCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGT
CTACAACATAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA **(SEQ ID NO: 17)**

Región V de la cadena pesada de 2.40.1 frente a HGF (Vh, VG 4-31)-región C de huIgG2

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG
CTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCT
GGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGTCAGCACCCAGGGAAGGGCCTG
GAGTGGATTGGGAACATCTATTACAGTGGGATCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTT
ACCATGTCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACTGCCGCGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCCCCTCTACGGTGACTACGGGTTCGACCCCTGGGGCCAG
GGAACCCTGGTCACCGTCTCTAGT **(SEQ ID NO: 18)**

Región V de la cadena ligera de 3.10.1 frente a HGF (Vk, 3-L2/L16)

ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACTGGAGAAATA
GTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCTGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG
GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC
CTCATGTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG
ACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAG
TATAATAACTGGCCTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA **(SEQ ID NO: 19)**

Región V de la cadena pesada de 3.10.1 frente a HGF (Vh, VG 4-34)-región C de huIgG1

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG
CTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTAT
GGTGGGTCCTTCAGTACTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG
ATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATA
TCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCT
GTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGGTACGATTTTTGGAGTGGTTATTATGACTACTGGGGCCAGGGA
ACCCTGGTCACCGTCTCTAGT **(SEQ ID NO: 20)**

Figura 3 (continuación)

Región constante de kappa humana

CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT
GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT
AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
AGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA
(SEQ ID NO: 21)

Región constante de IgG1 humana

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA
GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGC
GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG
CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCA
CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC
AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
TGA (SEQ ID NO: 22)

Región constante de IgG2 humana

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACA
GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGC
GCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAG
CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCCCA
GCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC
TCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAAC
AGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC
AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ
ID NO: 23)

Figura 4

Región V de la cadena ligera de 1.21.1 frente a HGF (Vk, 1-L15)

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAP
NLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVEIK
(SEQ ID NO: 24)

Región V de la cadena pesada de 1.24.1 frente a HGF (Vh, H3-11)-región C de hulgG2

MEFGLSWVFLVAIIKGVQCQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEW
VSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 25)

Región V de la cadena ligera de 1.29.1 frente a HGF (Vk, 4-B3)

MVLQTQVFISLLLWISDAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIFYSSTNKNYLAWYQKKP
GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEI
K (SEQ ID NO: 26)

Región V de la cadena pesada de 1.29.1 frente a HGF (Vh, 3-33)-región C de hulgG2

MEFGLNWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEW
VAVIWYDGSDKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDYGEGFDYWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO: 27)

Región V de la cadena ligera de 1.60.1 frente a HGF (Vk, 1-A20)

MDMRVPAQLLGLLLLWLPDTRCDIQMTQSPSSLSVSVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKVP
KLLIYVASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQNYNSDPLTFGGGTKVEIK
(SEQ ID NO: 28)

Región V de la cadena pesada de 1.60.1 frente a HGF (Vh, H1-02)-región C de hulgG2

MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYINWVRQAPGQGLEW
MGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSITTAYMELSRLRADDTAVYYCARELELRYYGMDVWGQG
TTVTVSS (SEQ ID NO: 29)

Región V de la cadena ligera de 1.61.3 frente a HGF (Vk, 1-018/08)

MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGTAP
KLLIYGASDLETGVPSRFSGSGSGTDFTFAISSLQPEDIATYYCQQYDNLPYNFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO: 30)

Región V de la cadena pesada de 1.61.3 frente a HGF (Vg, 4-31)-región C de hulgG2

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSDGYYWSWIRQHPGKGL
EWIGYIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSHLHYYDSSGYYYG
GAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO: 31)

Región V de la cadena ligera de 1.74.3 frente a HGF (Vk, 1-012/02)

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSDLNWYQQKPGKVP
KLLIYVASSLQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQRSYSTPPTFGPGTKVDIK
(SEQ ID NO: 32)

Región V de la cadena pesada de 1.74.3 frente a HGF (Vh, VG1-02)-región C de hulgG2

MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYIHWVRQAPGQGLEW
MGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARELELRYYGMDVWGQG
TTVTVSS (SEQ ID NO: 33)

Figura 4 (continuación)

Región V de la cadena ligera de 1.75.1 frente a HGF (Vk, 1-A30)

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWFQQKPGKAP
KRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHDSYPLTFGGGTKVEIK
(SEQ ID NO: 34)

Región V de la cadena pesada de 1.75.1 frente a HGF (Vh, VG4-31)-región C de hulgG2

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGL
EWIGYIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKVSSVTAADTAVYYCARDPLWFGEFDYYGMD
VWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 35)

Región V de la cadena ligera de 2.4.4 frente a HGF (Vk, 4-B3)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNYLAWYQQKP
GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYFSPPWTFGQGTKVEI
K (SEQ ID NO: 36)

Región V de la cadena pesada de 2.4.4 frente a HGF (Vh, VG 4-31)-región C de hulgG2

MKHLWFFLLLVAAPRWILSQVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGVYYWSWIRQHPGKGL
EWIGYFYYSGNTYHNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSGYDHPDAFDIW
GQGTMVTVSS (SEQ ID NO: 37)

Región V de la cadena ligera de 2.12.1 frente a HGF (Vk, 3-L2/L16)

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVDSNLAWYRQKPGQAPRL
LIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYINWPPITFGQGTRLEIK
(SEQ ID NO: 38)

Región V de la cadena pesada de 2.12.1 frente a HGF (Vg, 4-59)-región C de hulgG2

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISIYYWSWIRQPPGKGLEW
IGYVYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCARGGYDFWSGYFDYWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO: 39)

Región V de la cadena ligera de 2.40.1 frente a HGF (Vk, 1A20)

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAP
KRLIYVASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGGGTKVEIK
(SEQ ID NO: 40)

Región V de la cadena pesada de 2.40.1 frente a HGF (Vh, VG 4-31)-región C de hulgG2

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGL
EWIGNIYYSGITYYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDPLYGDYGFDPWGQ
GTLVTVSS (SEQ ID NO: 41)

Región V de la cadena ligera de 3.10.1 frente a HGF (Vk, 3-L2/L16)

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRL
LMYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPITFGQGTRLEIK
(SEQ ID NO: 42)

Región V de la cadena pesada de 3.10.1 frente a HGF (Vh, VG 4-34)-región C de hulgG1

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSTYYWSWIRQPPGKGLEW
IGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYDFWSGYYDYWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO: 43)

Figura 4 (continuación)

Región constante de kappa humana

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC **(SEQ ID NO: 44)**

Región constante de IgG1 humana

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 45)

Región constante de IgG2 humana

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 46)

Figura 5A

Secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera para CDR1, CDR2 y CDR3

Anticuerpo	CDR1	CDR2	CDR3
1.24.1	RASQGISSWLA (SEQ ID NO. 60)	EASSLQS (SEQ ID NO. 70)	QQANGFPWT (SEQ ID NO. 80)
1.29.1	KSSQSIFYSSTNKNYLA (SEQ ID NO. 61)	WASTRES (SEQ ID NO. 71)	QQYYSTPWT (SEQ ID NO. 81)
1.60.1	RASQGISSYLA (SEQ ID NO. 62)	VASTLQS (SEQ ID NO. 72)	QNYNSDPLT (SEQ ID NO. 82)
1.61.3	QASQDISNYLN (SEQ ID NO. 63)	GASDLET (SEQ ID NO. 73)	QQYDNLPYN (SEQ ID NO. 83)
1.74.3	RASQSINSDLN (SEQ ID NO. 64)	VASSLQN (SEQ ID NO. 74)	QRSYSTPPT (SEQ ID NO. 84)
1.75.1	RASQGIRNDLG (SEQ ID NO. 65)	AASSLQS (SEQ ID NO. 75)	LQHDSYPLT (SEQ ID NO. 85)
2.4.4	KSSQSVLFSSNNKNYLA (SEQ ID NO. 66)	WASTRES (SEQ ID NO. 76)	QQYFSPPWT (SEQ ID NO. 86)
2.12.1	RASQSVDSNLA (SEQ ID NO. 67)	GASTRAT (SEQ ID NO. 77)	QQYINWPPIT (SEQ ID NO. 87)
2.40.1	RASQGIRNDLG (SEQ ID NO. 68)	VASSLQS (SEQ ID NO. 78)	LQHNSYPLT (SEQ ID NO. 88)
3.10.1	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO. 69)	GASTRAT (SEQ ID NO. 79)	QQYNNWPPIT (SEQ ID NO. 89)

Secuencia consenso de CDR1 de cadena ligera (CDR1a) (SEQ ID NO: 166): a b c d e f g h i j k l m n o p q, en la que el aminoácido a se selecciona de lisina, arginina o glutamina; el aminoácido b se selecciona de serina o alanina; el aminoácido c es serina, el aminoácido d es glutamina; el aminoácido e se selecciona de serina, glicina o ácido aspártico; el aminoácido f se selecciona de valina o isoleucina o no está presente; el aminoácido g se selecciona de leucina o fenilalanina o no está presente; el aminoácido h se selecciona de fenilalanina o tirosina o no está presente; el aminoácido i es serina o no está presente; el aminoácido j es serina o no está presente; el aminoácido k se selecciona de asparagina, treonina o no está presente; el aminoácido l se selecciona de asparagina, isoleucina o valina; el aminoácido m se selecciona de lisina, arginina, asparagina o ácido aspártico; el aminoácido n se selecciona de asparagina o serina; el aminoácido o se selecciona de tirosina, ácido aspártico, triptófano asparagina; el aminoácido p es leucina; y el aminoácido q se selecciona de alanina, glicina o asparagina

Secuencia consenso de CDR2 de cadena ligera (CDR2a) (SEQ ID NO: 167): r s t u v w x, en la que el aminoácido r se selecciona de triptófano, alanina, valina, ácido glutámico o glicina; el aminoácido s es alanina, el aminoácido t es serina, el aminoácido u se selecciona de treonina, serina o ácido aspártico; el aminoácido v se selecciona de arginina o leucina; el aminoácido w se selecciona de ácido glutámico, glutamina o alanina; y el aminoácido x se selecciona de serina, asparagina o treonina

Secuencia consenso de CDR3 de cadena ligera (CDR3a) (SEQ ID NO: 168): y z a' b' c' d' e' f' g' h', en la que el aminoácido y se selecciona de glutamina o leucina; el aminoácido z se selecciona de glutamina, asparagina o arginina; el aminoácido a' se selecciona de tirosina, histidina, alanina o serina; el aminoácido b' se selecciona de fenilalanina, tirosina, ácido aspártico, asparagina o isoleucina; el aminoácido c' se selecciona de serina, glicina o asparagina; el aminoácido d' se selecciona de prolina, tirosina, treonina, fenilalanina, ácido aspártico, leucina o triptófano; el aminoácido e' es prolina; el aminoácido f' es prolina o no está presente; el aminoácido g' es triptófano, leucina, prolina, tirosina o isoleucina; y el aminoácido h' es treonina o asparagina

Figura 5B

Secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada para CDR1, CDR2 y CDR3

Anticuerpo	CDR1	CDR2	CDR3
1.24.1	DYYMS (SEQ ID NO. 90)	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO. 100)	DEYNSGWYVLFDY (SEQ ID NO. 110)
1.29.1	SYGMH (SEQ ID NO. 91)	VIWYDGSDKYYADSVKG (SEQ ID NO. 101)	EDYGEGFDY (SEQ ID NO. 111)
1.60.1	GYYIN (SEQ ID NO. 92)	WINPNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO. 102)	ELELRYYGMDV (SEQ ID NO. 112)
1.61.3	SDGYYWS (SEQ ID NO. 93)	YIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO. 103)	SHLHYYDSSGYYYGGAFDI (SEQ ID NO. 113)
1.74.3	GYYIH (SEQ ID NO. 94)	WINPNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO. 104)	ELELRYYGMDV (SEQ ID NO. 114)
1.75.1	SGGYYWS (SEQ ID NO. 95)	YIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO. 105)	DPLWFGEFDYYGMDV (SEQ ID NO. 115)
2.4.4	SGVYYWS (SEQ ID NO. 96)	YFYYSGNTYHNPSLKS (SEQ ID NO. 106)	DRSGYDHPDAFDI (SEQ ID NO. 116)
2.12.1	IYYWS (SEQ ID NO. 97)	YVYYSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO. 107)	GGYDFWSGYFDY (SEQ ID NO. 117)
2.40.1	SGGYYWS (SEQ ID NO. 98)	NIYYSGITYYNPSLKS (SEQ ID NO. 108)	DPLYGDYGFDP (SEQ ID NO. 118)
3.10.1	TYYWS (SEQ ID NO. 99)	EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO. 109)	GGYDFWSGYYDY (SEQ ID NO. 119)

Secuencia consenso de CDR1 de cadena pesada (CDR1b) (SEQ ID NO: 169): a b c d e f g, en la que el aminoácido a es serina o no está presente; el aminoácido b se selecciona de ácido aspártico o glicina, o no está presente; el aminoácido c se selecciona de ácido aspártico, glicina, serina, valina, treonina o isoleucina; el aminoácido d es tirosina; el aminoácido e se selecciona de tirosina o glicina; el aminoácido f se selecciona de isoleucina, metionina o triptófano; y el aminoácido g se selecciona de histidina, asparagina o serina

Secuencia consenso de CDR2 de cadena pesada (CDR2b) (SEQ ID NO: 170): h i j k l m n o p q r s t u v w x, en la que el aminoácido h se selecciona de triptófano, tirosina, valina, asparagina o ácido glutámico; el aminoácido i se selecciona de isoleucina, fenilalanina o valina; el aminoácido j se selecciona de asparagina, serina, triptófano o tirosina; el aminoácido k se selecciona de prolina, serina, tirosina o histidina; el aminoácido l se selecciona de asparagina, serina o ácido aspártico; el aminoácido m se selecciona de serina o glicina; el aminoácido n se selecciona de glicina o serina, o no está presente; el aminoácido o se selecciona de glicina, treonina, ácido aspártico, serina, isoleucina o asparagina; el aminoácido p se selecciona de treonina, isoleucina o lisina; el aminoácido q se selecciona de asparagina o tirosina; el aminoácido r se selecciona de tirosina o histidina; el aminoácido s se selecciona de alanina o asparagina; el aminoácido t se selecciona de glutamina, ácido aspártico o prolina; el aminoácido u se selecciona de lisina o serina; el aminoácido v se selecciona de fenilalanina, valina o leucina; el aminoácido w se selecciona de glutamina o lisina y el aminoácido x se selecciona de glicina o serina

Secuencia consenso de CDR3 de cadena pesada (CDR3b) (SEQ ID NO: 171): y z a' b' c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' m' n' o' p' q' r', en la que el aminoácido y se selecciona de ácido glutámico, ácido aspártico, serina o glicina, o no está presente; el aminoácido z se selecciona de leucina, ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, prolina o glicina, o no está presente; el aminoácido a' se selecciona de ácido glutámico, tirosina o leucina, o no está presente; el aminoácido b' se selecciona de leucina, asparagina, glicina, histidina, tirosina o triptófano, o no está presente; el aminoácido c' se selecciona de arginina, serina, ácido glutámico, tirosina, glicina o fenilalanina, o no está presente; el aminoácido d' es glicina o no está presente; el aminoácido e' se selecciona de triptófano o tirosina, o no está presente; el aminoácido f' es ácido aspártico o no está presente; el aminoácido g' se selecciona de serina o arginina, o no está presente; el aminoácido h' es serina o no está presente; el aminoácido i' se selecciona de glicina o tirosina, o no está presente; el aminoácido j' se selecciona de tirosina, ácido glutámico o ácido aspártico, o no está presente; el aminoácido k' se selecciona de tirosina, fenilalanina o ácido aspártico, o no está presente; el aminoácido l' se selecciona de tirosina, ácido aspártico, histidina o triptófano, o no está presente; el aminoácido m' se selecciona de tirosina, glicina, ácido aspártico, prolina o serina, o no está presente; el aminoácido n' se selecciona de glicina, valina, tirosina o ácido aspártico, o no está presente; el aminoácido o' se selecciona de leucina, alanina, glicina o tirosina, o no está presente; el aminoácido p' se selecciona de metionina, fenilalanina o tirosina; el aminoácido q' es ácido aspártico y el aminoácido r' se selecciona de valina, tirosina, isoleucina o prolina

Figura 6A

ID	~Ko (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
3.10.1	4,7E-10	6,5E+04	3,0E-05
2.4.4	9,9E-11	2,7E+05	2,7E-05
2.12.1	2,2E-10	1,3E+05	2,8E-05
1.29.1	7,9E-10	6,2E+04	4,8E-05
1.75.1	7,8E-10	3,6E+04	2,8E-05
1.74.3	3,6E-10	1,3E+05	4,7E-05

Figura 6B

ID	K_D (pM)
2.4.4	< 10
1.29.1	34 +/- 15
1.74.2	41 +/- 13
2.12.1	54 +/- 7

Figura 7

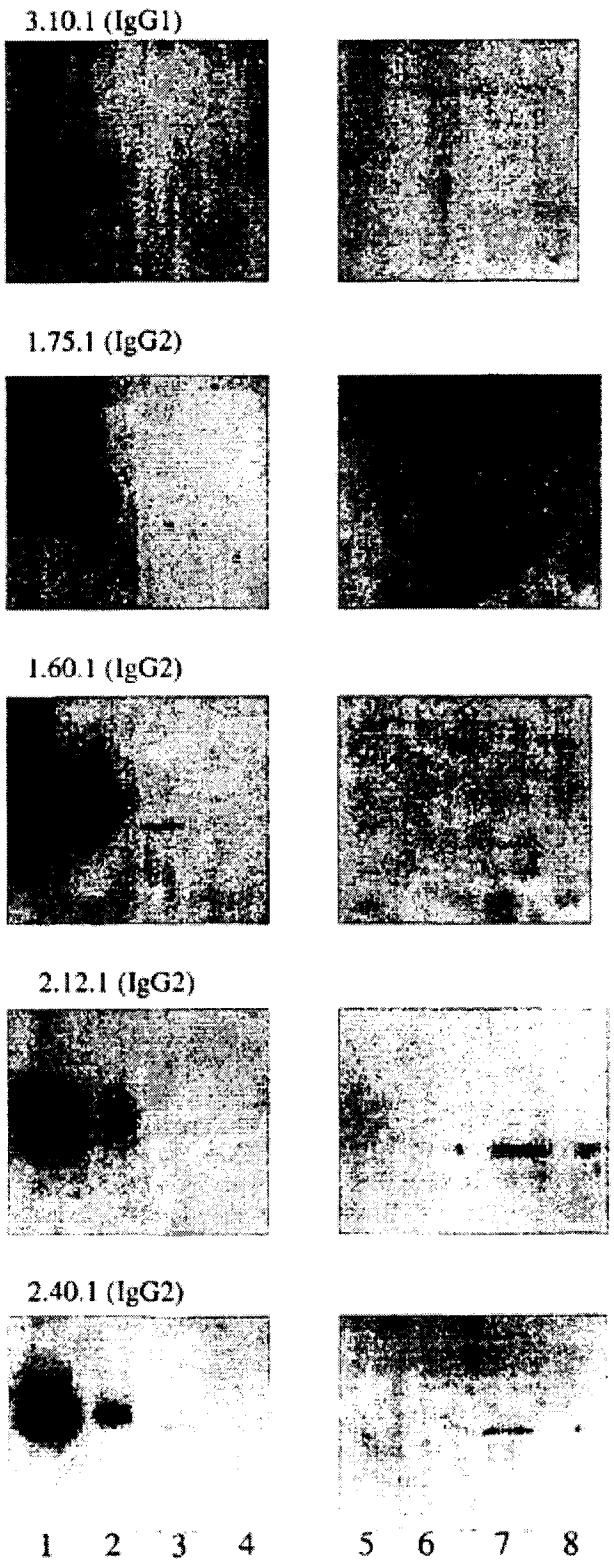


Figura 7 (continuación)

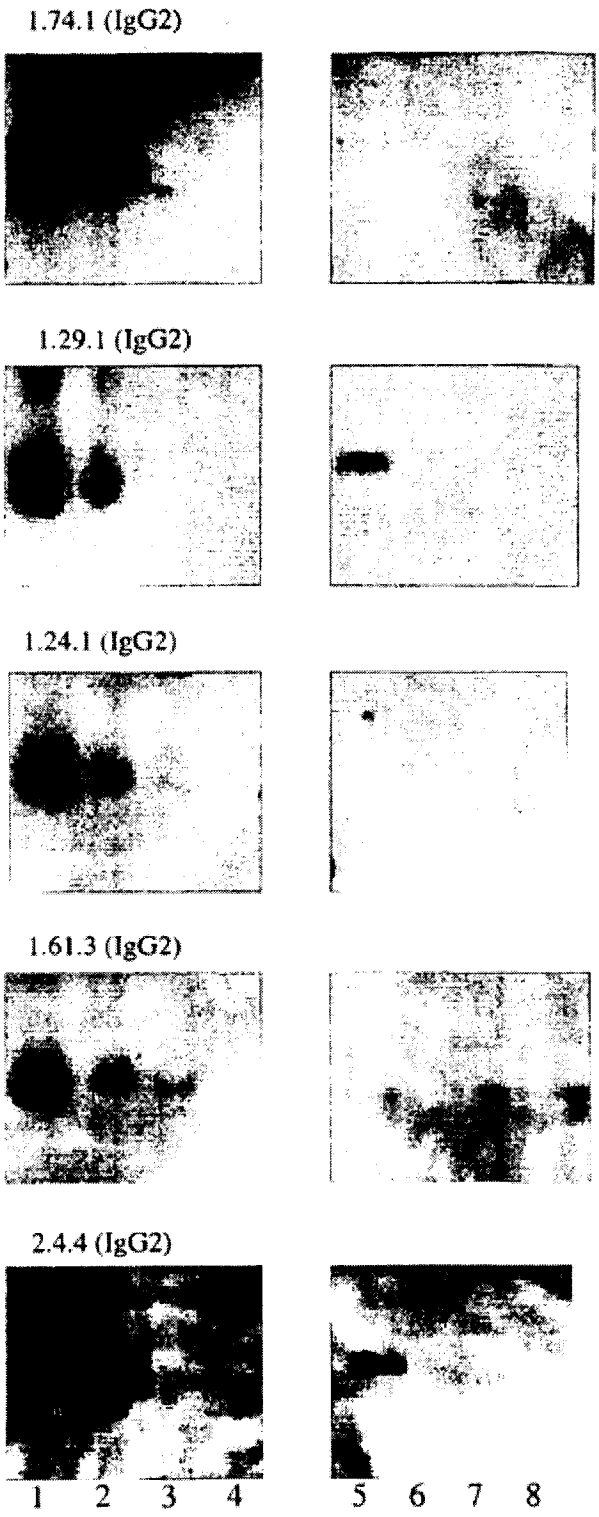


Figura 8

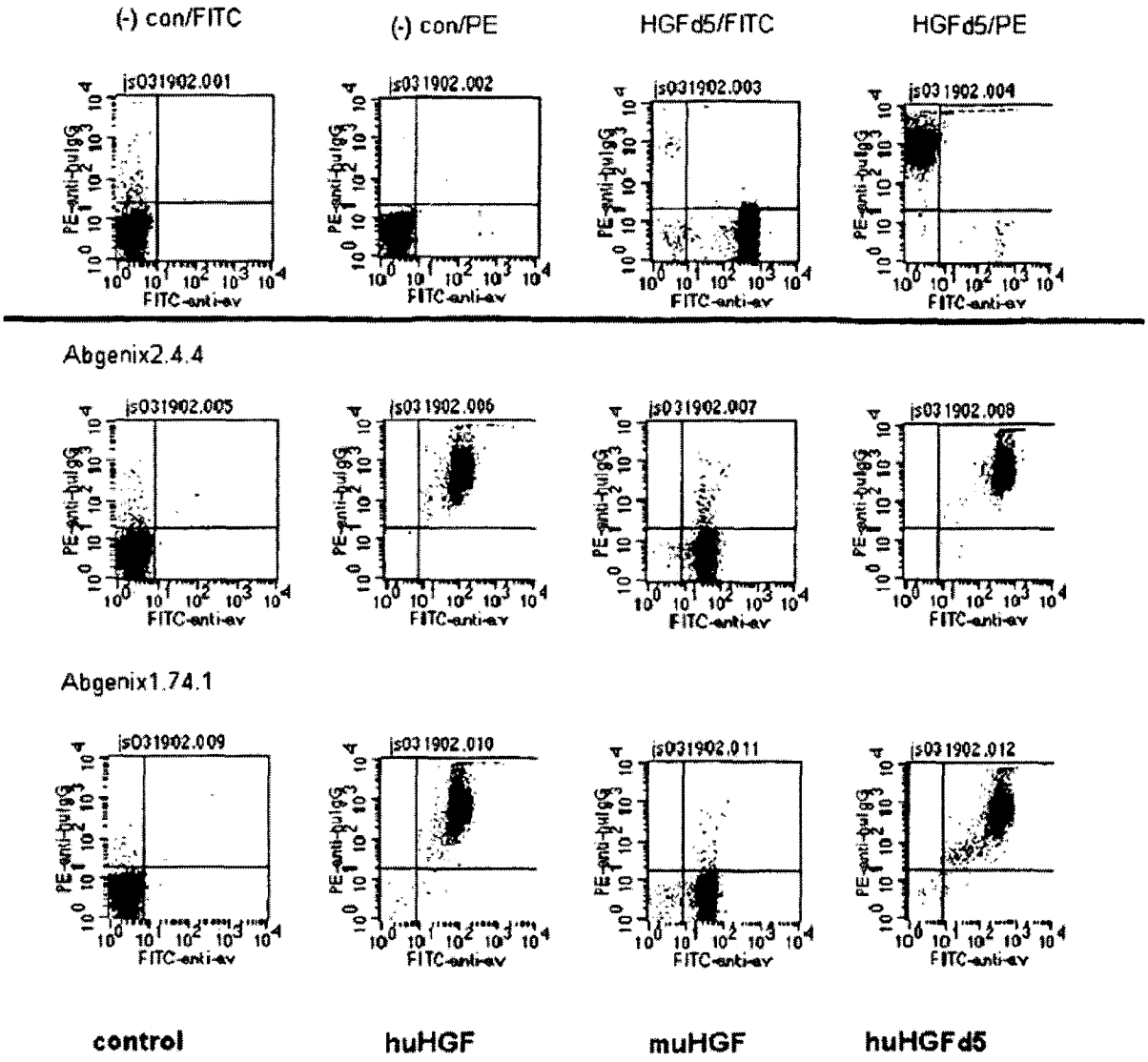

(-) con/FITC
(-) con/PE
HGFd5/FITC
HGFd5/PE
js031902.001
js031902.002
js031902.003
js031902.004
Abgenix2.4.4
js031902.005
js031902.006
js031902.007
js031902.008
Abgenix1.74.1
js031902.009
js031902.010
js031902.011
js031902.012
PE-anti-hulgG
FITC-anti-ev
control
huHGF
muHGF
huHGFd5

Figura 8 (continuación)

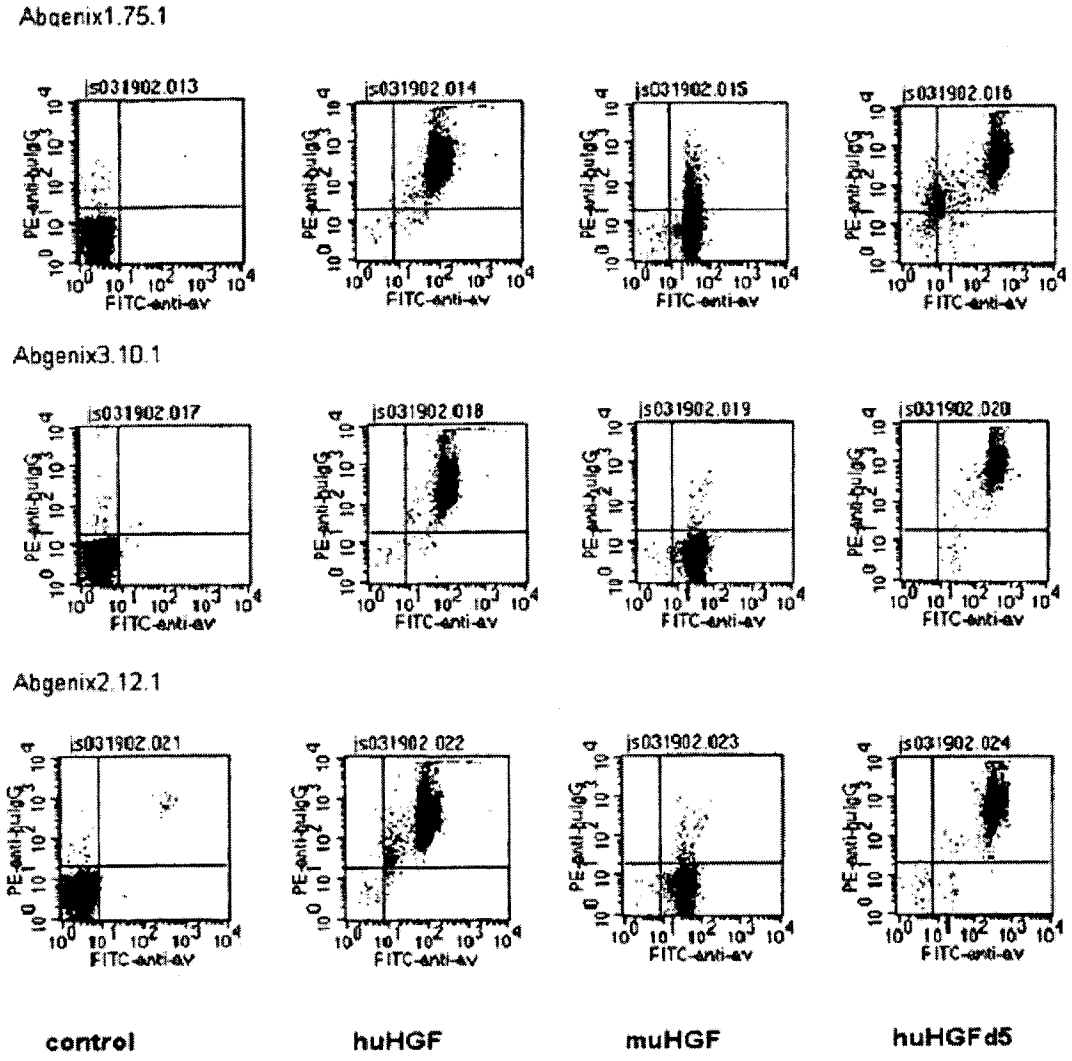


Figura 9A

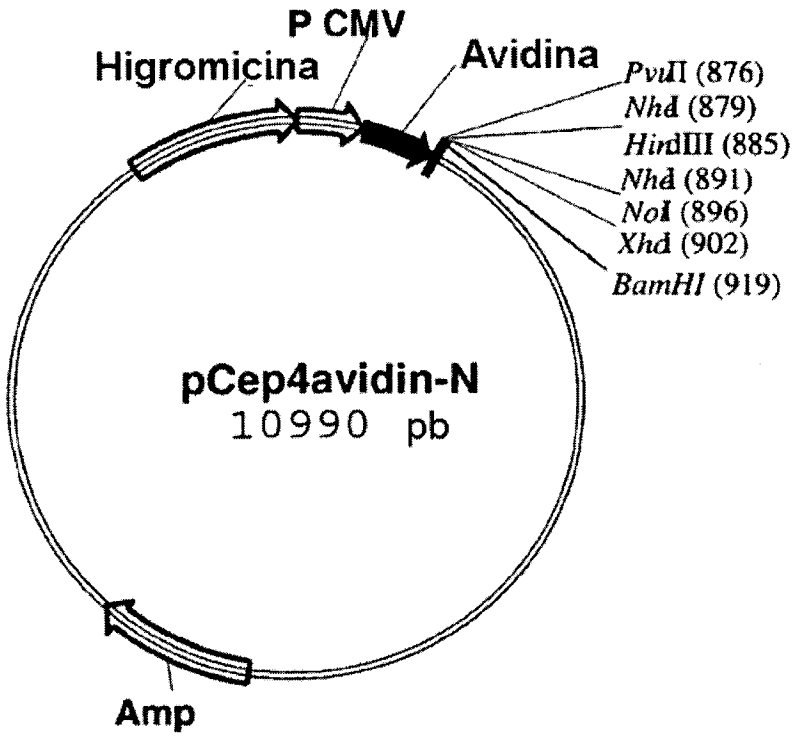

P CMV
Higromicina
Avidina
PvuII (876)
NheI (879)
HindIII (885)
NheI (891)
NotI (896)
XhoI (902)
BamHI (919)
pCep4avidin-N
10990 pb
Amp

Figura 9B

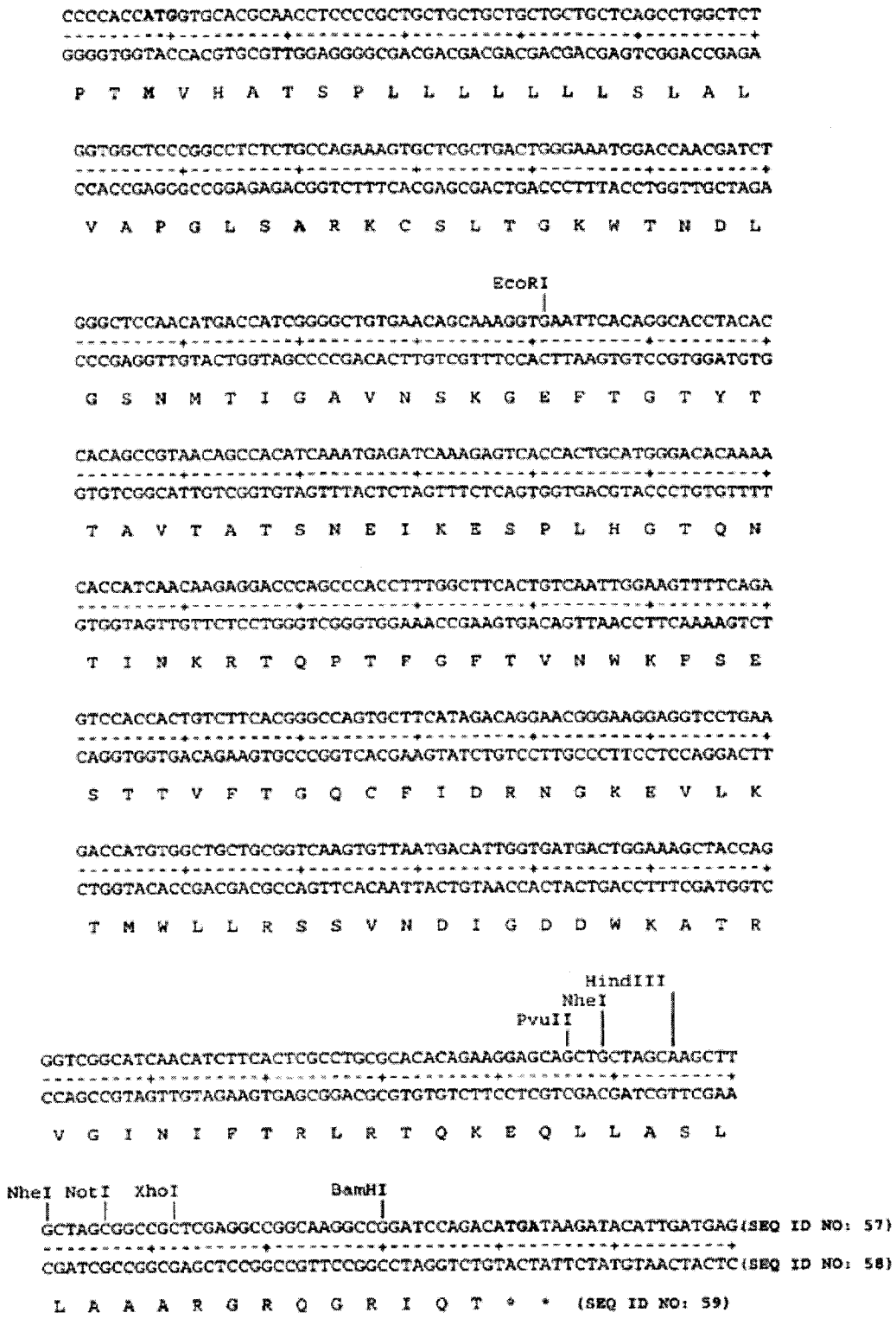

CCCCACCATGGTGCACGCAACCTCCCCGCTGCTGCTGCTGCTGCTCAGCCTGGCTCT
GGGGTGGTACCACGTGCGTTGGAGGGGCGACGACGACGACGACGAGTCGGACCGAGA
P T M V H A T S P L L L L L L L S L A L
GGTGGCTCCCGGCCTCTCTGCCAGAAAGTGCTCGCTGACTGGGAAATGGACCAACGATCT
CCACCGAGGGCCGGAGAGACGGTCTTTCACGAGCGACTGACCCTTTACCTGGTTGCTAGA
V A P G L S A R K C S L T G K W T N D L
EcoRI
GGGCTCCAACATGACCATCGGGGCTGTGAACAGCAAAGGTGAATTCACAGGCACCTACAC
CCCGAGGTTGTACTGGTAGCCCCGACACTTGTCGTTTCCACTTAAGTGTCCGTGGATGTG
G S N M T I G A V N S K G E F T G T Y T
CACAGCCGTAACAGCCACATCAAATGAGATCAAAGAGTCACCACTGCATGGGACACAAAA
GTGTCGGCATTGTCGGTGTAGTTTACTCTAGTTTCTCAGTGGTGACGTACCCTGTGTTTT
T A V T A T S N E I K E S P L H G T Q N
CACCATCAACAAGAGGACCCAGCCCACCTTTGGCTTCACTGTCAATTGGAAGTTTTCAGA
GTGGTAGTTGTTCTCCTGGGTCGGGTGGAAACCGAAGTGACAGTTAACCTTCAAAAGTCT
T I N K R T Q P T F G F T V N W K F S E
GTCCACCACTGTCTTCACGGGCCAGTGCTTCATAGACAGGAACGGGAAGGAGGTCCTGAA
CAGGTGGTGACAGAAGTGCCCGGTCACGAAGTATCTGTCCTTGCCCTTCCTCCAGGACTT
S T T V F T G Q C F I D R N G K E V L K
GACCATGTGGCTGCTGCGGTCAAGTGTTAATGACATTGGTGATGACTGGAAAGCTACCAG
CTGGTACACCGACGACGCCAGTTCACAATTACTGTAACCACTACTGACCTTTCGATGGTC
T M W L L R S S V N D I G D D W K A T R
HindIII
NheI
PvuII
GGTCGGCATCAACATCTTCACTCGCCTGCGCACACAGAAGGAGCAGCTGCTAGCAAGCTT
CCAGCCGTAGTTGTAGAAGTGAGCGGACGCGTGTGTCTTCCTCGTCGACGATCGTTCGAA
V G I N I F T R L R T Q K E Q L L A S L
NheI NotI XhoI BamHI
GCTAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAG (SEQ ID NO: 57)
CGATCGCCGGCGAGCTCCGGCCGTTCCGGCCTAGGTCTGTACTATTCTATGTAACTACTC (SEQ ID NO: 58)
L A A A R G R Q G R I Q T * * (SEQ ID NO: 59)

Figura 10A

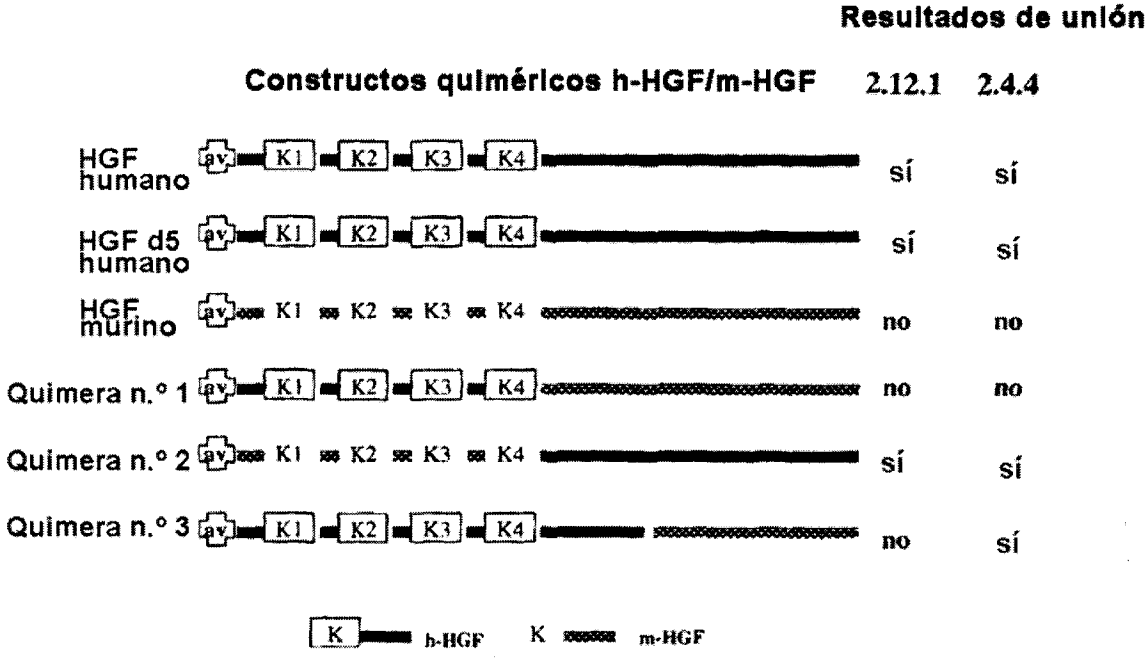

Resultados de unión
Constructos quiméricos h-HGF/m-HGF
2.12.1
2.4.4
HGF humano
sí
sí
HGF d5 humano
sí
sí
HGF murino
no
no
Quimera n.° 1
no
no
Quimera n.° 2
sí
sí
Quimera n.° 3
no
sí
K
h-HGF
K
m-HGF

Figura 10B

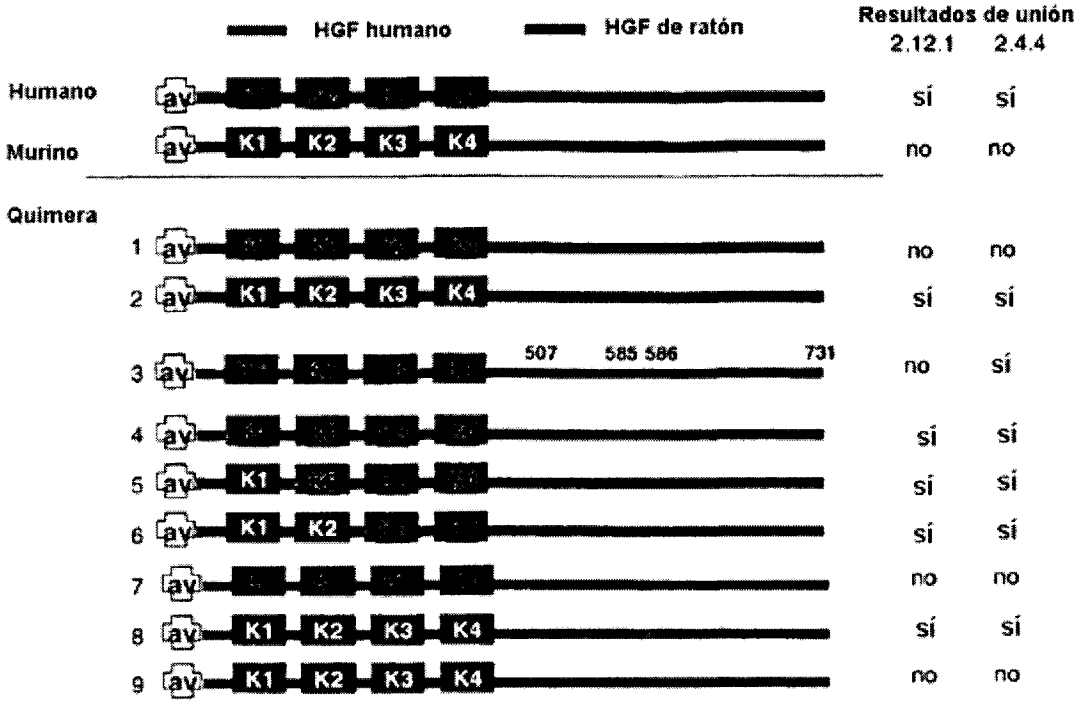


Figura 10C

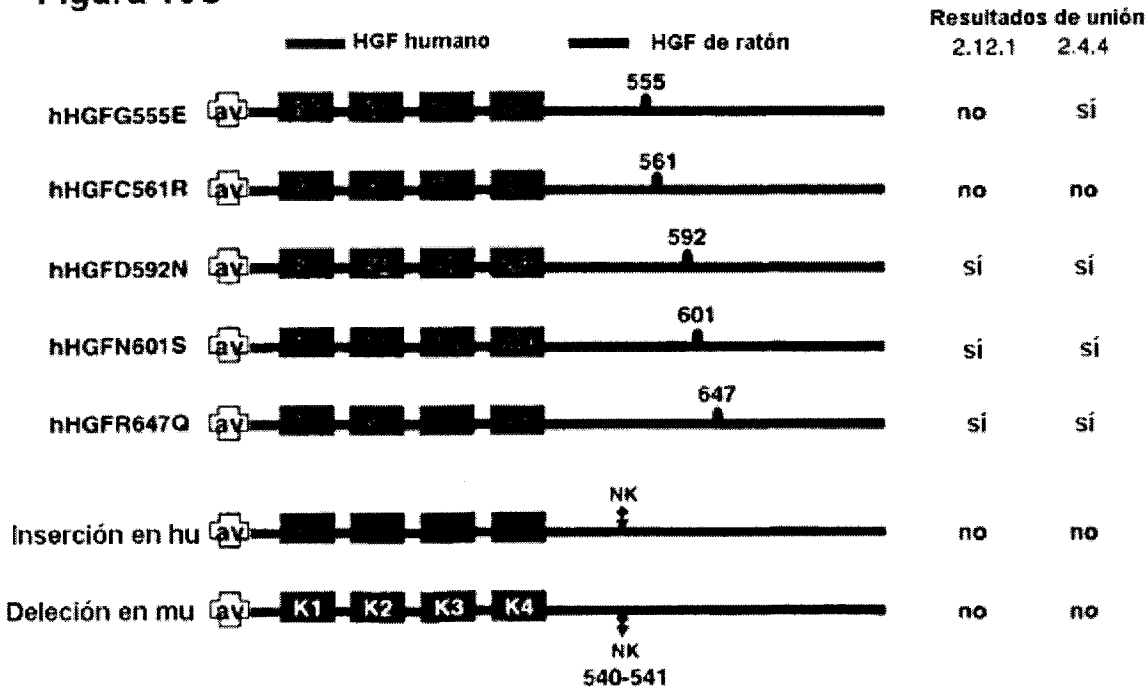


Figura 10D

```
                    451                                                500
HGF humano   (450)  PWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVNLDHPVISCAKTKQLRVVNGI
HGF de ratón (451)  PWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVNLDHPVISCAKTKQLRVVNGI
Consenso     (451)  PWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVNLDHPVISCAKTKQLRVVNGI
                    501                                                550
HGF humano   (500)  PTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR--DLKDYEAW
HGF de ratón (501)  PTQTTVGWMVSLKYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPARNKDLKDYEAW
Consenso     (501)  PT T IGWMVSLKYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPAR  DLKDYEAW
                    551                                                600
HGF humano   (548)  LGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLMKLARPAVLDDFVSTI
HGF de ratón (551)  LGIHDVHERGEEKRKQILNISQLVYGPEGSDLVLLKLARPAILDNFVSTI
Consenso     (551)  LGIHDVH RGDEK KQILNISQLVYGPEGSDLVLLKLARPAILD FVSTI
                    601                                                650
HGF humano   (598)  DLPNYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHR
HGF de ratón (601)  DLPSYGCTIPEKTTCSIYGWGYTGLINADGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHQ
Consenso     (601)  DLP YGCTIPEKTSCSIYGWGYTGLIN DGLLRVAHLYIMGNEKCSQHH
                    651                                                700
HGF humano   (648)  GKVTLNESEICAGAEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGC
HGF de ratón (651)  GKVTLNESELCAGAEKIGSGPCEGDYGGPLICEQHKMRMVLGVIVPGRGC
Consenso     (651)  GKVTLNESEICAGAEKIGSGPCEGDYGGPLICEQHKMRMVLGVIVPGRGC
                    701                          731
HGF humano   (698)  AIPNRPGIFVRVAYYAKWIHKIILTYKVPQS (SEQ ID NO. 120)
HGF de ratón (701)  AIPNRPGIFVRVAYYAKWIHKVILTYKL--- (SEQ ID NO. 121)
Consenso     (701)  AIPNRPGIFVRVAYYAKWIHKIILTYKL    (SEQ ID NO. 122)
```

Figura 11A

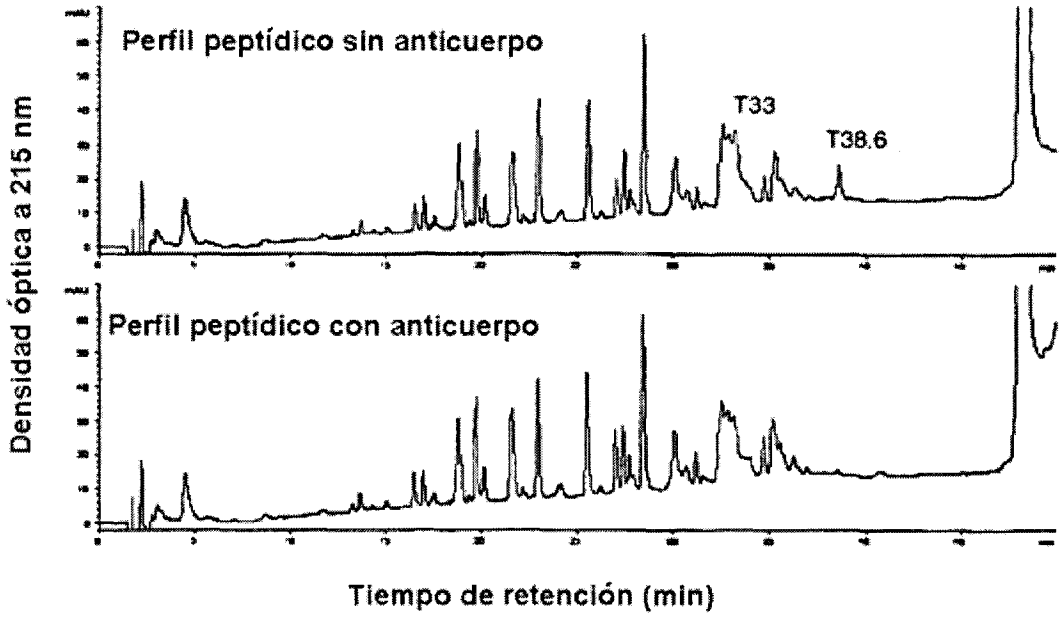


Figura 11B

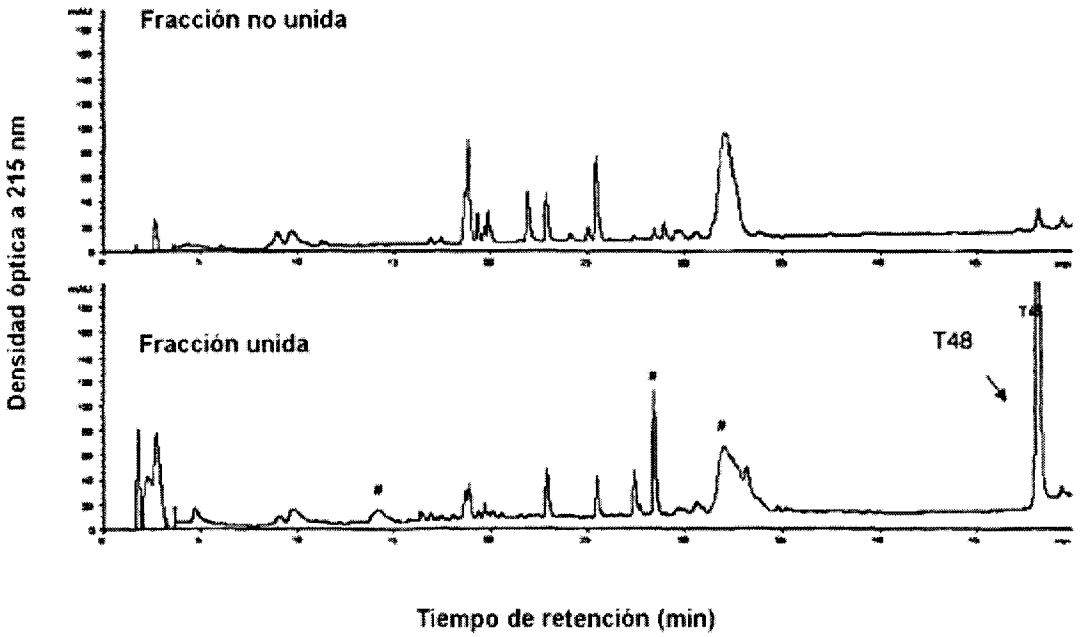


Figura 11C

T38.6= V V N G I P T R ----------H G R (masa calc. =7152) masa obs.=7165 (SEQ ID NO. 161)

G I P T R T----------H G R (masa calc.= 6840) masa obs.= ~6878 (SEQ ID NO. 162)

T33= V N T L D Q ----------? (SEQ ID NO. 163)

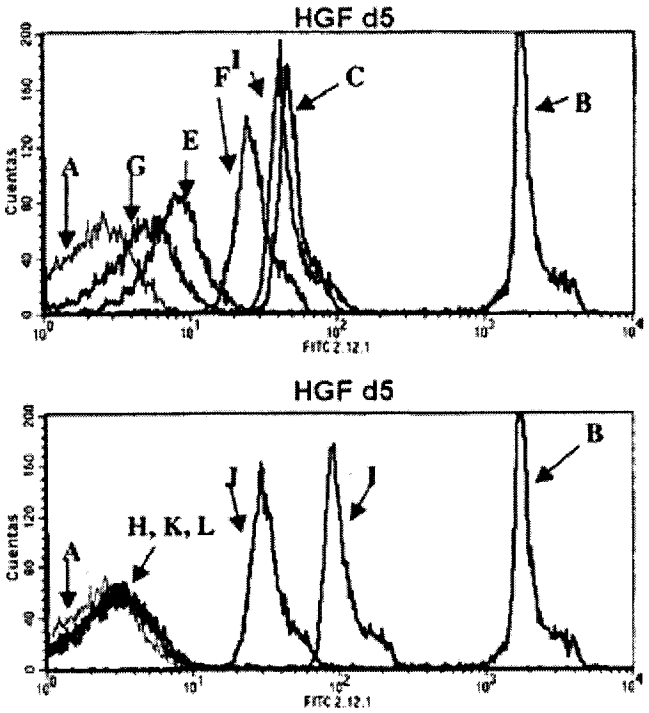
Péptidos protegidos predichos a partir del pico T38.6:

VVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSRDLKDYEAWLGIHDVHGR
(SEQ ID NO. 164)

GIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSRDLKDYEAWLGIHDVHGR
(SEQ ID NO. 165)

Figura 12

A


HGF d5
Cuentas
FITC 2.12.1
A
G
E
F
I
C
B
HGF d5
Cuentas
FITC 2.12.1
A
H, K, L
I
J
B

B

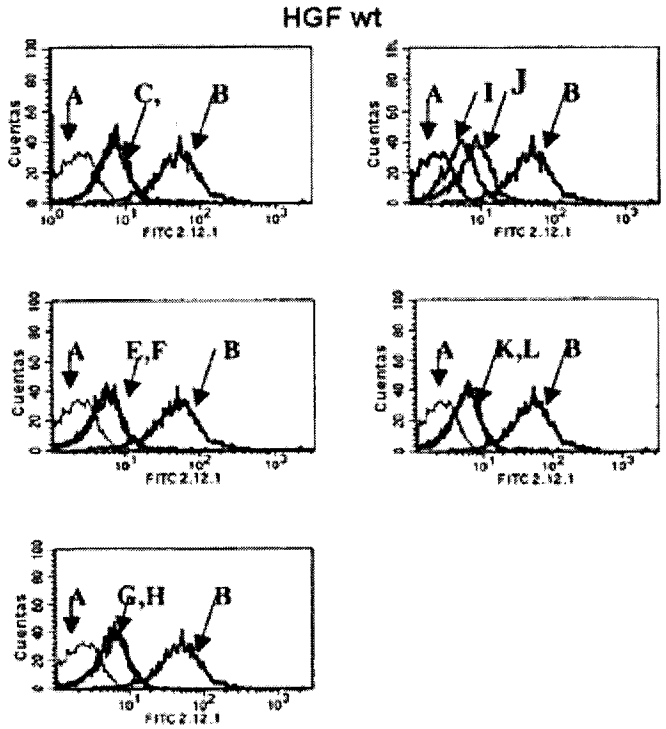
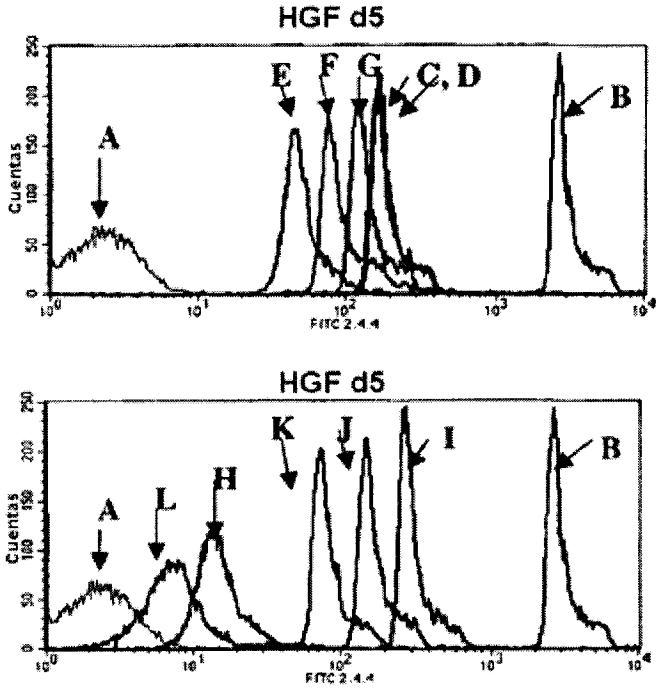

HGF wt
Cuentas
FITC 2.12.1
A
C,
B
A
I
J
B
A
E,F
B
A
K,L
B
A
G,H
B

Figura 12

C


HGF d5
A
E
F
G
C, D
B
Cuentas
FITC 2.4.4
HGF d5
A
L
H
K
J
I
B
Cuentas
FITC 2.4.4

D

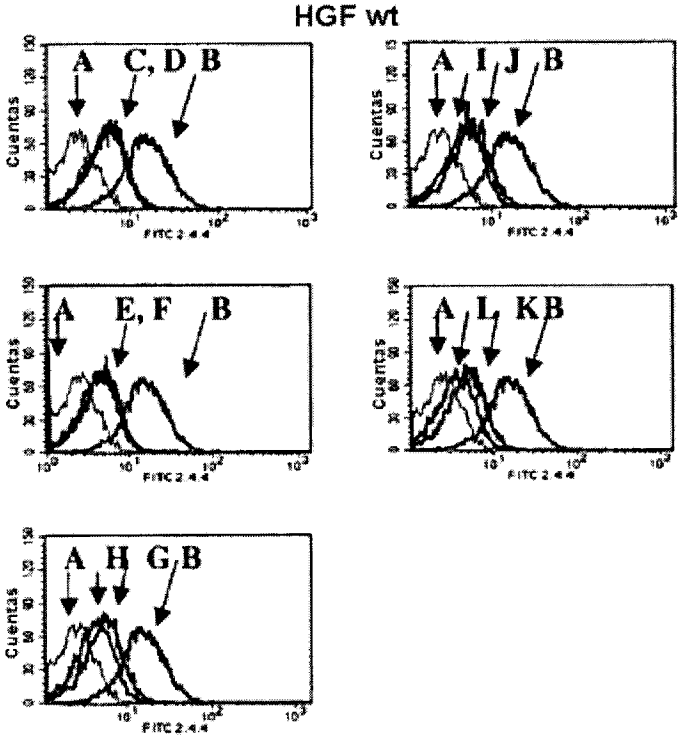

HGF wt
A C, D B
A I J B
A E, F B
A L K B
A H G B
Cuentas
FITC 2.4.4

Figura 13

ID	CI50 IP (nM)
3.10.1	0,9
2.40.1	1,0
1.75.1	1,0
2.12.1	2.1
1.24.1	2,6
1.29.1	3,2
1.74.1	3,7
1.60.2	4,5
2.4.4	5,1

ID	CI50 IP (nM)
3.10.1	0,37
2.12.1	0,52
1.75.1	0.72
1.29.1	1,93
1.74.1	2,31
1.61.3	2,59
1.24.1	9,36

Figura 14

Experimento n.º 1

ID	CI50 IP (nM)
1.75.1	0,34
2.12.1	0,49
2.40.1	0,51
3.10.1	0,64
1.24.1	0,64
1.29.1	1,18
2.4.4	1,24
1.74.1	1,25

Experimento n.º 2

ID	CI50 IP (nM)
1.61.3	0,28
1.24.1	0,40
1.75.1	0,59
1.29.1	0,88
1.60.1	1,06
1.74.1	2,17

Figura 15

Experimento n.° 1

ID	CI50 IP (nM)
1.24.1	15
1.60.1	15
1.29.1	23
2.4.4	33
2.12.1	57
3.10.1	137

Experimento n.° 2

ID	CI50 IP (nM)
2.4.4	8
1.61.3	17
1.29.1	21
2.12.1	34
2.40.1	59
3.10.1	133
1.60.1	215
1.74.1	>666
1.75.1	>666

Figura 16A

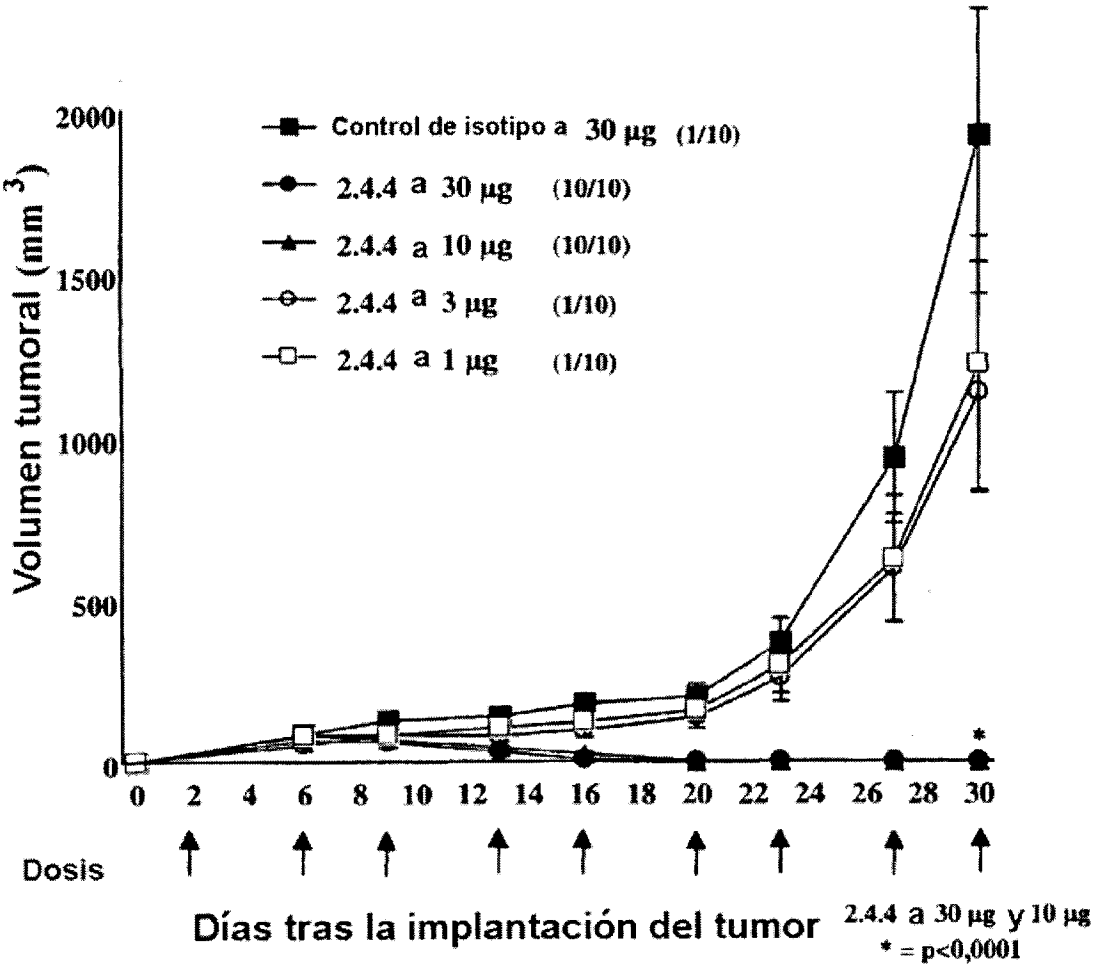

Control de isotipo a 30 µg (1/10)
2.4.4 a 30 µg (10/10)
2.4.4 a 10 µg (10/10)
2.4.4 a 3 µg (1/10)
2.4.4 a 1 µg (1/10)
Volumen tumoral (mm 3)
2000
1500
1000
500
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30
*
Dosis
Días tras la implantación del tumor
2.4.4 a 30 µg y 10 µg
* = p<0,0001

Figura 16B

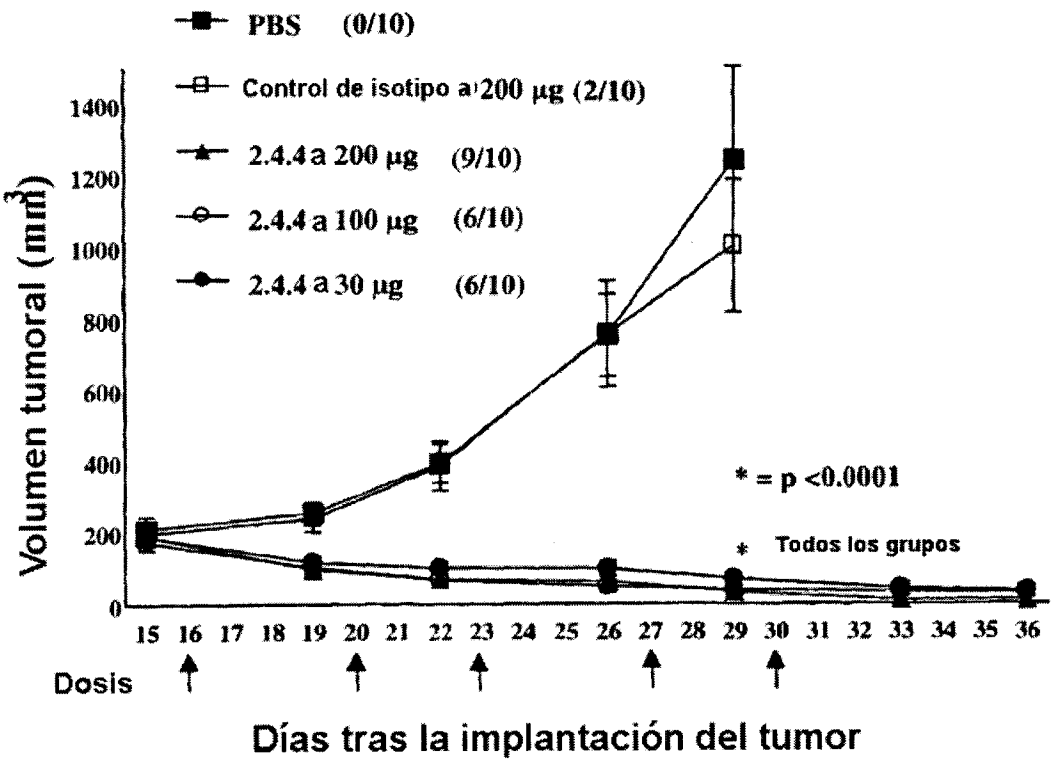

PBS (0/10)
Control de isotipo a 200 µg (2/10)
2.4.4 a 200 µg (9/10)
2.4.4 a 100 µg (6/10)
2.4.4 a 30 µg (6/10)
Volumen tumoral (mm3)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
* = p <0.0001
* Todos los grupos
15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36
Dosis
Días tras la implantación del tumor

Figura 16C

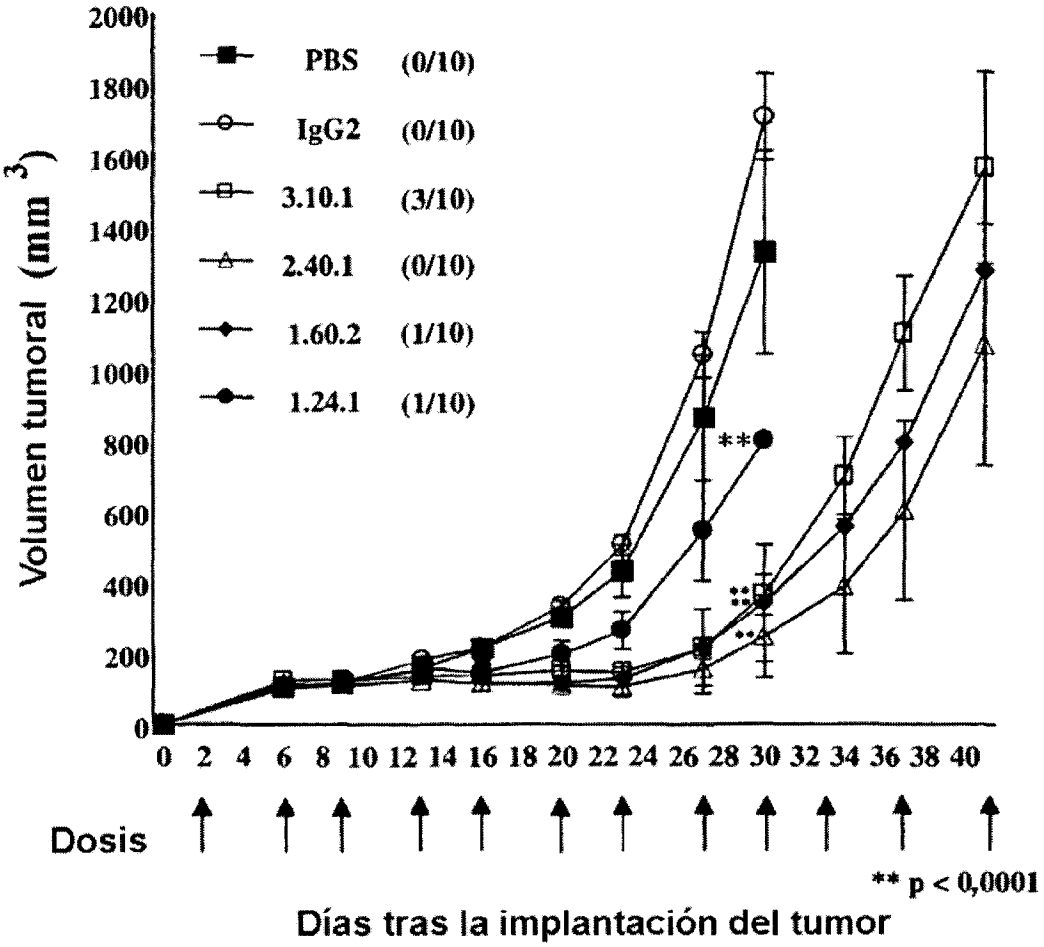

2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Volumen tumoral (mm 3)
PBS (0/10)
IgG2 (0/10)
3.10.1 (3/10)
2.40.1 (0/10)
1.60.2 (1/10)
1.24.1 (1/10)
**
**
**
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40
Dosis
** p < 0,0001
Días tras la implantación del tumor

Figura 16D

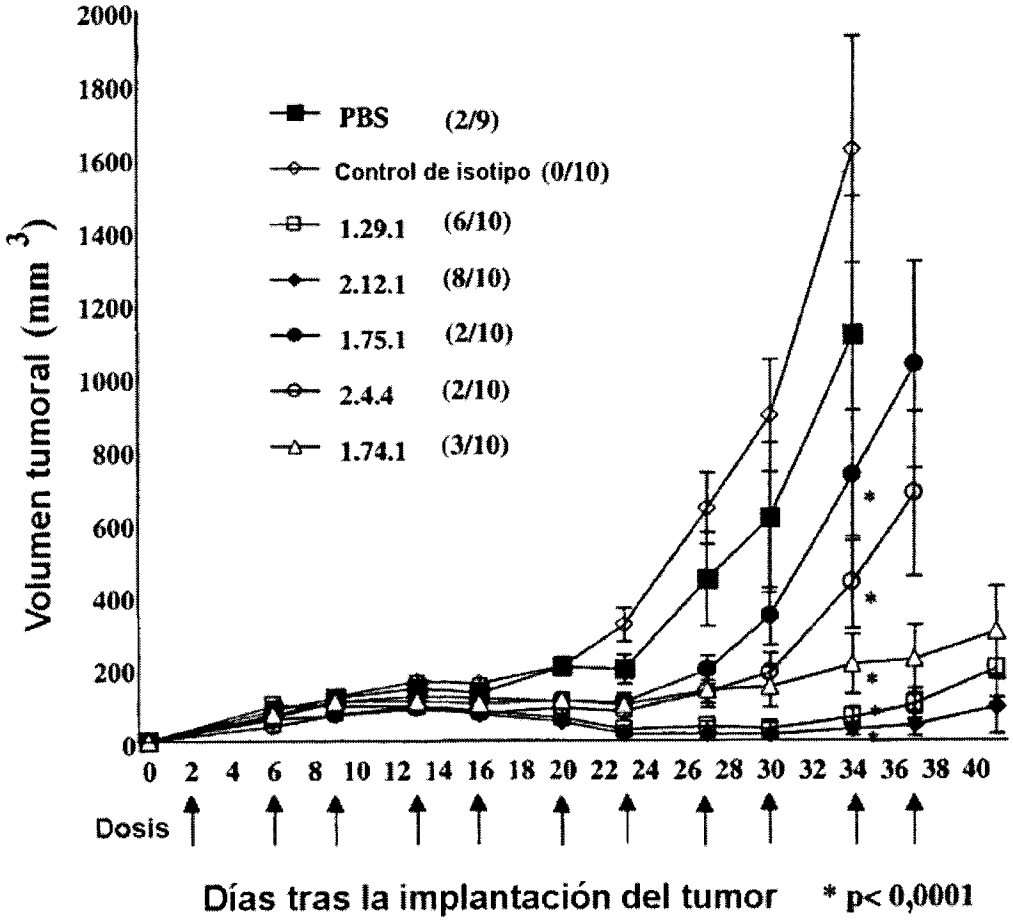

Volumen tumoral (mm 3)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
PBS (2/9)
Control de isotipo (0/10)
1.29.1 (6/10)
2.12.1 (8/10)
1.75.1 (2/10)
2.4.4 (2/10)
1.74.1 (3/10)
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40
Dosis
Días tras la implantación del tumor
* p< 0,0001

Figura 16E

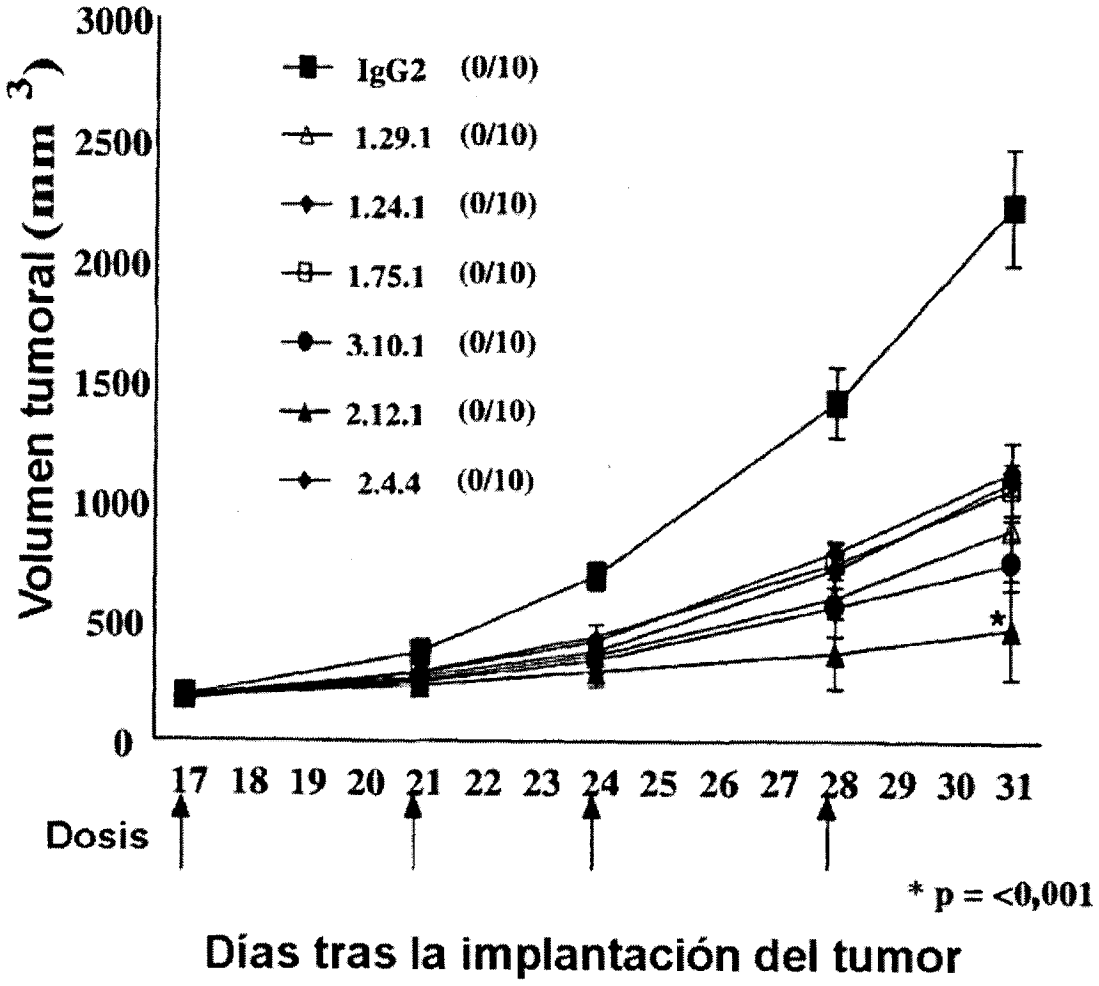
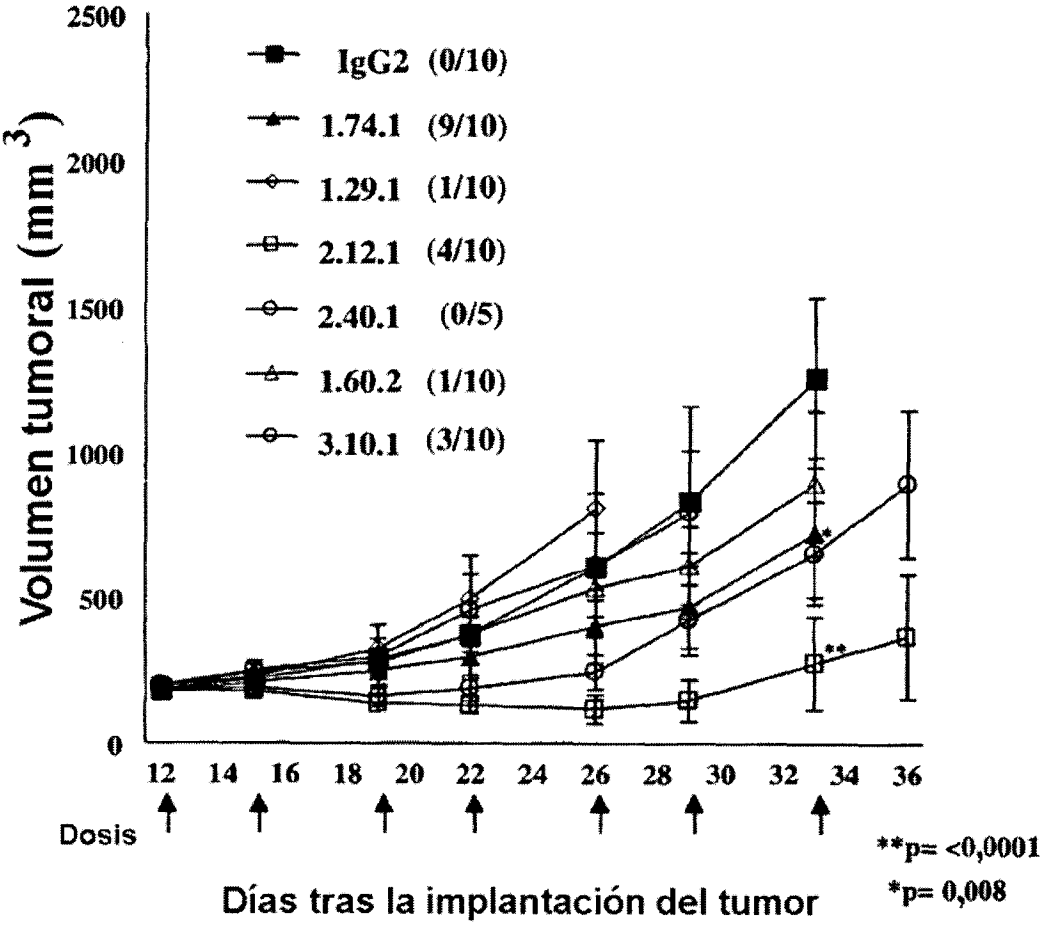

3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Volumen tumoral (mm 3)
IgG2 (0/10)
1.29.1 (0/10)
1.24.1 (0/10)
1.75.1 (0/10)
3.10.1 (0/10)
2.12.1 (0/10)
2.4.4 (0/10)
*
17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31
Dosis
* p = <0,001
Días tras la implantación del tumor

Figura 16F


2500
2000
1500
1000
500
0
Volumen tumoral (mm 3)
IgG2 (0/10)
1.74.1 (9/10)
1.29.1 (1/10)
2.12.1 (4/10)
2.40.1 (0/5)
1.60.2 (1/10)
3.10.1 (3/10)
12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36
Dosis
Días tras la implantación del tumor
**p= <0,0001
*p= 0,008