



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 539 790**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2006 E 06748671 (2)**

⑰ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 1868648**

④ Título: **Métodos y composiciones para modular c-met hiperestabilizado**

⑩ Prioridad:

**25.03.2005 US 665482 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**06.07.2015**

⑬ Titular/es:

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

⑭ Inventor/es:

**WICKRAMASINGHE, DINELI M. y  
KONG-BELTRAN, MONICA**

⑮ Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 539 790 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para modular c-met hiperestabilizado

5 Descripción

Solicitudes relacionadas

10 La presente solicitud es una solicitud no provisional presentada de conformidad con 37 CFR 1.53(b)(1), y reivindica prioridad de conformidad con 35 USC 119(e) para la solicitud provisional número 60/665.482 presentada el 25 de marzo de 2005.

Campo técnico

15 La presente invención se refiere en general a los campos de la biología molecular y de la regulación de factor del crecimiento. Más específicamente, la invención se ocupa de moduladores de la vía de señales HGF/c-met y los usos de dichos moduladores.

20 Antecedentes

25 El HGF es un factor pleiotrófico derivado del mesénquima con actividades mitogénicas, motogénicas y morfogénicas sobre varios tipos celulares diferentes. Los efectos de HGF son mediados a través de una tirosinacina espcífica, c-met, y es frecuente observar la expresión aberrante de HGF y c-met en diversos tumores. Véase, p.ej., Maulik et al., *Cytokine & Growth Factor Reviews* (2002), 13:41-59; Danilkovitch-Miagkova & Zbar, *J. Clin. Invest.* (2002), 109(7):863-867. La regulación de la vía de señales HGF/c-Met está implicada en la progresión y la metástasis de tumores. Véase, p.ej., Trusolino & Comoglio, *Nature Rev.* (2002), 2:289-300).

30 El HGF se fija al dominio extracelular de la tirosinacina del receptor Met (RTK) y regula diversos procesos biológicos tales como la dispersión, la proliferación y la supervivencia celular. La vía de señales HGF-Met es esencial para el desarrollo embrionario normal, especialmente en la migración de células progenitoras musculares y el desarrollo del hígado y del sistema nervioso (Bladt et al., *Nature* (1995), 376, 768-771.; Hamanoue et al., *Faseb J* (2000), 14, 399-406; Maina et al., *Cell* (1996), 87, 531-542; Schmidt et al., *Nature* (1995), 373, 699-702; Uehara et al., *Nature* (1995), 373, 702-705). Los fenotipos de desarrollo de ratones KO Met y HGF son muy similares, lo cual sugiere que HGF es el ligando afín del receptor Met (Schmidt et al., 1995, *supra*; Uehara et al., 1995, *supra*). HGF-Met también desempeña un papel importante en la regeneración hepática, la angiogénesis y la cicatrización de heridas (Bussolino et al., *J Cell Biol* (1992), 119, 629-641; Matsumoto y Nakamura, *Exs* (1993), 65, 225-249; Nusrat et al., *J Clin Invest* (1994) 93, 2056-2065). El precursor de receptor Met sufre escisión proteolítica en una subunidad extracelular  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$  que atraviesa la membrana, unidas por enlaces disulfuro (Tempest et al., *Br J Cancer* (1988), 58, 3-7). La subunidad  $\beta$  contiene el dominio de cinasa citoplasmático y aloja un sitio de unión de múltiples sustratos en el terminal, donde se fijan las proteínas adaptadoras e inician la transmisión de la señal (Bardelli et al., *Oncogene* (1997), 15, 3103-3111; Nguyen et al., *J Biol Chem* (1997), 272, 20811-20819; Pelicci et al., *Oncogene* (1995), 10, 1631-1638; Ponzetto et al., *Cell* (1994), 77, 261-271; Weidner et al., *Nature* (1996), 384, 173-176). Despues de la fijación de HGF, la activación de Met conduce a la fosforilación de la tirosina y la transmisión de la señalización secuencia abajo por activación de PI3 cinasa y Ras/MAPK mediada por Gab1 y Grb2/Sos respectivamente, lo cual impulsa la movilidad y la proliferación celular (Furge et al., *Oncogene* (2000), 19, 5582-5589; Hartmann et al., *J Biol Chem* (1994), 269, 21936-21939; Ponzetto et al., *J Biol Chem* (1996), 271, 14119-14123; Royal y Park, *J Biol Chem* (1995), 270, 27780-27787).

50 Se demostró que Met tenía comportamiento de transformación en una línea celular de osteosarcoma tratado con un carcinógeno (Cooper et al., *Nature* (1984), 311, 29-33; Park et al., *Cell* (1986), 45, 895-904). Se ha observado expresión excesiva o amplificación génica en diversos cánceres humanos. Por ejemplo, hay sobreexpresión en al menos cinco veces de la proteína Met en cánceres colonrectales y se ha informado que presenta amplificación génica en metástasis de hígado (Di Renzo et al., *Clin Cancer Res* (1995), 1, 147-154; Liu et al., *Oncogene* (1992), 7, 181-185). También se ha informado que la proteína Met se expresa en exceso en carcinoma oral de células pavimentosas, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renales, carcinoma de mama y carcinoma de pulmón (Jin et al., *Cancer* (1997), 79, 749-760; Morello et al., *J Cell Physiol* (2001), 189, 285-290; Natali et al., *Int J Cancer* (1996), 69, 212-217; Olivero et al., *Br J Cancer* (1996), 74, 1862-1868; Suzuki et al., *Br J Cancer* (1996), 74, 1862-1868). Además, se ha observado sobreexpresión de mARN en carcinoma hepatocelular, carcinoma gástrico y carcinoma colonrectal (Boix et al., *Hepatology* (1994), 19, 88-91; Kuniyasu et al., *Int J Cancer* (1993), 55, 72-75; Liu et al., *Oncogene* (1992), 7, 181-185).

60 Se han hallado varias mutaciones en el dominio de cinasa de Met en carcinoma papilar renal, que conducen a la activación del receptor constitutivo (Olivero et al., *Int J Cancer* (1999), 82, 640-643; Schmidt et al., *Nat Genet* (1997), 16, 68-73; Schmidt et al., *Oncogene* (1999), 18, 2343-2350). Estas mutaciones activadoras causan fosforilación de la tirosina constitutiva de Met y dan por resultado la activación de MAPK, formación de foco y tumorigénesis (Jeffers et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997), 94, 11445-11450). Además, estas mutaciones incrementan la motilidad y la

invasión celular (Giordano et al., *Faseb J* (2000), 14, 399-406; Lorenzato et al., *Cancer Res* (2002), 62, 7025-7030). La activación de Met dependiente de HGF en células transformadas media el incremento de la motilidad, la dispersión y la migración, que finalmente conducen a crecimiento tumoral invasivo y metástasis (Jeffers et al., *Mol Cell Biol* (1996), 16, 1115-1125; Meiners et al., *Oncogene* (1998), 16, 9-20).

- 5 Se ha demostrado que Met interactúa con otras proteínas que impulsan la activación del receptor, la transformación y la invasión. En células neoplásicas, se ha informado que Met interactúa con  $\alpha 6\beta 4$  integrina, un receptor de componentes de la matriz extracelular (ECM) tales como lamininas, que promueve el crecimiento invasivo dependiente de HGF (Trusolino et al., *Cell* (2001), 107, 643-654). Además, se ha demostrado que el dominio extracelular de Met interactúa con un miembro de la familia de semaforinas, plexina B1, e incentiva el crecimiento invasivo (Giordano et al., *Nat Cell Biol* (2002), 4, 720-724). Por otra parte, también se ha informado que el CD44v6, implicado en la tumorigénesis y la metástasis, forma un complejo con Met y HGF, y da por resultado la activación de receptor Met (Orian-Rousseau et al., *Genes Dev* (2002), 16, 3074-3086).
- 10 15 Met es miembro de la subfamilia de tirosinacinasas de receptor (RTK) que incluyen Ron y Sea (Maulik et al., *Cytokine Growth Factor Rev* (2002), 13, 41-59). La predicción de la estructura del dominio extracelular de Met sugiere una homología compartida con las semaforinas y plexinas. El N-terminal de Met contiene un dominio Sema de aproximadamente 500 aminoácidos que está conservado en todas las semaforinas y plexinas. Las semaforinas y plexinas pertenecen a una gran familia de proteínas de secreción y unidas a membrana descritas por primera vez 20 por su papel en el desarrollo neural (Van Vactor y Lorenz, *Curr Bio* (1999), 19, R201-204). No obstante, más recientemente se ha correlacionado la expresión excesiva de semaforinas con invasión tumoral y metástasis. Un dominio PSI rico en cisteína (también denominado dominio de secuencia relacionada con Met) que se encuentra en plexinas, semaforinas e integrinas se ubica adyacente al dominio Sema, seguido de cuatro repeticiones IPT que son 25 regiones similar inmunoglobulina halladas en plexinas y factores de transcripción. Un estudio reciente sugiere que el dominio Sema de Met es suficiente para la fijación de HGF y heparina (Gherardi et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003), 100(21):12039-44).

30 Tal como se destacó antes, la tirosinacina de receptor Met es activada por su ligando afín HGF y la fosforilación del receptor activa las vías de MAPK, PI-3 cinasa y PLC- $\gamma$  (1, 2). La fosforilación de Y1234/Y1235 dentro del dominio cinasa es crítico para la activación de Met cinasa, mientras que Y1349 e Y1356 en el sitio de fijación de múltiples sustratos son importantes para la fijación de src de homología-2 (SH2), la fijación de fosfotirosina (PTB) y las proteínas del dominio de fijación de Met (MBD) (3-5), para mediar la activación de las vías de señalización secuencia abajo. Se ha caracterizado bien un sitio de fosforilación adicional de la yuxtamembrana, Y1003, por su fijación al dominio fijador de tirosinacina (TKB) de Cb1 E3-ligasa (6, 7). Se ha informado que la fijación de Cb1 impulsa la 35 endocitosis del receptor mediada por endofilina, la ubiquitinación y la posterior degradación del receptor (8). Este mecanismo de regulación negativa del receptor ha sido descrito previamente en la familia EGFR, que también contiene un sitio de fijación Cb1 similar (9-11).

40 Se ha informado disregulación de Met y HGF en diversos tumores. Se ha observado activación de Met impulsada por ligando en varios cánceres. Se observó aumento sérico y intratumoral de HGF en cáncer de pulmón y mama, y en mieloma múltiple (12-15). Se ha informado sobreexpresión de Met y/o HGF, y amplificación o mutación de Met en diversos cánceres tales como cáncer colonorectal, pulmonar, gástrico y renal, y se cree que impulsa la activación de receptor independiente de ligando (2, 16). Además, la sobreexpresión inducible de Met en un modelo hepático murino da origen a carcinoma hepatocelular, lo cual demuestra que la sobreexpresión del receptor impulsa la 45 tumorigénesis independiente de ligando (17). La evidencia más notable que implica a Met en cáncer es informada en pacientes con carcinoma papilar renal familiar y esporádica (RPC). Las mutaciones en el dominio cinasa de Met que conducen a la activación constitutiva del receptor fueron identificadas como mutaciones de la línea germinal, y somáticas en RPC (18). La introducción de estas mutaciones en modelos de ratones transgénicos conduce a tumorigénesis y metástasis. (19).

50 55 60 Si bien se ha estudiado en detalle el papel del dominio cinasa de Met, y se ha planteado la teoría de que el incremento de los niveles de expresión de HGF/c-met probablemente subyace al desarrollo de algunos cánceres, faltaba la evidencia directa del papel biológico de los dominios no cinasa de c-met. De hecho, a pesar de estar implicada en la etiología de diversas condiciones oncológicas, la vía HGF/c-met ha sido difícil de acertar con la terapéutica. Los esfuerzos en este sentido se han visto impedidos en gran parte por la falta de conocimientos respecto de los mecanismos de acción por los cuales la disregulación de HGF/c-met causa tumorigénesis. En consecuencia, es obvia la gran necesidad de un mayor conocimiento de los mecanismos de acción oncogénicos relacionados con c-met. La invención provista en la presente cubre esta necesidad y proporciona otros beneficios.

65 66 Descripción de la invención

67 La invención se basa al menos en parte en el novedoso hallazgo de que ciertos tumores humanos expresan una proteína c-met mutada que exhibe velocidades disminuidas de regulación negativa intracelularmente, pero tienen capacidad para transmitir señales. Se halló que estas proteínas c-met "hiperestabilizadas" poseen actividad oncogénica incrementada, en comparación con el c-met de tipo silvestre. Tal como se muestra en la presente, estos tumores pueden ser inhibidos por inhibidores anti-c-met. La inhibición de la actividad de c-met hiperestabilizado

- proporciona numerosas ventajas terapéuticas. Por ejemplo, dado que estos mutantes c-met son particularmente onco génicos, es de esperar que su inhibición dirigida disminuya la tumorigénesis impulsada por estos mutantes. Además, dado que c-met se encuentra en muchos tipos celulares, incluso células normales, la capacidad de incidir específicamente en las mutantes c-met específicas de tumor sería particularmente beneficiosa, por ejemplo en la 5 reducción de los efectos secundarios de la terapéutica de inhibición de c-met. La invención provee métodos y composiciones basados en los hallazgos descritos en la presente, y son de utilidad para dirigirse y/o tratar los tumores que poseen c-met hiperestabilizado.
- En un aspecto, la invención se refiere a una sustancia capaz de unirse específicamente a c-met hiperestabilizado. 10 En una forma de realización, la sustancia comprende una actividad inhibitoria contra la actividad biológica asociada con el c-met hiperestabilizado. En otra forma de realización, la sustancia es capaz de unirse específicamente al c-met hiperestabilizado. En una forma de realización, la sustancia se fija a c-met hiperestabilizado e inhibe la actividad de c-met. En una forma de realización, la sustancia se fija a c-met hiperestabilizado sin inhibir sustancialmente la actividad de c-met. Estas sustancias encuentran diversos usos, por ejemplo como moléculas para dirigir los agentes 15 terapéuticos a una célula que expresa c-met hiperestabilizado. Los agentes terapéuticos incluyen cualquiera de los agentes descritos en la presente, p.ej. toxinas. Las sustancias pueden estar en cualquier forma adecuada, incluso en la forma de conjugaciones anticuerpo-fármaco y polipéptidos de fusión.
- En un aspecto, la invención provee antagonistas de c-met para uso médico, según se define en las reivindicaciones, 20 que alteran la transición de señales HGF/c-met asociadas con una proteína de c-met hiperestabilizado. En una forma de realización, la invención provee un antagonista para uso médico que inhibe la actividad de señalización de c-met en un polipéptido de c-met hiperestabilizado humano, donde el polipéptido de c-met hiperestabilizado comprende una delección del exón 14, de manera que su velocidad de degradación en una célula está reducida, en 25 comparación con el c-met de tipo silvestre, y donde el polipéptido de c-met hiperestabilizado posee actividad de señalización de c-met.
- Un antagonista puede tener cualquier forma capaz de inhibir específicamente la actividad de una molécula de c-met 30 hiperestabilizado, según se describe en la presente. En una forma de realización, un antagonista comprende un anticuerpo. En una forma de realización, un anticuerpo se fija específicamente a un epitopo formado por corte y empalme del exón 13 y el exón 15 en un marco de c-met. En una forma de realización, el exón 14 es eliminado como consecuencia de dicho corte y empalme en un marco. Un antagonista puede comprender un aptámero. Un aptámero se puede fijar específicamente a un epitopo formado por corte y empalme del exón 13 y el exón 15 de c-met 35 en un marco. Al menos una fracción del exón 14 es eliminada como consecuencia de dicho corte y empalme en un marco. En un aspecto, un antagonista comprende un inhibidor ARN que de preferencia/selectivamente inhibe la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica una variante empalmada de c-met, donde el exón 13 está cortado y empalmado con el exón 15. En una forma de realización, el ácido nucleico codifica un c-met hiperestabilizado en el cual el exón 14 es eliminado como resultado del corte y empalme de la variante. En un aspecto, 40 un antagonista comprende un oligonucleótido antisentido que preferentemente/selectivamente inhibe una molécula de ácido nucleico que codifica una variante empalmada de c-met donde el exón 13 está cortado y empalmado con el exón 15. En una forma de realización, la molécula de ácido nucleico codifica un c-met hiperestabilizado en el cual el exón 14 es eliminado como resultado del corte y empalme de la variante.
- La inhibición de la actividad de c-met puede ser efectuada de cualquiera de numerosas formas conocidas en la 45 técnica, siempre que la actividad biológica del c-met hiperestabilizado esté disminuida en una célula. Por ejemplo, en una forma de realización, la inhibición de actividad de c-met por un antagonista de la invención comprende aumentar la degradación celular de la proteína de c-met hiperestabilizado. La inhibición de actividad de c-met por un antagonista puede comprender la inhibición de la fosforilación de la proteína de c-met hiperestabilizado. La inhibición de actividad de c-met por un antagonista puede comprender la inhibición de la fosforilación de un miembro de la vía de señales HGF/c-met por el c-met hiperestabilizado. La inhibición de actividad de c-met por un antagonista también 50 puede ser efectuada por reducción de las concentraciones de polipéptido de c-met hiperestabilizado en una célula. En consecuencia, por ejemplo, en una forma de realización, la inhibición de actividad de c-met por un antagonista comprende la inhibición de la expresión de la proteína de c-met hiperestabilizado, por ejemplo la transcripción y/o traducción de un polinucleótido que codifica un polipéptido de c-met hiperestabilizado. En otra forma de realización, la inhibición de actividad de c-met por un antagonista comprende la muerte celular asociada con una citotoxina 55 unida a una molécula (p.ej., un conjugado anticuerpo-fármaco) que se fija específicamente al c-met hiperestabilizado en una célula.
- En una forma de realización, un antagonista para el uso de acuerdo con la invención es un anticuerpo monoclonal, 60 fragmento de anticuerpo, anticuerpo químérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo humano, anticuerpo multiespecífico o anticuerpo monocatenario. Los antagonistas empleados en los usos médicos de la invención pueden ser un fragmento, un anticuerpo químérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo multiespecífico o un anticuerpo monocatenario. Los antagonistas empleados en los métodos médicos de la invención pueden opcionalmente ser conjugados a un agente inhibidor el crecimiento o agente citotóxico tal como una toxina, incluso, por ejemplo, un maitansinoide o caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica, o similares. En algunas formas de realización de usos médicos de la invención, incluso, por ejemplo, un maitansinoide o caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica, o similares. En 65

algunas formas de realización de métodos médicos de la invención, también se puede administrar un agente quimioterapéutico al sujeto.

En general, los antagonistas efectivos de c-met incluyen los inhibidores de c-met que interfieren con la fijación de un ligando tal como HGF al c-met hiperestabilizado. Por ejemplo, un inhibidor de c-met se puede fijar a c-met hiperestabilizado de manera tal que se inhibe la fijación de HGF a c-met. En una forma de realización, un anticuerpo antagonista es un anticuerpo químérico, por ejemplo, un anticuerpo que comprende secuencias fijadoras de antígeno provenientes de un donante no humano injertadas a una secuencia heteróloga no humana, humana o humanizada (p.ej., secuencias marco y/o de dominio constante). El donante no humano puede ser un ratón. Una secuencia fijadora de antígeno puede ser sintética, p.ej., obtenida por mutagénesis (p.ej., análisis de presentación de fago, etc.). Un anticuerpo químérico puede tener regiones V murinas y regiones C humanas. Opcionalmente, la región V de cadena liviana murina se fusiona con una cadena liviana kappa humana. Opcionalmente, la región V de cadena liviana murina se fusiona a una región C de IgG1 humana. Opcionalmente, las secuencias fijadoras de antígeno comprenden al menos uno, al menos dos o los tres CDR de una cadena liviana y/o pesada.

Opcionalmente, las secuencias fijadoras de antígenos comprenden un CDR3 de cadena pesada. Opcionalmente, las secuencias fijadoras de antígenos comprenden parte o la totalidad de las secuencias del CDR y/o el dominio variable del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de American Type Culture Collection ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6). Opcionalmente, las secuencias fijadoras de antígenos comprenden al menos CDR3 la cadena pesada del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 1A3.3.13 o 5D5.11.6. Los anticuerpos humanizados incluyen los que poseen sustituciones de aminoácidos en las variantes de FR y de maduración de afinidad con cambios en los CDR injertados. Los aminoácidos sustituidos en CDR o FR no se limitan a los presentes en el anticuerpo del donante o el receptor. En otras opciones, los anticuerpos también comprenden cambios en restos de aminoácidos en la región Fc que conducen a mejorar la función efectora incluso mejora de la función de CDC y/o ADCC y la muerte de células B. Otros anticuerpos incluyen los que poseen cambios específicos que mejoran la estabilidad. Los anticuerpos también incluyen variantes deficientes de fucosa que poseen mejoras de la función de ADCC.

Opcionalmente, un fragmento de anticuerpo comprende un brazo fijador del antígeno que comprende una cadena pesada que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de CDR seleccionadas del grupo que consiste de SYWLH (SEQ ID NO: 1), MIDPSNSDTRFNPNFKD (SEQ ID NO:2) y YGSYVSPLDY (SEQ ID NO:3). Opcionalmente, el brazo fijador del antígeno comprende la cadena pesada CDR-H1 con secuencia de aminoácidos SYWLH. Opcionalmente, el brazo fijador del antígeno comprende la cadena pesada CDR-H2 con la secuencia de aminoácidos MIDPSNSDTRFNPNFKD. Opcionalmente, El brazo fijador del antígeno comprende la cadena pesada CDR-H3 con la secuencia de aminoácidos YGSYVSPLDY. Opcionalmente, un fragmento de anticuerpo comprende un brazo fijador del antígeno que comprende una cadena liviana que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias seleccionadas CDR del grupo que consiste de KSSQSLLYTSSQKNILA (SEQ ID NO:4), WASTRES (SEQ ID NO:5) y QQYYAYPWT (SEQ ID NO:6). Opcionalmente, el brazo fijador del antígeno comprende la cadena pesada CDR-H3 con la secuencia de aminoácidos KSSQSLLYTSSQKNILA. Opcionalmente, el brazo fijador del antígeno comprende la cadena pesada CDR-L2 con la secuencia de aminoácidos WASTRES. Opcionalmente, el brazo fijador del antígeno comprende la cadena pesada CDR-L3 con la secuencia de aminoácidos QQYYAYPWT. Opcionalmente, un fragmento de anticuerpo comprende un brazo fijador del antígeno que comprende una cadena pesada que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias CDR seleccionadas del grupo que consiste de SYWLH (SEQ ID NO: 1), MIDPSNSDTRFNPNFKD (SEQ ID NO:2) y YGSYVSPLDY (SEQ ID NO:3) y una cadena liviana que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de CDR seleccionadas del grupo que consiste de KSSQSLLYTSSQKNILA (SEQ ID NO:4), WASTRES (SEQ ID NO:5) y QQYYAYPWT (SEQ ID NO:6).

La invención también se refiere a un anticuerpo antagonista humanizado que fija el c-met hiperestabilizado humano, o uno de sus fragmentos fijadores de antígeno, donde el anticuerpo es efectivo para inhibir la actividad de HGF/c-met hiperestabilizado humano in vivo, y donde el anticuerpo puede comprender en la región variable de la cadena H ( $V_H$ ) al menos una secuencia CDR3 del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de American Type Culture Collection ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6) y sustancialmente una secuencia de consenso humana (p.ej., sustancialmente los residuos del marco de consenso humano (FR) del subgrupo III de la cadena pesada humana ( $V_{HIII}$ )). Opcionalmente, el anticuerpo también comprende la secuencia CDR1 y/o la secuencia CDR2 de la cadena H del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de American Type Culture Collection ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6). Opcionalmente, el anticuerpo precedente comprende la secuencia CDR1, la secuencia CDR2 y/o la secuencia CDR3 de la cadena L liviana del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de American Type Culture Collection ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6) con substancialmente los residuos del marco de consensosamente humano (FR) del subgrupo I de la cadena liviana k ( $V_{kI}$ ).

Opcionalmente, un fragmento de anticuerpo comprende un brazo fijador del antígeno que comprende un dominio variable de la cadena pesada con la secuencia:

**QVQLQQSGPELVRPGASV р KMSCRASGYTFTSYWLHWVKQRPGQGL  
EWIGMIDPSNSDTRFNPNFKDKATLNVDRSSNTAYMLLSSLTSA  
VYYCATYGSYV р SPLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:7),**

o un brazo fijador del antígeno que comprende un dominio variable de la cadena liviana con la secuencia:

**DIMMSQSPSSLTVSVGЕKVTVSCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGQSPKL  
LIYWASTRESGVРDRFTGSGSGTDFLTITSVKADDLAVYYCQQYYAYPWTFGGGTK**

**5 LEIK (SEQ ID NO:8)**

Aún en otras instancias, puede ser ventajoso tener un antagonista de c-met que no interfiera con la fijación de un ligando (tal como HGF) a c-met. En consecuencia, un antagonista puede no fijar un ligando (tal como HGF) al sitio de fijación en c-met. Opcionalmente, un antagonista no inhibe sustancialmente a la fijación de un ligando (p.ej., HGF) a c-met. Opcionalmente, un antagonista no compite sustancialmente con un ligando (p.ej., HGF) para la fijación a c-met. En un ejemplo, se puede usar un antagonista en conjunción con uno o más de otros antagonistas, donde los antagonistas están dirigidos a diferentes procesos y/o funciones dentro del eje HGF/c-met. En consecuencia, un antagonista de c-met se puede fijar a un epitopo sobre c-met distinto de un epitopo sobre el cual se fija otro antagonista de c-met, tal como el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de American Type Culture Collection ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6). Opcionalmente, un antagonista de c-met es distinto de (es decir, no es) un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de American Type Culture Collection ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6). Opcionalmente, un antagonista de c-met no comprende una secuencia fijadora de c-met de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de American Type Culture Collection ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6). En una forma de realización, un antagonista inhibe la actividad de c-met pero no se fija a un dominio yuxtapamembrana de tipo silvestre de c-met.

25 En una forma de realización de un antagonista de c-met, la fijación del antagonista a c-met inhibe la activación de c-met por HGF. Opcionalmente, la fijación del antagonista de c-met a c-met en una célula inhibe la proliferación, dispersión, la morfogénesis y/o la motilidad de la célula. Opcionalmente, un antagonista de c-met se fija a c-met hiperestabilizado en una célula, lo que da por resultado la muerte de la célula. Por ejemplo, en una forma de realización, el antagonista está unido a una toxina tal como se describe en la presente.

30 En algunas formas de realización, un antagonista de c-met para el uso de acuerdo con la invención es o comprende un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, oligonucleótido (p.ej., oligonucleótido antisentido), ARN inhibidor o una de sus combinaciones.

35 Un antagonista de c-met puede ser obtenido por un método de análisis o de identificación de la invención tal como se describe en la presente.

También se describen en la presente métodos para el análisis o la identificación de un antagonista de c-met. En un ejemplo, dichos métodos comprenden poner en contacto una sustancia candidata con una molécula blanco que comprende al menos una fracción de c-met hiperestabilizado, por lo cual se selecciona una sustancia que fija específicamente dicha molécula blanco (como antagonista de c-met). Los métodos también pueden comprender la determinación de que una sustancia específicamente seleccionada como candidata se fija a una región mutada de c-met hiperestabilizado. Por ejemplo, si la molécula blanco comprende un polipéptido, una sustancia candidata seleccionada debería fijarse específicamente a un epitopo que comprende una posición (o región) mutada de c-met hiperestabilizado. En otro ejemplo, si la molécula blanco comprende un ácido nucleico que codifica al menos una fracción de c-met hiperestabilizado, la sustancia candidata seleccionada debería inhibir específicamente la expresión de la proteína de c-met hiperestabilizado por parte de un ácido nucleico que codifica c-met hiperestabilizado. Los métodos de análisis también comprenden poner en contacto una sustancia seleccionada con una célula que expresa c-met hiperestabilizado, donde se evalúa la inhibición de la actividad de c-met en la célula (p.ej., donde se detecta o cuantifica el grado de señalización secuencia abajo de c-met (p.ej., fosforilación de MAPK)). La inhibición de la actividad de señalización de c-met puede analizarse de diversas maneras conocidas en la técnica, y sobre la base de cualquiera de diversos criterios conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen con mayor detalle en la presente. Por ejemplo, la inhibición de la actividad de señalización de c-met puede estar indicada por un descenso de la cantidad de activación de c-met, lo cual a su vez puede estar indicado, por ejemplo, por la cantidad de señales celulares asociadas a c-met dentro de una célula. Las señales celulares pueden ser evaluadas por diversos métodos y basadas sobre criterios variables, los cuales son conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en la presente. Por ejemplo, la presencia de señales celulares en la vía HGF/c-met se pueden manifestar biológicamente en la forma de cambios en la fosforilación de las moléculas blanco de la vía de señalización. En consecuencia, p.ej.,

se podría medir la cantidad de fosforilación de proteínas asociadas con uno o más de los blancos de fosforilación conocidos en la vía HGF/c-met. Los ejemplos de tales blancos de fosforilación incluyen el propio c-met y la proteinacina activada por mitógeno (MAPK).

5 También se describen en la presente composiciones que comprenden uno o más antagonistas para el uso de acuerdo con la invención y un portador. El portador puede ser farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención se refiere a ácido nucleicos que codifican un antagonista de c-met para el uso de acuerdo con la invención. Opcionalmente, un ácido nucleico codifica un antagonista de c-met que es o comprende 10 un polipéptido (p.ej., un oligopéptido). Opcionalmente, un ácido nucleico codifica un antagonista de c-met que es o comprende un anticuerpo o su fragmento. Opcionalmente, un ácido nucleico es un aptámero. Opcionalmente, un ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido. Opcionalmente, un ácido nucleico de la invención es un ARN inhibidor (p.ej., ARN pequeño de interferencia).

15 También se describen los vectores que comprenden un ácido nucleico descrito en la presente.

También se describen células huésped que comprenden un ácido nucleico o un vector. Un vector puede ser de 20 cualquier tipo, por ejemplo un vector recombinante tal como un vector de expresión. Se puede usar cualquiera de diversas células huésped. Opcionalmente, una célula huésped es una célula procariote, por ejemplo, *E. coli*. Opcionalmente, una célula huésped es una célula eucariote, por ejemplo una célula de mamífero tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO).

25 Se describen en la presente métodos para preparar un antagonista. Por ejemplo, se describe un método para preparar un antagonista de c-met que es o comprende un anticuerpo (o su fragmento), donde dicho método comprende expresar en una célula huésped adecuada un vector recombinante que codifica dicho anticuerpo (o su fragmento), y recuperar dicho anticuerpo. En otro ejemplo, se describe un método para preparar un antagonista de c-met que es o comprende un polipéptido (tal como un oligopéptido), donde método comprende expresar en una célula huésped adecuada un vector recombinante que codifica dicho polipéptido (tal como un oligopéptido), y recuperar dicho polipéptido (tal como un oligopéptido).

30 30 También se describe en la presente un artículo de fabricación que comprende un contenedor; y una composición contenida en dicho contenedor, donde la composición comprende uno o más antagonistas de c-met. La composición puede comprender un ácido nucleico. Opcionalmente, una composición que comprende un antagonista también comprende un portador, el cual en algunos casos farmacéuticamente aceptable. En una opción, un artículo de 35 fabricación también comprende instrucciones para administrar la composición (p.ej., el antagonista) a un sujeto.

40 Se describe en la presente un kit que comprende un primer contenedor que comprende una composición que comprende uno o más antagonistas de c-met de la invención; y un segundo contenedor que comprende un buffer. El buffer puede ser farmacéuticamente aceptable. En un caso, una composición que comprende un antagonista también comprende un portador, que en algunos casos es farmacéuticamente aceptable. En una opción, un kit 45 también comprende instrucciones para administrar la composición (p.ej., el antagonista) a un sujeto.

45 En un aspecto, la invención provee el uso de un antagonista de c-met en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular, tal como se define en las reivindicaciones. El antagonista de c-met puede ser de cualquiera de las formas descritas en la presente, incluso un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un ácido nucleico (p.ej., un oligonucleótido, tal como un oligonucleótido antisentido, ARN inhibitorio), o sus combinaciones.

50 En un aspecto, la invención provee el uso de un ácido nucleico de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular, como se define en las reivindicaciones.

55 Un vector de expresión se puede usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular.

Una célula huésped se puede usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o 60 profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular.

65 La invención se refiere a métodos y composiciones de utilidad para modular los estados patológicos asociados con la disrupción del eje de señales HGF/c-met asociado con retraso de la regulación negativa de c-met. La vía de señalización HGF/c-met interviene en múltiples funciones biológicas y fisiológicas, incluso, p.ej., la proliferación celular y la angiogénesis. Por lo tanto, en un aspecto, la invención provee un uso médico en un método que comprende administrar a un sujeto un antagonista dirigido a c-met hiperestabilizado, por lo que se modula la señalización por HGF/c-met.

En un aspecto, la invención provee el uso médico en un método para tratar un tumor en un sujeto, donde dicho método comprende administrar un antagonista a un sujeto, por lo que se trata el tumor tal como se define en las reivindicaciones. Se puede determinar que el tumor comprende c-met hiperestabilizado. Se puede determinar que el tumor comprende c-met mutante que comprende delección de al menos una fracción de exón 14.

- 5 En una forma de realización de usos médicos de la invención, se administra un inhibidor de c-met en conjunción con un agente que induce y/o incentiva la degradación de la proteína del receptor.
- 10 Se describe en la presente un método para inhibir la de proliferación celular activada por c-met, donde dicho método comprende poner en contacto una célula o un tejido con una cantidad efectiva de un antagonista de c-met, por lo que se inhibe la proliferación celular asociada con la activación de c-met.
- 15 Se describe en la presente un para tratar una condición patológica asociada con disregulación de la activación de c-met en un sujeto, donde dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un antagonista de c-met, por lo que se trata dicha condición.
- 20 Se describe en la presente un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa c-met o factor del crecimiento en hepatocitos, o ambos, donde dicho método poner en contacto dicha célula con un antagonista de c-met para así causar una inhibición del crecimiento de dicha célula. En una opción, la célula es puesta en contacto con HGF expresado por diferentes células (p.ej., a través de un efecto paracrino).
- 25 Se describe en la presente un método para tratar terapéuticamente un mamífero que tiene un tumor canceroso que comprende una célula que expresa c-met o factor del crecimiento de hepatocitos, o ambos, donde dicho método comprende administrar a dicho mamífero una cantidad efectiva de un antagonista de c-met, y así tratar efectivamente dicho mamífero. En una opción, la célula es puesta en contacto con HGF expresado por diferentes células (p.ej., a través de un efecto paracrino).
- 30 Se describe en la presente un método para tratar o prevenir un trastorno proliferativo celular asociado con aumento de la expresión o actividad de c-met o el crecimiento de hepatocitos, o ambos, donde dicho método comprende administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un antagonista de c-met, para así efectivamente tratar o prevenir dicho trastorno proliferativo celular. En una opción, dicho trastorno proliferativo es cáncer.
- 35 Se describe en la presente un método para inhibir el crecimiento de una célula, donde el crecimiento de dicha célula es al menos en parte dependiente del efecto potenciador del crecimiento de c-met o factor del crecimiento de hepatocitos, o ambos, donde dicho método comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad efectiva de un antagonista de c-met, para así inhibir el crecimiento de dicha célula. En una opción, la célula es contactada por HGF expresado por una célula diferente (p.ej., a través de un efecto paracrino).
- 40 Se describe en la presente un método para tratar terapéuticamente un tumor en un mamífero, donde el crecimiento de dicho tumor es al menos en parte dependiente del efecto potenciador sobre el crecimiento de c-met o factor del crecimiento de hepatocito, o ambos, donde dicho método comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad efectiva de un antagonista de c-met, para así tratar efectivamente dicho tumor. En una opción, la célula es contactada por HGF expresado por una célula diferente (p.ej., a través de un efecto paracrino).
- 45 Los usos médicos de la invención se pueden utilizar para afectar cualquier estado patológico, por ejemplo, células y/o tejidos asociados con disregulación de la vía de señales HGF/c-met. En una forma de realización, una célula blanco en un uso médico de la invención es una célula cancerosa. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser una seleccionada del grupo que consiste de una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de colonrectal, una célula de cáncer de pulmón, una célula de carcinoma papilar (p.ej., de la glándula tiroideas), una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer de páncreas, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer de cervical, una célula de cáncer de sistema nervioso central, una célula de sarcoma osteogénico, una célula de carcinoma renal, una célula de carcinoma hepatocelular, una célula de cáncer de vejiga, una célula de cáncer de próstata, una célula de carcinoma gástrico, una célula de carcinoma pavimentoso de cabeza y cuello, una célula de linfoma, una célula de melanoma y una célula de leucemia. Una célula blanco puede ser una célula hiperproliferativa y/o hiperplásica.
- 55 Una célula blanco puede ser una célula displásica. Una célula blanco puede ser una célula metastásica.
- 60 Los métodos de tratamiento también pueden comprender pasos de tratamiento adicionales. Por ejemplo, en una opción, un método también comprende una etapa donde una célula y/o tejido blanco (p.ej., una célula cancerosa) es expuesta a tratamiento de radiación y/o un agente quimioterapéutico.
- 65 Tal como se describe en la presente, la activación de c-met es un proceso biológico importante, cuya disregulación conduce a numerosas condiciones patológicas. En consecuencia, en un método de tratamiento, una célula blanco (p.ej., una célula cancerosa) es una en la cual la activación de c-met está aumentada en comparación con una célula normal del mismo origen tisular. Un método de tratamiento puede causar la muerte de una célula blanco. Por ejemplo, el contacto con un antagonista puede dar por resultado la incapacidad de una célula de transmitir señales a

través de la vía de c-met, lo cual da por resultado la muerte celular o la inhibición del crecimiento celular. En otro ejemplo, un antagonista está dirigido a una toxina unidas a una célula que expresa c-met hiperestabilizado.

- 5 La disregulación de la activación de c-met (y por lo tanto la señal) puede ser el resultado de numerosos cambios celulares, incluso, por ejemplo, la expresión en exceso de HGF (el ligando afín de c-met) y/o el propio c-met (debido a retraso de la regulación negativa/degradación, aumentos de los niveles de expresión, etc.). En consecuencia, un método de tratamiento puede comprender dirigirse a una célula en la cual c-met o factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, está expresado con mayor abundancia por dicha célula (p.ej., una célula cancerosa) en comparación con una célula normal del mismo origen tisular. Una célula que expresa c-met puede ser regulada por
- 10 HGF proveniente de diversas fuentes, es decir, en forma autocrina o paracrina. Por ejemplo, en un método de tratamiento, una célula blanco es contactada/fijada por factor del crecimiento de hepatocitos expresa en/por una célula diferente (p.ej., a través de un efecto paracrino). Dicha célula diferente puede provenir del mismo tejido o de un tejido diferente, respecto de la célula blanco. Una célula blanco puede ser contactada/fijada por HGF expresado por la propia célula blanco (p.ej., a través de un efecto/asa autocrina). La activación de c-met y/o la señalización
- 15 también puede ocurrir en forma independiente de ligando. En consecuencia, en un método de tratamiento, la activación de c-met en una célula blanco ocurre con independencia de ligando.

En una forma de realización de usos médicos de la invención, los métodos también comprenden una etapa de determinar si una célula tumoral comprende c-met hiperestabilizado (p.ej., por detección de una mutación de polinucleótido o polipéptido, tal como se describe en la presente).

#### Breve descripción de los dibujos

- 25 La FIG. 1 muestra mutaciones intrónicas ilustrativas que flanquean el exón 14 de Met. Representación esquemática del exón 14 de Met que muestra las eliminaciones y/o mutaciones puntuales (texto gris claro) de ácido nucleico (NM\_000245) correspondientes, con respecto a la estructura del intrón/exón. (A) H596, línea celular de cáncer de pulmón. (B) pac. 14, espécimen de tumor de pulmón de paciente 14. (C) pac. 16, espécimen de tumor de pulmón de paciente 16. Para referencia, en el tumor H596 hay una mutación puntual de G a T en la posición marcada +1 en (A). En el tumor del pac. 14, hay una delección de la secuencia desde la posición marcada -27 a la -6 en (B). En el tumor del pac. 16, hay una delección de la secuencia desde la posición marcada 3195 a la +7 en (C).

- 30 FIG. 2. La regulación negativa retardada de c-met hiperestabilizado se asocia con activación de Met y MAPK. (A) Se inmunoprecipitaron (IP) 293 células cotransfectadas con constructos Met y Cb1-flag (IP) con anticuerpos V5 o Cb1, seguido de inmunoblotting (IB) con anticuerpos V5, flag o P-Tyr. Se sondaron los lisados anticuerpos flag o Cb1. (B) Se transfecaron 293 células con constructos Met, seguido de IP de Cb1 endógeno. El inmunoblotting con anticuerpo V5 demuestra que Met WT, pero no MetΔEx14, coinmunoprecipita Cb1 endógeno. La membrana fue disgregada y vuelta a sondar con anticuerpos fosfoespecíficos Y1003, YY1234/1235, Y1349 o Y1365. (C) Los lisados provenientes de la transfección transitoria de las 293 células se inmunoprecipitaron con anticuerpo V5 y se sometieron a inmunoblotting con anticuerpo de ubiquitina para detectar Met ubiquitinado. La membrana fue disgregada y vuelta a sondar con anticuerpo V5 a fin de detectar la presencia de Met. Los lisados se sondaron con anticuerpos flag o de actina para detectar Cb1-flag o actina en expresión equivalente. (D) 293 células se transfecaron con los constructos indicados y se trataron con 10 mg/ml de cicloheximida. Los lisados se sondaron con anticuerpo V5 o actina. (E) Líneas de células cancerosas de pulmón privadas de nutrientes en suero fueron estimuladas durante 10 minutos con 50 ng/ml de rhuHGF, luego enjuagadas y devueltas a medio sin suero. Los lisados se juntaron en los momentos indicados y sometidos a inmunoblotting para P-Met (Y1230/Y1234/Y1235), Met, P-MAPK, MAPK, P-Akt, o Akt. (F) Clones estables de rata 1A fueron privadas de nutrientes en suero y tratados durante 10 minutos con un anticuerpo monoclonal 3D6 agonista de Met (5 mg/ml), enjuagados con PBS, y devueltos a medio sin suero. En los momentos indicados se obtuvieron los lisados y se sometieron a inmunoblotting para P-MAPK, MAPK, P-Akt, o Akt.

- 50 FIG. 3. Aumento de potencial proliferativo dependiente de ligando en líneas celulares que contienen la delección yuxtamembrana de Met (A) Se determinó el crecimiento estimulado por HGF en un panel de líneas celulares NSCLC después de 72 horas de cultivo en presencia o ausencia 50 ng/ml de rhuHGF. Los resultados se presentan como índice de estimulación (SI), determinado a partir de un mínimo de tres experimentos diferentes. (B) Curvas de crecimiento de líneas celulares estables 1A de ratas inoculadas por vía subcutánea que expresan el vector, Met WT, MetΔEx14, en cada caso en presencia o ausencia de un anticuerpo agonista de HGF (3D6) en ratones desnudos.

- 60 FIG. 4 Inhibición de señalización y crecimiento por Met dependiente de ligando en células H596 con un mAb anti-Met, OA-5D5. (A) Células H226 o H596 privadas de nutrientes en suero se incubaron con OA-5D5 durante 30 minutos en las concentraciones indicadas y luego estimuladas con 100 ng/ml de rhuHGF durante 15 minutos. Se obtuvieron los lisados y se sometieron a inmunoblotting para P-Met (Y1234/Y1235), Met, P-Akt, Akt, P-MAPK, o MAPK. (B) Las células fueron tratadas con OA-5D5 o una Ig control en las concentraciones indicadas, en presencia o ausencia de 50 ng/ml de rhuHGF, y se determinó la viabilidad celular después de 72 horas.

FIG. 5 Cuantificación de las proporciones de fosfocinasa a cinasa en líneas celulares estables Rat1A Met. Se cuantificó la proporción de P-MAPK:MAPK (izquierda) y P-Akt:Akt (derecha) mediante escáner infrarrojo Odyssey, que detecta anticuerpos secundarios conjugados AlexaFluor680 y IR Dye800.

5 FIG. 6. Cuantificación de las proporciones de fosfocinasa a cinasa en células H596 y H226 tratadas con OA-5D5. La proporción de P-Met:Met, P-Akt:Akt o P-MAPK:MAPK para cada línea celular se cuantificó mediante escáner infrarrojo Odyssey, que detecta anticuerpos secundarios conjugados AlexaFluor680 y IR Dye800.

10 FIG. 7 Presenta elementos ilustrativos de corte y empalme de acción cis de los que se espera que regulen el corte y empalme del exón 14 c-met humano. Se espera que una mutación en una o más posiciones dentro de estos elementos tenga un impacto negativo sobre el corte y empalme del exón 14 de tipo salvaje.

FIG. 8 Presenta la secuencia de la proteína de c-met de tipo salvaje humana en RefSeq. NM\_000245.

15 FIG. 9 Muestra las secuencias de dominio variable de las cadenas pesadas y livianas para los anticuerpos OA-5D5 a que se refieren los Ejemplos.

#### Modos de realizar la invención

20 La invención se refiere a métodos, composiciones, kits y fabricación para identificar los inhibidores de la vía de señales HGF/c-met (en particular, los inhibidores de c-met hiperestabilizado) y métodos para usar tales inhibidores.

En la presente se proveen detalles de estos métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación.

#### 25 Técnicas generales

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

35

#### Definiciones

El término "c-met hiperestabilizado" y sus variaciones, tal como se usa en la presente, se refiere a un c-met humano mutante que se encuentra en la naturaleza y es degradado/regulado negativamente a una velocidad más lenta detectable que un c-met de tipo silvestre. Los métodos que comparan las velocidades de degradación/regulación negativa entre c-met de tipo salvaje y un c-met hiperestabilizado serán evidentes para un experto en la técnica, incluso, por ejemplo, tal como se describe en los Ejemplos más adelante. En una instancia, se evalúa la degradación/regulación negativa retardada sobre la base de la cuantificación de las concentraciones de proteína de receptor en una célula. En otra instancia, se determina la degradación/regulación negativa retardada sobre la base de la detección de una mutación en un sitio c-met que se asocia con la fijación de Cb1 a c-met. En una instancia, la mutación se encuentra en un sitio c-met asociado con la ubiquitinación de c-met (p.ej., en el exón 14 de c-met) y la degradación/regulación hacia debajo de la proteína del receptor. Estas mutaciones pueden surgir en cualquier forma que dé por resultado la expresión de una proteína c-met mutada que es degradada/regulada negativamente a una velocidad menor que el c-met de tipo silvestre, donde la proteína c-met mutada es capaz de tener actividad asociada a c-met de tipo silvestre (p.ej., moléculas que fosforilan moléculas secuencia abajo tales como MAPK, y estimulan la proliferación celular y/o la inducción de eventos tumorigénicos). Por ejemplo, estas mutaciones incluyen las asociadas con la expresión de una variante empalmada funcional de c-met en marco que carece al menos de una fracción de exón 14 que está asociada con la degradación/regulación negativa de la proteína de receptor. Los ejemplos ilustrativos de mutaciones incluyen los hallados en un elemento de corte y empalme tal como se muestra en las Figuras 1 y 7. En una forma de realización, la presencia de una proteína de c-met hiperestabilizado de la invención en una célula se asocia con fosforilación prolongada y/o incrementada de las moléculas secuencia abajo en la vía HGF/c-met, comparado con una cantidad similar de proteína de c-met de tipo silvestre en una célula.

60 El término "vector," tal como se usa en la presente, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha fijado. Un tipo de vector es un "plásmido", el cual se refiere a un asa circular de ADN bicatenario al cual se pueden unir segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en el cual se pueden unir segmentos adicionales de ADN dentro del genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicarse en forma autónoma dentro de una célula huésped a la cual son introducidos (p.ej., vectores bacterianos que tienen origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (p.ej., los vectores no episomales de mamífero) se pueden integrar al genoma de una célula huésped luego de la introducción a una célula huésped, y de ese modo se replican junto con el genoma del

huésped. Además, ciertos vectores tienen capacidad para dirigir la expresión de los genes a los cuales están unidos operativamente. Dichos vectores se refieren en la presente como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores recombinantes"). En general, a menudo los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están en la forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" se 5 pueden usar indistintamente, dado que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector.

"Polinucleótido" o "ácido nucleico" tal como se usa indistintamente en la presente, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, 10 ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en un polímero mediante una ADN o ARN polimerasa, o por una reacción de síntesis. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, se puede 15 impartir la modificación a la estructura del nucleótido antes o después del ensamblado del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede ser modificado ulteriormente después de la síntesis, tal como por conjugación con un rótulo. Otros tipos de modificaciones incluyen, 20 por ejemplo, "casquetes", la sustitución de uno o más de los nucleótidos que aparecen naturalmente por un análogo, modificaciones entre nucleótido tales como, por ejemplo, los con uniones no cargadas (p.ej., metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con uniones cargadas (p.ej., fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), los que contienen fracciones colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (p.ej., nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), los que contienen intercaladores (p.ej., acridina, psoraleno, etc.), los que contienen 25 quelantes (p.ej., metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), los que contienen alquilantes, los que contienen enlaces modificados (p.ej., ácido nucleicos alfa-anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del(os) polinucleótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo comúnmente presentes en los azúcares puede ser 30 reemplazado, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegido por grupos protectores estándar o activado para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o se puede conjugar a soportes sólidos o semisólidos. Los OH 5' y 3' terminales pueden ser fosforilados o sustituidos por aminas o fracciones de grupos de 35 cubierta orgánicos de entre 1 y 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden ser derivados a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxiribosa que son generalmente conocidas en la técnica, incluso, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carboxílicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y 40 análogos de nucleósidos abásicos tales como metilribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden ser reemplazados por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, sin limitaciones, formas de realización donde fosfato es reemplazado por P(O)S("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR.sub.2 ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH.sub.2 ("formacetal"), donde cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C.) que opcionalmente contienen un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La descripción precedente se 45 aplica a todos los polinucleótidos referidos en la presente, incluso ARN y ADN.

"Oligonucleótido", tal como se usa en la presente, se refiere en general a polinucleótidos cortos, generalmente 40 monocatenarios, generalmente sintéticos, que tienen generalmente, pero no necesariamente, menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para polinucleótidos es igualmente y totalmente aplicable a oligonucleótidos.

El término "factor del crecimiento de hepatocitos" o "HGF", tal como se usa en la presente, se refiere, a menos que 45 se indique otra cosa, a cualquier HGF polipeptídico nativo o variante (ya sea nativo o sintético) capaz de activar la vía de señales HGF/c-met bajo condiciones que permitan que ocurra dicho proceso. El término "HGF de tipo silvestre" refiere generalmente a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína HGF que se 50 encuentra en la naturaleza. El término "secuencia HGF de tipo silvestre" refiere generalmente a una secuencia de aminoácidos hallada en un HGF que se encuentra en la naturaleza. C-met (o Met) es un receptor para HGF conocido, a través del cual se efectúa biológicamente la transmisión de la señal intracelular de HGF. En la Fig. 8 se 55 presenta una secuencia de proteína c-met humana de tipo silvestre basada en RefSeq NM\_000245.

Los términos "sitio de corte y empalme", "unión de corte y empalme", "punto de ramificación", "tracto de 55 polipirimidina", tal como se usan en la presente, refiere al significado conocido en la técnica en el contexto de cortes y empalme de ARN en mamíferos, en particular seres humanos. Véase, p.ej., Pagani & Baralle, *Nature Reviews: Genetics* (2004), 5:389-396, y las referencias allí citadas. Para referencia conveniente, en la Fig. 7 se plantea ilustrativamente una forma de realización de secuencias para elementos de corte y empalme de c-met ARN.

El término "célula huésped" (o "célula huésped recombinante"), tal como se usa en la presente, pretende referir a 60 una célula que ha sido alterada genéticamente, o es capaz de ser alterada genéticamente mediante la introducción de un polinucleótido exógeno, tal como un plásmido o vector recombinante. Debe entenderse que tales términos pretenden referirse no solo a la célula sujeta en particular, sino a la progenie de dicha célula. Dado que pueden 65 ocurrir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas, debido a mutaciones o influencias ambientales, de hecho dicha progenie puede no ser idéntica a la célula progenitora, pero aún así se incluye en el alcance del término "célula huésped" tal como se usa en la presente.

"Anticuerpos" (Abs) e "inmunoglobulinas" (Igs) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos exhiben especificidad de unión con un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen ambos anticuerpos y otras moléculas similares que generalmente carecen de especificidad por el antígeno. Los polipéptidos del último tipo son, por ejemplo, producidos en bajas concentraciones por el sistema linfático y en mayores concentraciones por los mielomas.

5 Los términos "anticuerpo" y "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (p.ej., anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos monovalentes, multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (p.ej., anticuerpos biespecíficos 10 siempre que exhiban la actividad biológica de interés) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpo (tal como se describe con mayor detalle en la presente). Un anticuerpo puede ser químico, humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

15 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden solo una fracción de un anticuerpo intacto, donde la fracción de preferencia retiene menos una, de preferencia la mayor parte o la totalidad de las funciones normalmente asociadas a dicha porción cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una forma de realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de fijación del antígeno del anticuerpo intacto y en consecuencia retiene la capacidad para fijar el antígeno. En otra forma de realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la 20 región Fc, retiene al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tales como la fijación de FcRn, la modulación de la vida media del anticuerpo, la función ADCC y la fijación de complemento. En una forma de realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una vida media in vivo sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo fijador del antígeno unido a una secuencia Fc 25 capaz e conferir estabilidad in vivo al fragmento.

25 El término "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en la presente refiere a las regiones de un dominio de anticuerpo variable que son hipervariables en secuencia y/o forman asas estructuralmente definidas. Las letras "HC" y "LC" que preceden el término "HVR" o "HV" refieren, respectivamente, a HVR o HV de una cadena pesada y una cadena liviana. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en VH (H1, H2, 30 H3), y tres en VL (L1, L2, L3). Se usan numerosas delineaciones de regiones hipervariables y están incluidas en la presente. Las regiones determinantes de complementariedad de Kabat (CDR) se basan en la variabilidad de secuencia y son las de uso más común (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5° Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). En cambio, Chothia refiere, a la ubicación de las 35 asas estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las regiones AbM hipervariables representan un compromiso entre los CDR de Kabat y las asas estructurales de Chothia, y son usadas por el software de modelado de anticuerpos de Oxford Molecular AbM. Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en el análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables se presentan más adelante.

40 Asa Kabat AbM Chothia Contacto

L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36	
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55	
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96	
45	H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(Numeración de Kabat)				
	H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Numeración de Chothia)				
50	H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
	H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Los residuos "de marco" o "FR" son los residuos de dominio variable distintos de los residuos de región hipervariable definidos en la presente.

55 La "región variable" o el "dominio variable" de un anticuerpo refiere a los dominios de terminal amino de las cadenas pesada o liviana del anticuerpo. Estos dominios son generalmente las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios fijadores del antígeno.

60 El término "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en la presente refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se encuentran en la naturaleza, que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y están dirigidos contra un único antígeno. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que generalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra distintos determinantes (epitopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido 65 contra un único determinante sobre el antígeno.

- Los anticuerpos monoclonales de la presente incluyen específicamente los anticuerpos "químicos", en los cuales una fármacoión de las cadenas pesada y/o liviana es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de otra especie o perteneciente a una clase o subclase particular de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica de interés (Patente de los Estados Unidos No. 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).
- 5 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p.ej., murinos) son anticuerpos químicos que contienen 10 una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos provenientes de una región hipervariable del receptor son reemplazados por los residuos provenientes de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la 15 especificidad, la afinidad y la capacidad de interés. En algunas instancias, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo 20 donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el desempeño del anticuerpo performance. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y generalmente dos dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente la totalidad de las 25 asas hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de los FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una fracción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), generalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes 25 artículos y referencias citadas en la presente: Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994).
- 30 Un "anticuerpo humano" es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que ha sido preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos tal como se describe en la presente. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos fijadores de antígeno no humanos.
- 35 Un anticuerpo "madurado por afinidad" es aquel que tiene una o más alteraciones en uno o más de sus CDR/HVR, lo cual da por resultado un mejoramiento de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, comparado con un anticuerpo progenitor que no posee tal(es) alteración(es). Los anticuerpos madurados por afinidad de preferencia tendrán 40 afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno blanco. Los anticuerpos madurados por afinidad son preparados por procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992) describe la maduración por afinidad por traspaso de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de CDR/HVR y/u otros residuos de marco se describe en Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci., USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al. J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).
- 45 El término "región Fc" se usa para definir la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que se puede generar por digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Si bien los límites de la región Fc de la cadena pesada de una inmunoglobulina pueden variar, por lo general se define la región Fc de la cadena pesada de una IgG humana por estirarse desde un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición Cys226, o desde aproximadamente la 50 posición Pro230, hasta el carboxilo terminal de la región Fc. La región Fc de inmunoglobulina generalmente comprende dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y opcionalmente comprende un dominio CH4. En la presente, se entiende por "cadena de la región Fc" una de las dos cadenas de polipéptido de una región Fc.
- 55 El término "agente citotóxico" tal como se usa en la presente refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa la destrucción de las células. El término pretende incluir los isótopos radiactivos (p.ej., At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> y los isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluso sus fragmentos y/o variantes.
- 60 Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico de utilidad en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN® ciclosfosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluso altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluso el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®),

acetilcampototecina, escopolectina y 9-aminocampototecina); briostatina; callistatina; CC-1065 (incluso los análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficinas8); dolastatina; duocarmicina (incluso los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictiina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato óxido de mecloretamina, melfalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (p.ej., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma1 y caliqueamicina omegall (Véase, p.ej., Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluso dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y antibióticos cromóforos de cromoproteínas enediina relacionadas), aclacinomicinas, actinomicina, antramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluso ADRIAMICINA®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección por lisosoma de HCl de doxorubicina (DOXIL®) y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodrorubicina, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; antisuprarrenales tales como aminoglutetimida mitotano, trilostano; reposidores de ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-ethylhidrazida, procarbazina; cOmplejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, p.ej., paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas de albúmina por ingeniería de paclitaxel (ABRAXANE™), y doxetaxel (TAXOTERE®); cloranbucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN ®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; las sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como las combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, abreviatura de terapéutica combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, abreviatura el régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

40 También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas capaces de promover el crecimiento canceroso, y a menudo están en la forma de tratamiento sistémico o de todo el organismo. Pueden ser hormonas. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluso, por ejemplo, tamoxifeno (incluso NOLVADEX® tamoxifeno), raloxifeno (EVISTA®), droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (FARESTON®); anti-progesteronas; reguladores hacia debajo de receptor de estrógeno (ERD); antagonistas de receptor de estrógenos tales como fulvestrante (FASLODEX®); agentes que funcionan para suprimir o cerrar los ovarios, por ejemplo, hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) agonistas tales como acetato de leuproliida (LUPRON® y ELIGARD®), acetato de goserelina, acetato de buserelina y triptereolina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MEGASE®), exemestano (AROMASIN®), formestano, fadrozol, vorozol (RIVISOR®), letrozol (FEMARA®) y anastrozol (ARIMIDEX®). Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); así como troxacitabina (un análogo de citosina 1,3-dioxolannucleósido); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en las vías de señales implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor de factor del crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (p.ej., LURTOTECAN®); rmRH (p.ej., ABARELIX®); ditosilato de lapatinib (un inhibidor dual de tirosinacincinasa ErbB-2 y EGFR de moléculas pequeñas también denominado GW572016); inhibidores de COX-2 tales como celecoxib (CELEBREX ®; 4-(5-(4-metilphenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il) bencensulfonamida; y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de todos los anteriores.

65

Un anticuerpo "bloqueador" o anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno que fija. Dicho bloqueo puede ocurrir por cualquier medio, p.ej. por interferencia con la interacción proteína-proteína tal como la fijación del ligando a un receptor. En una forma de realización, los anticuerpos bloqueadores o anticuerpos antagonistas inhiben sustancialmente o completamente la actividad biológica del antígeno.

- 5 Los términos "cáncer" y "canceroso" refiere o describen la condición fisiológica en mamíferos que generalmente se caracteriza por el crecimiento/proliferación celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen sin limitaciones, carcinoma, linfoma (p.ej., linfoma Hodgkin y no Hodgkin), blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células pavimentosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma pavimentoso del pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer colon, cáncer colonorectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer hepático, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.
- 10 15 Tal como se usa en la presente, "tratamiento" refiere a la intervención clínica en un intento por alterar el curso natural del individuo o célula tratados, y se puede llevar a cabo por profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos de interés del tratamiento incluyen la prevención de la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, 20 la prevención de metástasis, la reducción de la velocidad de progresión de la enfermedad, la mejora o la paliación del estado de enfermedad y la remisión o el mejoramiento del pronóstico. En algunas formas de realización, se usan las moléculas moduladoras y los métodos de la invención para retardar del desarrollo de una enfermedad o trastorno.
- 25 30 35 Una "cantidad efectiva" refiere a una cantidad efectiva en las dosis y por los períodos necesarios para alcanzar los resultados terapéuticos o profilácticos deseados. Una cantidad "terapéuticamente efectiva" de un agente terapéutico puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el género y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo para generar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es aquella para la cual cualquier efecto tóxico o negativo del agente terapéutico es compensado con creces por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" refiere a una cantidad efectiva para las dosis y por los períodos necesarios para alcanzar el resultado profiláctico deseado. Por lo general, pero no necesariamente, dado que una dosis profiláctica se usa en los sujetos antes de la enfermedad o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva es inferior a la cantidad terapéuticamente efectiva.

#### 35 Composiciones y métodos de la invención

##### A. Anticuerpos antagonistas de c-met

- 40 La invención se refiere a anticuerpos antagonistas de c-met que pueden ser usados en la presente como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico. Los ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados. Los aspectos de la generación, la identificación, la caracterización, la modificación y la producción de anticuerpos están bien establecidos en la técnica, p.ej., tal como se describe en la Solicitud publicada de patente de los Estados Unidos N.º 2005/0042216 en los párrafos 522 a 563, 604 a 608, y 617 a 688.

45 Los anticuerpos antagonistas de c-met descritos en la presente pueden ser formulados de cualquier forma adecuada para la aplicación a una célula/tejido blanco. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser formulados como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o agentes tensioactivos de utilidad para administrar un fármaco a un mamífero. Por lo general, los componentes del liposoma se disponen en una formación de bicapa similar a la disposición lipídica de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tal como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); las Patentes de los Estados Unidos N.º 4.485.045 y 4.544.545; y WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. 50 55 Los liposomas con tiempo de circulación incrementado se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 5.013.556.

60 65 Se pueden generar liposomas de particular utilidad mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidileanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extraen a través de filtros de un tamaño de poro definido para dar liposomas con un diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar a los liposomas tal como se describe en Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente se coloca un agente quimioterapéutico en el interior del liposoma. Véase Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989).

##### B. Polipéptidos antagonistas de c-met

Un antagonista de c-met puede comprender un polipéptido. El polipéptido antagonista se puede fijar y/o antagonizar la proteína de c-met hiperestabilizado en una célula. Opcionalmente, los polipéptidos se fijan, de preferencia específicamente, al c-met hiperestabilizado. Los polipéptidos pueden ser sintetizados químicamente mediante el uso de metodologías de síntesis de péptidos conocidas o se pueden preparar y purificar mediante tecnología recombinante. En una forma de realización, un polipéptido antagonista de c-met tiene al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 aminoácidos de longitud o más, donde dichos polipéptidos son capaces de inhibir la actividad de c-met hiperestabilizado. Estos polipéptidos pueden ser identificados sin experimentación innecesaria mediante el uso de técnicas bien conocidas. En este sentido, cabe destacar que las técnicas para la búsqueda de oligopéptidos en las bibliotecas de oligopéptidos capaces de unirse específicamente a un blanco de polipéptido son bien en la técnica (véase, p.ej., Las Patentes de los Estados Unidos N° 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.22 3.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; las publicaciones PCT N.º WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., Proc. N atl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen et al., en *Synthetic Peptides as Antigens*, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B. et al. (1991) *Biochemistry*, 30:10832; Clackson, T. et al. (1991) *Nature*, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, y Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668).

La presentación por bacteriófago (fago) es una técnica bien conocida que permite buscar en grandes bibliotecas de oligopéptidos para identificar miembro(s) de estas bibliotecas con capacidad para unirse específicamente a un polipéptido blanco. La presentación por fago es una técnica por la cual variantes de polipéptidos se presentan como proteínas de fusión a la proteína de cubierta en la superficie de las partículas de bacteriófago (Scott, J.K. y Smith, G. P. (1990) *Science*, 249: 386). La utilidad de la presentación por fago radica en el hecho de que grandes bibliotecas de variantes de proteínas selectivamente aleatorizadas (cADN clonados en forma aleatoria) pueden ser revisadas en forma rápida y eficiente para encontrar las secuencias que se fijan a una molécula blanco con gran afinidad. Se han usado bibliotecas de presentación de péptidos (Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378) o protein (Lowman, H.B. et al. (1991) *Biochemistry*, 30:10832; Clackson, T. et al. (1991) *Nature*, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363) en fagos para analizar millones de polipéptidos u oligopéptidos en búsqueda de aquellos con propiedades de fijación específicas (Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668). La búsqueda de mutantes aleatorios en las bibliotecas de fagos requiere un estrategia para construir y propagar una gran cantidad de variantes, un procedimiento de purificación por afinidad que usa el receptor blanco, y un medio para evaluar los resultados de los enriquecimientos de fijación (Patentes de los Estados Unidos N° 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689. y 5.663.143).

Aunque la mayoría de los métodos de presentación de fagos han usado fagos filamentosos, también se conocen sistemas de presentación de fagos lambda (WO 95/34683; Patente de los Estados Unidos N.º 5.627.024), sistemas de presentación de fago T4 (Ren et al., Gene, 215: 439 (1998); Zhu et al., *Cancer Research*, 58(15): 3209-3214 (1998); Jiang et al., *Infection & Immunity*, 65(11): 4770-4777 (1997); Ren et al., Gene, 195(2):303-311 (1997); Ren, *Protein Sci.*, 5: 1833 (1996); Efimov et al., *Virus Genes*, 10: 173 (1995)) y sistemas de presentación de fago T7 (Smith y Scott, *Methods in Enzymology*, 217: 228-257 (1993); Patente de los Estados Unidos N.º 5.766.905).

Actualmente se han desarrollado muchos otros mejoramientos y variaciones del concepto básico de presentación de fago. Estos mejoramientos incrementan la capacidad de los sistemas de presentación para buscar en las bibliotecas de péptidos la fijación a las moléculas blanco seleccionadas y presentar proteínas funcionales con el potencial para buscar estas proteínas con propiedades de interés.

Se han desarrollado dispositivos de reacción combinatoria para las reacciones de presentación de fago (WO 98/14277) y se han usado bibliotecas de presentación de fagos para analizar y controlar las interacciones bimoleculares (WO 98/20169; WO 98/20159) y las propiedades de los péptidos helicoidales restringidos (WO 98/20036). WO 97/35196 describe un método para aislar un ligando por afinidad en el cual se pone en contacto una biblioteca de presentación de fago con una solución en la cual el ligando se fijará a una molécula blanco y una segunda solución en la cual el ligando por afinidad no se fijará a la molécula blanco, para aislar selectivamente los ligandos de fijación. WO 97/46251 describe un método de biopaneo de una biblioteca de presentación de fago aleatoria con un anticuerpo purificado por afinidad y luego aislar el fago de fijación, seguido de un proceso de micropaneo mediante el uso de cavidades de microplacas para aislar el fago con elevada afinidad de fijación. También se ha informado el uso de proteína A de *Staphylococcus aureus* como rótulo de afinidad (Li et al. (1998) *Mol Biotech.*, 9:187). WO 97/47314 describe el uso de bibliotecas de sustracción de sustrato para distinguir especificidades de enzima mediante el uso de una biblioteca combinatoria que puede ser una biblioteca de presentación de fago. Un método para seleccionar las enzimas adecuadas para el uso en detergentes mediante el uso de presentación por fago se describe en WO 97/09446. Otros métodos de selección de proteínas de fijación específicas se describen en las Patentes de los Estados Unidos N° 5.498.538, 5.432.018. y WO 98/15833.

Los métodos para generar bibliotecas de péptido y analizar estas bibliotecas se describen también en las Patentes de los Estados Unidos N° 5.723.286, 5.432.018, 5.580.717, 5.427.908, 5.498.530, 5.770.434, 5.734.018, 5.698.426, 5.763.192 y 5.723.323.

5 Los métodos para generar, identificar, caracterizar, modificar y producir polipéptidos antagonistas están bien establecidos en la técnica, p.ej., tal como se describe en la Solicitud publicada de patente de los Estados Unidos N.º 2005/0042216 en los párrafos 606 a 608, 614 a 688.

10 Se pueden diseñar los polipéptidos para antagonizar la actividad de c-met hiperestabilizado sobre la base de la estructura de la proteína de c-met hiperestabilizado, p.ej. sobre la base de un antígeno blanco que comprenda una secuencia yuxtamembrana de c-met mutante que comprende la delección de al menos una fracción de exón 14 tal como se describe en la presente. Por ejemplo, un antígeno blanco puede comprender un polipéptido que comprende una secuencia que es el resultado de un corte y empalme en marco de los exones 13 y 15 de c-met.

15 C. Inmunoconjungados

En otro aspecto, la invención se refiere a inmunoconjungados o conjungados anticuerpo-fármaco (ADC), que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor de crecimiento, una toxina (p.ej., una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o sus fragmentos), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjungado).

20 El uso de conjungados anticuerpo-fármaco para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para matar o inhibir las células tumores en el tratamiento de cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu- Duvaz y Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172; patente de los Estados Unidos N.º 4.975.278) permite la entrega dirigida de la fracción de fármaco a los tumores, y la acumulación intracelular allí, donde la administración sistémicas de estos agentes farmacológicos no conjugados puede dar por resultado concentraciones inaceptables de toxicidad a las células normales, al mismo tiempo que a las células tumorales que se desea eliminar (Baldwin et al., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies'84: Biological y Clinical Applications, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506). De ese modo se busca máxima eficacia con mínima toxicidad. Se ha informado que tanto los anticuerpos polyclonales y los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland et al., (1986) supra). Las toxinas usadas en conjungados anticuerpo-toxino incluyen toxinas bacterianas tales como toxina de difteria, toxinas vegetales tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamicina (Mandler et al (2000) Jour. de the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maytansinoids (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623), y caliqueamicina (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Las toxinas pueden producir sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen fijación a 25 tubulina, fijación a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan a grandes anticuerpos o ligandos de proteína de receptor.

30 ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetano, Biogen/Idec) es un conjungado anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de linfocitos B normales y malignos y radioisótopo <sup>111</sup>In o <sup>90</sup>Y unido por un quelante ligador de tiourea (Wiseman et al (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). Si bien ZEVALIN posee actividad contra el linfoma de células B no Hodgkin (NHL), la administración da por resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MILOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), es un conjungado de anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo huCD33 unido a caliqueamicina, y fue aprobado en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda por inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; Patentes de los Estados Unidos N.º 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), es un conjungado anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 unido mediante un ligador disulfuro SPP a la fracción del fármaco maitansinoide, DM1, y es estudiado es para el 35 tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como cáncer de colon, de páncreas, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjungado anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal antiantígeno específico de membrana prostática (PSMA) unido a la fracción del fármaco maitansinoide, DM1, es estudiado para el posible tratamiento de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina auristatina E (AE) y monometilaurostatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, fueron conjungados a anticuerpos monoclonales 40 químicos CBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico para CD30 en enfermedades malignas hematológicas) (Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784) y se encuentran en estadio de desarrollo terapéutico.

45 Los agentes quimioterapéuticos de utilidad en la generación de inmunoconjungados se describen en la presente (más arriba). Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden usar incluyen la cadena A de difteria, los fragmentos activos no fijadores de toxina de difteria, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas*

5 aeruginosa), la cadena A de ricina, la cadena A de abrin, la cadena A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, p.ej., WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Se dispone de diversos radionucleidos para la producción de anticuerpos radioconjungados. Los ejemplos incluyen <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y y <sup>186</sup>Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de dimetiladipimidato), ésteres activos (tales como disuccinimidilsuberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexandiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoibenzooil)etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen-2,6-diisocinato) y compuestos bis-activos de flúor (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Véase WO94/11026.

10

15

20 Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, dolostatinas, aurostatinas, un tricoteceno, y CC1065, y los derivados de estas toxinas con actividad de toxina, también están contemplados en la presente.

25 Maitansina y maitansinoides

El inmunoconjungado puede comprender un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de maitansinoide.

25 Los maitansinoides con inhibidores mitotóxicos que actúan por inhibición de la polimerización de tubulina. La maitansina fue aislada por primera vez del arbusto del este africano *Maytenus serrata* (Patente de los Estados Unidos No. 3.896.111). Luego se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol (Patente de los Estados Unidos No. 4.151.042). El maitansinol sintético y sus derivados y análogos se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos N° 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

30 35 Las fracciones de fármacos maitansinoides son atractivas para conjugados anticuerpo-fármaco porque son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química, derivación de productos de fermentación, (ii) aceptan la derivación con grupos funcionales adecuados para la conjugación con los anticuerpos mediante ligadores no disulfuro, (iii) estables en plasma, y (iv) efectivos contra diversas líneas celulares tumorales.

40 Los ejemplos de formas de realización de fracción maitansinoides incluyen: DM1; DM3 y DM4. Los inmunoconjungados que contienen maitansinoides, los métodos para prepararlos, y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos N° 5.208.020, 5.416.064, y la Patente europea EP 0 425 235 B1. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describe inmunoconjungados que comprenden un maitansinoide designado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colonorectal humano. Se halló que el conjugado era altamente tóxico contra células cultivadas de cáncer de colon, y presentaron actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral in vivo. Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) describe inmunoconjungados en los cuales se conjugó un maitansinoide mediante unión de disulfuro al anticuerpo A7 murino que se fija a un antígeno sobre líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal TA.1 que se fija al oncogen HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maytansinoid fue probada in vitro en la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3, que expresa  $3 \times 10^5$  antígenos de superficie HER-2 por célula. El fármaco conjugado logró un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que podría incrementarse por aumento de la cantidad de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

45 55 Los conjugados anticuerpo-maitansinoide se pueden preparar por formación de enlaces químicos entre un anticuerpo y una molécula de maitansinoide sin reducción significativa de la actividad biológica del anticuerpo o la molécula de maitansinoide. Véase, p.ej., Patente de los Estados Unidos No. 5.208.020. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha demostrado ser eficaz en incrementar la citotoxicidad de las células blanco sin afectar la función o la solubilidad del anticuerpo, si bien es de esperar que incluso una molécula de toxina/anticuerpo podría incrementar la citotoxicidad en comparación con del uso del anticuerpo solo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y pueden ser sintetizados mediante las 60 técnicas conocidas o aislados de fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados se describen, por ejemplo, en Patente de los Estados Unidos No. 5.208.020 y en las demás patentes y publicaciones no patentes referidas con anterioridad en la presente. Los maitansinoides de preferencia son maitansinol y los análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitanisol.

- Muchos grupos ligadores conocidos en la técnica se pueden usar para preparar conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluso, por ejemplo, los descritos en Patente de los Estados Unidos No. 5.208.020 o patente EP 0 425 235 B1, Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992), y US20050169933. Los conjugados anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente ligador SMCC se pueden preparar tal como se describe en US20050169933. Estos grupos ligadores incluyen grupos disulfuro, grupos tioéster, grupos acidolábiles, grupos fotolábiles, grupos lábiles por peptidasa o grupos lábiles por esterasas, tal como se describe en las patentes antes mostradas, donde se prefieren los grupos disulfuro y tioéster. Otros grupos ligadores se describen y ejemplifican en la presente.
- 5 10 Los conjugados de anticuerpo y maitansinoide se pueden preparar mediante el uso de diversos agentes de acople proteicos bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidilsuberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexandiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen-2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Los agentes de acople particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proveer un enlace disulfuro.
- 15 20 25 El ligador se puede adosar a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, según el tipo del enlace. Por ejemplo, se puede formar un enlace éster por reacción con un grupo hidroxilo mediante técnicas de acople convencionales. La reacción puede ocurrir en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una forma de realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

#### Auristatinas y dolostatinas

- 30 Los inmunoconjungados pueden comprender un anticuerpo conjugado con dolastatinas o análogos peptídicos y derivados de dolostatina, las auristatinas (Patentes de los Estados Unidos N.º 5635483; 5780588). Se ha demostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y poseen actividad anticáncer (US 5663149) y antifúngica (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). La fracción farmacológica de dolastatina o auristatina puede estar adosada al anticuerpo a través del N (amino) terminal o el C (carboxilo) terminal de la fracción del fármaco peptídico (WO 02/088172).

35 Los ejemplos de forma de realización con auristatina incluyen las fracciones farmacológicas monometilauristatina DE y DF unidas a N-terminal descritas en "Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US20050238649.

40 45 Ejemplos de formas de realización con auristatina son MMAE y MMAF. Otros ejemplos de forma de realización con auristatina que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes ligadores (descritos con más detalle en la presente) son Ab-MC-vc-PAB-MMAF, Ab-MC-vc-PABMMAE, Ab-MC-MMAE y Ab-MC-MMAF.

50 55 Por lo general, las fracciones farmacológicas basadas en péptidos se pueden preparar por formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Estos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (Véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) bien conocido en el campo de la química peptídica. Las fracciones farmacológicas de auristatina/dolastatina se pueden preparar de acuerdo con los métodos de: US 5635483; US 5780588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996,719-725; y Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863. Véase también Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784; "Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US20050238649 (que describe, p.ej., ligadores y métodos para preparar compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados a ligadores).

#### Caliqueamicina

60 65 El inmunoconjungado puede comprender un anticuerpo conjugado a una más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina puede producir rupturas de ADN bicitenarios con concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, Véase las Patentes de los Estados Unidos 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todos de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliqueamicina II que se pueden usar incluyen, sin limitaciones,  $\gamma_1^1$ ,  $\alpha_2^1$ ,  $\alpha_3^1$ , N-acetil  $\gamma_1^1$ , PSAG y  $\theta_1^1$  (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las antes mencionadas Patentes de los Estados Unidos de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral al que se puede conjugar el anticuerpo es QFA, un antifolato. La caliqueamicina y QFA poseen sitios de acción intracelulares y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. En

consecuencia, la captación celular de estos gérmenes por internalización mediada por anticuerpos incrementa en gran medida sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

5 Otros agentes antitumorales que pueden ser conjugados a los anticuerpos incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes denominada en conjunto complejo LL-E33288 descrito en las Patentes de los Estados Unidos 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (Patente de los Estados Unidos 5.877.296).

10 Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden usar incluyen la cadena A de difteria, los fragmentos activos no fijadores de toxina diftérica, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

15 También se contempla un immunoconjunto formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (p.ej., una ribonucleasa o una ADN-endonucleasa tales como una desoxirribonucleasa; ADNs).

20 Para la destrucción selectiva del tumor, el puede comprender un átomo altamente radiactivo. Están disponibles diversos isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjungados. Los ejemplos incluyen At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> e isótopos radiactivos de Lu. Cuando se usa el conjugado para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios centellográficos, por ejemplo tc<sup>99m</sup> o I<sup>123</sup>, o un rótulo de spin para imágenes de resonancia nuclear magnética (RNM) (también denominado imágenes de resonancia magnética, irm), tales como nuevamente yodo 123, yodo 131, indio 111, flúor 19, carbono 13, nitrógeno 15, oxígeno 17, gadolinio, manganeso o hierro.

25 30 El rótulo radiactivo o de otro tipo puede ser incorporado en el conjugado de las formas conocidas. Por ejemplo, el péptido puede ser sintetizado o ser sintetizado por síntesis química de aminoácido mediante el uso de precursores adecuados de aminoácidos que incluyen, por ejemplo, flúor 19 en lugar de hidrógeno. Se pueden adosar rótulos tales como tc<sup>99m</sup> o I<sup>123</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup> e In<sup>111</sup> a través de un residuo de cisteína en el péptido. Se puede adosar yodo 90 mediante un residuo de lisina. Se puede usar el método IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 para incorporar yodo 123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal,CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

35 Se pueden preparar conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico mediante e uso de diversos agentes de acople de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidilsuberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexandiamina), erivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazonio)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildielenitriaminopentaacético con rótulo de carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido al anticuerpo. Véase WO94/11026. El ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un ligador acidolábil, un ligador sensible a peptidasa, un ligador fotolábil, un ligador dimetilo o un ligador que contiene disulfuro (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); Patente de los Estados Unidos No. 5.208.020).

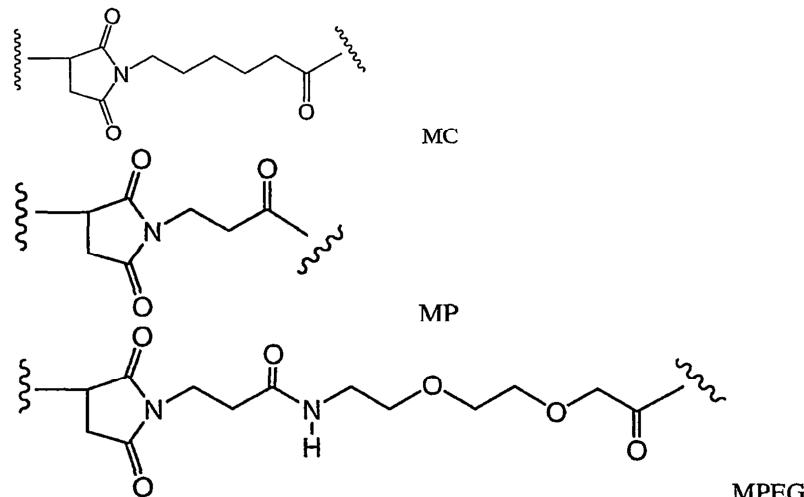
40 45 50 Los compuestos pueden ser expresamente, pero sin limitaciones, preparados ADC con reactivos ligadores cruzados: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfon)benzoato) disponibles en el comercio (p.ej., de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., Estados Unidos). Véase las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Preparación de conjugados anticuerpo-fármaco

55 60 65 En los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), un anticuerpo (Ab) es conjugado a uno o más fracciones de fármaco (D), p.ej. aproximadamente 1 a aproximadamente 20 porciones de fármaco por anticuerpo, a través de un ligador (L). El ADC de la Fórmula I se puede preparar por varias vías, empleando reacciones e química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la técnica: 1) reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un reactivo ligador bivalente, para formar Ab-L mediante un enlace covalente, seguido de una reacción con una fracción de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleofílico de una fracción de fármaco con un reactivo de ligador bivalente para formar D-L mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleofílico de un anticuerpo. Se describen métodos adicionales para preparar ADC en la presente.

Ab-(L-D)p I

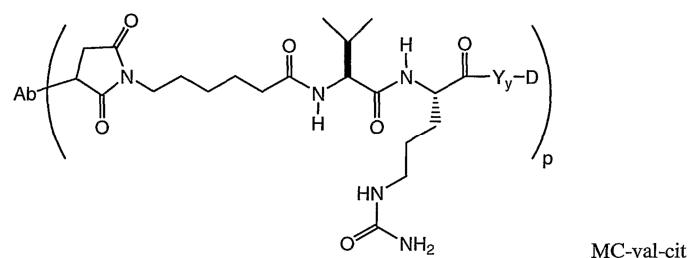
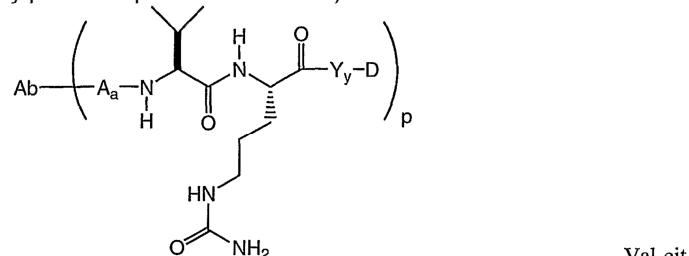
- 5 El ligador puede estar compuesto por uno o más componentes ligadores. Los ejemplos de componentes ligadores incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxicarbonilo ("PAB"), N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato ("SPP"), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato ("SMCC") y N-succinimidil(4-yodo-acetil)aminobenzoato ("SIAB"). Otros componentes ligadores son conocidos en la técnica y algunos se describen en la presente. Véase también "Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US20050238649.
- 10 15 20
- El ligador puede comprender residuos aminoácido. Los ejemplos de componentes ligadores de aminoácido incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los ejemplos de dipéptidos incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los ejemplos de tripéptidos incluyen: glicina-valine-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los residuos de aminoácido que comprenden un componente ligador de aminoácido incluyen los que se encuentran en la naturaleza, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos que no se encuentran en la naturaleza, tales como citrulina. Los componentes ligadores de aminoácido pueden ser diseñados y optimizados en su selectividad para la escisión enzimática por enzimas particulares, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.
- A continuación se muestran ejemplos de estructuras de componentes ligadores (donde la línea ondulada indica los sitios de unión covalente a otros componentes de ADC):

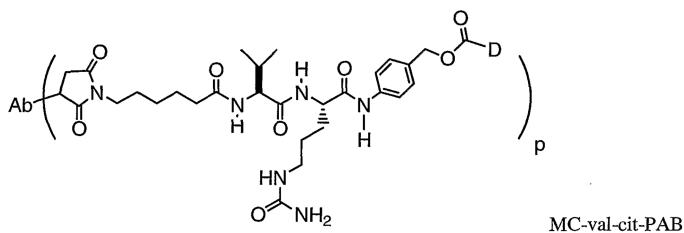


25

Otros ejemplos de componentes ligadores y abreviaturas incluyen (donde se muestran el anticuerpo (Ab) y el ligador, y p es 1 a aproximadamente 8):

30





Los grupos nucleofílicos sobre los anticuerpos incluyen, sin limitaciones: i) grupos amino N-terminal, ii) grupos amina de cadena lateral, p.ej. lisina, iii) grupos tiol de cadena lateral, p.ej. cisteína, y iv) grupos hidroxilo o amino azúcar donde el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleofílicos y pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos sobre las fracciones ligadoras y los reactivos ligadores que incluyen:

- 5 ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBr, haloformiatos y haluros ácidos; ii) alquil y bencilhaluros tales como haloacetamidas; iii) grupos aldehído, cetona, carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir puentes cisteína. Los anticuerpos se pueden transformar en reactivos por conjugación con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitol). En consecuencia, cada puente de cisteína formará, en teoría, dos nucleófilos tiol reactivos. Se pueden introducir otros grupos nucleofílicos adicionales a los anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) lo que da por resultado la conversión de un amino en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden ser introducidos en el anticuerpo (o su fragmento) por introducción de uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (p.ej., al preparar anticuerpos mutantes que comprenden uno o más residuos de aminoácido de cisteína no nativos).
- 10 15 Los conjugados anticuerpo-fármaco también pueden ser producidos por modificación del anticuerpo para introducir fracciones electrofílicas que pueden reaccionar con sustituyentes nucleofílicos sobre el reactivo ligador o fármaco. Los azúcares de los anticuerpos glucosilados pueden ser oxidados, p.ej. con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amino de reactivos ligadores o fracciones de fármaco. Los grupos imino de base de Schiff obtenidos pueden formar un enlace estable, o pueden ser reducidos, p.ej. mediante reactivos de borohidruro para formar enlaces amino estables. En una forma de realización, la reacción de la fracción hidrato de carbono de un anticuerpo glucosilado con galactosaoxidasa o meta-periodato de sodio puede dar grupos carbonilo (aldehído y cetona) donde la proteína puede reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugado Techniques). En otra forma de realización, las proteínas que contienen residuos 20 25 N-terminales de serina o treonina pueden reaccionar con meta-periodato de sodio para dar un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugado Chem. 3:138-146; US 5362852). Dicho aldehído puede hacerse reaccionar con una fracción de fármaco o un nucleófilo ligador.
- 30 Asimismo, los grupos nucleofílicos en una fracción de fármaco incluyen, sin limitaciones: grupos amino, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazincarboxilato y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos sobre fracciones ligadoras y reactivos ligadores que incluyen: i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBr, haloformiatos y haluros ácidos; ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; iii) grupos aldehído, cetona, carboxilo y maleimida.
- 35 Alternativamente, se puede preparar una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y el agente citotóxico, p.ej., por técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud del ADN puede comprender las respectivas regiones codificadoras de dos fracciones del conjugado, ya sean adyacentes entre sí o estén separadas por una región que codifica un péptido ligador que no destruya las propiedades de interés del conjugado.
- 40 El anticuerpo puede ser conjugado a un "receptor" (como estreptavidina) para su utilización en la detección previa de un tumor, donde el conjugado anticuerpo-receptor es administrado al paciente, seguido de la remoción del conjugado no unido de la circulación mediante un agente limpiador y luego la administración de un "ligando" (p.ej., avidina) que es conjugado a un agente citotóxico (p.ej., a radionucleótido).
- 45 Se puede preparar el anticuerpo (Ab)-MC-MMAE por conjugación de cualquiera de los anticuerpos provistos en la presente con MCMMAE, como sigue. Se trata el anticuerpo, disuelto en borato de sodio 500 mM y cloruro de sodio 500 mM a pH 8,0, con un exceso de ditiotreitol 100 mM (DTT). Despues de incubar a 37°C durante aproximadamente 30 minutos, se cambia el buffer por elución sobre resina Sephadex G25 y se eluye con PBS con DTPA 1 mM. Se controla el valor tiol/Ab por determinación de la concentración del anticuerpo reducido de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol por reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfria sobre hielo. El reactivo de ligador de fármaco, maleimidocaproil-monometilauristatina E (MMAE), es decir MC-MMAE, disuelto en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua a concentración conocida, y se agrega al anticuerpo reducido enfriado 2H9 en PBS. Despues de aproximadamente una hora, se agrega un exceso de maleimida para frenar la reacción y recubrir cualquier grupo tiol del anticuerpo que no haya reaccionado. La mezcla de reacción se concentra por ultrafiltración centrífuga y se purifica 2H9-MC-MMAE y se elimina la sal por elución a través de resina G25 en PBS, se filtra por filtros de 0,2 mm en condiciones de esterilidad, y se congela para su almacenamiento.
- 50 55

Se puede preparar anticuerpo-MC-MMAF por conjugación de cualquiera de los anticuerpos provistos en la presente con MC-MMAF, según el protocolo provisto para la preparación de Ab-MC-MMAE.

- 5 Se prepara anticuerpo-MC-val-cit-PAB-MMAE por conjugación de cualquiera de los anticuerpos provistos en la presente con MCval-cit-PAB-MMAE según el protocolo provisto para la preparación de Ab-MC-MMAE.
- 10 Se prepara anticuerpo-MC-val-cit-PAB-MMAF por conjugación de cualquiera de los anticuerpos provistos en la presente con MCval- cit-PAB-MMAF según el protocolo provisto para la preparación de Ab-MC-MMAE.
- 15 10 Se prepara anticuerpo-SMCC-DM1 por conjugación de cualquiera de los anticuerpos provistos en la presente con SMCC-DM1 como sigue. Se obtiene el derivado del anticuerpo purificado con (succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC, Pierce Biotechnology, Inc) para introducir el ligador SMCC. Específicamente, se trata el anticuerpo con 20 mg/mL en fosfato de potasio 50 mM/cloruro de sodio 50 mM EDTA2 mM, pH 6,5 con equivalentes 7,5 M de SMCC (en DMSO 20 mM, 6,7 mg/mL). Después de agitar durante 2 horas bajo argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra a través de una columna de Sephadex G25 equilibrada con fosfato de potasio 50 mM/cloruro de sodio 50 mM/EDTA 2 mM, pH 6,5. Se juntan las fracciones que contienen el anticuerpo y se analizan.
- 20 25 El anticuerpo-SMCC así preparado se diluye con fosfato de potasio 50mM/cloruro de sodio 50 mM/EDTA 2 mM, pH 6,5, hasta una concentración final de aproximadamente 10 mg/ml, y se hace reaccionar con una solución de DM1 10 mM en dimetilacetamida. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente bajo argón 16,5 horas. La mezcla de reacción de conjugación se filtra a través de una columna de filtración de gel de Sephadex G25 (1,5 x 4,9 cm) con 1 x PBS a pH 6,5. La proporción de fármaco DM1 - anticuerpo (p) puede ser de aproximadamente 2 a 5, medido por absorbancia a 252 nm y 280 nm.
- 25 30 Se prepara Ab-SPP-DM1 por conjugación de cualquiera de los anticuerpos provistos en la presente con SPP-DM1 como sigue. Se obtiene el derivado del anticuerpo purificado con N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato para introducir grupos ditiopiridilo. El anticuerpo (376,0 mg, 8 mg/mL) en 44,7 mL de buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5) que contiene NaCl (50 mM) y EDTA (1 mM) se trata con SPP (equivalentes 5,3 molar en 2,3 mL de etanol). Despues de incubación durante 90 minutos bajo argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra en gel a través de una columna de Sephadex G25 equilibrada con citrato de sodio 35 mM, NaCl 154 mM, EDTA2 mM. El anticuerpo que contiene las fracciones se junta y se analiza. El grado de modificación del anticuerpo se determina como se describió antes.
- 35 40 45 El anticuerpo-SPP-Py (aproximadamente 10 mmoles de grupos 2-tiopiridina liberables) se diluye con el anterior buffer de citrato de sodio 35 mM, pH 6,5, hasta una concentración final de aproximadamente 2,5 mg/mL. Luego se agrega DM1 (1,7 equivalentes, 17 mmoles) en dimetilacetamida 3,0 mM (DMA, 3 % v/v en la mezcla de reacción final) a la solución de anticuerpo. La reacción prosigue a temperatura ambiente bajo argón durante aproximadamente 20 horas. La mezcla de reacción se carga en una columna de filtración en gel de Sephadex S300 (5,0 cm x 90,0 cm, 1,77 L) equilibrada con de citrato de 35 mM, NaCl 154 mM, pH 6,5. La velocidad de flujo puede ser de aproximadamente 5,0 mL/min y se juntan 65 fracciones (20,0 mL cada una). La cantidad de moléculas de fármaco DM1 unidas por molécula de anticuerpo (p') se determina por medición de la absorbancia a 252 nm y 280 nm, y puede ser de aproximadamente 2 a 4 fracciones de fármaco DM1 por anticuerpo 2H9.
- 50 55 Anticuerpo-BMPEO-DM1 se prepara por conjugación de cualquiera de los anticuerpos provistos en la presente con BMPEO-DM1 como sigue. El anticuerpo se modifica mediante el reactivo bis-maleimido BM(PEO)4 (Pierce Chemical), y queda e grupo maleimido sin reaccionar en la superficie del anticuerpo. Esto se puede lograr al disolver BM(PEO)4 en una mezcla de 50 % de etanol/agua hasta una concentración de 10 mM y agregar un exceso diez veces molar a la solución que contiene anticuerpo en solución salina con buffer fosfato en una concentración de aproximadamente 1,6 mg/ml (10 micromolar) y dejar reaccionar durante 1 hora para formar el intermediario anticuerpo-ligador, 2H9-BMPEO. E retira el exceso de BM(PEO)4 por filtración en gel (columna HiTrap, Pharmacia) en citrato 30 mM, pH 6 con buffer NaCl 150 mM. Se disuelve un exceso aproximado de 10 veces molar de DM1 en dimetilacetamida (DMA) y se agrega al intermediario 2H9-BMPEO. También se puede emplear dimetilformamida (DMF) para disolver el reactivo de fracción de fármaco. La mezcla de reacción se deja reaccionar toda la noche antes de filtrar en gel o diálisis en PBS para extraer DM1 sin reaccionar. Se usa filtración en gel en columna S200 de PBS para extraer los cúmulos de alto peso molecular y obtener 2H9-BMPEO-DM1 purificado.
- D. Antagonista de c-met que comprende ácidos nucleicos
- 60 65 En un aspecto, un antagonista de c-met para el uso de acuerdo con la invención comprende una molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede comprender un oligonucleótido antisentido, un ARN inhibidor/de interferencia (p.ej., ARN inhibidor/de interferencia pequeño (siARN)) o un aptámero. Los métodos para buscar, identificar y preparar estos moduladores de ácido nucleico son conocidos en la técnica.
- 65 Por ejemplo, se ha demostrado que los siARN tienen capacidad para modular la expresión génica donde han fallado antagonistas tradicionales tales como moléculas pequeñas o anticuerpos. (Shi Y., Trends in Genetics 19(1):9-12

- (2003)). Los ARN bicatenarios sintetizados in vitro con menos de 30 nucleótidos de longitud (p.ej., aproximadamente 15 a 25, 17 a 20, 18 a 20, 19 a 20, o 21 a 23 nucleótidos) pueden actuar como ARN de interferencia (iARNs) e inhibir específicamente la expresión génica (Véase, p.ej., Fire A., Trends in Genetics (1999), 391; 806-810; US20020086356, US6506559; Patente de los Estados Unidos N.º 6.506.559; PCT/US01/10188; Solicitud Europea. 5 Ser. No. 00126325). Se cree que estos iARN actúan al menos en parte por mediar la degradación de sus ARN blanco. No obstante, dado que tienen menos de 30 nucleótidos de longitud, no desencadenan un mecanismo de defensa antiviral en una célula. Dichos mecanismos incluyen la producción de interferón, y un cierre general de la síntesis de proteínas de la célula huésped. En la práctica, se pueden sintetizar siARN y luego clonar a vectores de ADN, que se pueden transfectar y preparar para expresar altas concentraciones de siARN. El nivel elevado de 10 expresión de siARN se usa para "bloquear" o reducir significativamente la cantidad de proteína producida en una célula, y en consecuencia es útil en situaciones celulares donde se cree que la expresión excesiva de una proteína está unidas a un trastorno patológico.
- 15 Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico capaces de unirse a una molécula blanco, tal como una proteína de c-met hiperestabilizado. La generación y el uso terapéutico de aprámeros están bien establecidos en la técnica. Véase, p.ej., Patente de los Estados Unidos N.º 5.475. 096, y La eficacia terapéutica de Macugen® (Eyetech, Nueva York) para el tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad.
- 20 La tecnología antisentido está bien establecida en la técnica. Más adelante se proveen más detalles sobre esta tecnología.

#### E. Formulaciones farmacéuticas

- 25 Las formulaciones terapéuticas del antagonista de c-met usado de conformidad con la invención se preparan para ser almacenadas por mezcla del antagonista de c-met con el grado deseado de pureza, con opcionales portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes o estabilizadores (Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen buffers tales como acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluso ácido ascórbico y 30 metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecidimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; 35 polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono incluso glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; tonificantes tales como trehalosa y cloruro de sodio; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; agentes tensioactivos tales como polisorbato; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (p.ej., complejos Zn-proteína); y/o agentes tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG).
- 40 40 Las formulaciones en la presente también pueden contener más de un compuesto activo, según sea necesario para la indicación particular tratada, de preferencia los con actividades complementarias que no se afectan entre sí. Por ejemplo, además de un antagonista de c-met, puede ser conveniente incluir en una formulación, un modulador adicional, p.ej., un segundo anticuerpo que se fije a un epitopo diferente en la proteína del c-met hiperestabilizado, o 45 un anticuerpo para algún otro blanco. Como alternativa o además, la composición también puede comprender un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal, y/o cardioprotector. Dichas moléculas están presentes en forma adecuada en combinación y cantidades efectivas para el propósito pretendido.
- 50 50 Los ingredientes activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacílico), respectivamente, en sistemas coloidales de administración del fármaco (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>th</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980).
- 55 55 Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros sólidos hidrofóbicos que contienen el anticuerpo, donde las matrices tienen la forma de artículos, p.ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de los Estados Unidos N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ-etyl-L-glutamato, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que se usan para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

F. Tratamiento con un antagonista de c-met

- 5 Los antagonistas de c-met para el uso de acuerdo con la invención tienen varias aplicaciones terapéuticas. Los antagonistas pueden ser útiles para determinar los estadios o detectar las enfermedades que expresan c-met hiperestabilizado (p.ej., en radioimágenes). Los anticuerpos, oligopéptidos y aptámeros también pueden ser útiles para la purificación o inmunoprecipitación de c-met hiperestabilizado de las células, para la detección y 10 cuantificación de c-met hiperestabilizado in vitro, p.ej., un ELISA o inmunotransferencia Western, y para modular los eventos celulares en una población celular.
- 15 En la actualidad, según el estadio del cáncer, el tratamiento incluye una o una combinación de las siguientes terapéuticas: cirugía para extraer el tejido canceroso, radioterapia y quimioterapia. La terapéutica que comprende antagonistas de c-met puede ser de especial interés en pacientes de edad avanzada que no toleran bien la toxicidad y los efectos secundarios de la quimioterapia, y en la enfermedad metastásica cuando la radioterapia tiene utilidad limitada. Para las aplicaciones terapéuticas, los antagonistas de c-met se pueden usar solos, o en terapéutica de combinación, p.ej., con hormonas, antiangiogénos o compuestos con marca radiactiva, o con cirugía, crioterapia, y/o 20 radioterapia. Los antagonistas de c-met se pueden administrar en conjunción con otras formas de terapéutica convencional, ya sea en forma consecutiva, antes o después de la terapéutica convencional. Los fármacos quimioterapéuticos tales como TAXOTERE® (docetaxel), TAXOL® (paclitaxel), estramustina y mitoxantrona se usan en el tratamiento de cáncer, en particular, en pacientes con buen grado de riesgo. Los antagonistas de c-met generalmente se pueden administrar con una dosis terapéuticamente efectiva del agente quimioterapéutico. En otra forma de realización, un antagonista de c-met se administra en conjunción con quimioterapia para reducir los efectos 25 secundarios que resultan del agente quimioterapéutico, p.ej., paclitaxel. El Physicians' Desk Reference (PDR) describe dosis de estos agentes que se han usado en el tratamiento de diversos cánceres. El régimen de dosificación y las dosis de estos fármacos quimioterapéuticos antes mencionados que son terapéuticamente efectivos dependerán del cáncer particular tratado, la extensión de la enfermedad y otros factores conocidos por el médico experto en la técnica art y pueden ser determinados por el médico.
- 30 30 Los antagonistas de c-met se administran a un paciente humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, p.ej. como bolo o por infusión continua durante cierto periodo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. La administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica pequeña es una forma 35 de realización de la invención de preferencia.
- 35 Otros regímenes terapéuticos se pueden combinar con la administración del antagonista de c-met. La administración combinada incluye co-administración, el uso de formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde de preferencia hay un periodo durante el cual ambos (o todos) 40 los agentes activos ejercen sus actividades biológicas. De preferencia, dicha terapéutica combinada da por resultado un efecto terapéutico sinérgico y/o la reducción de efectos secundarios no deseados.
- 45 También puede ser deseable combinar la administración del antagonista de c-met con la administración de un agente terapéutico dirigido contra otro antígeno asociado con la condición patológica particular.
- 45 En otra forma de realización, los métodos de tratamiento terapéutico de la presente invención incluye la administración combinada de una molécula de un antagonista de c-met y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluso la co-administración de cócteles de diferentes agentes quíioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos incluyen fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5-fluorouracilo, melfalan, ciclofosfamida, hidroxiurea e hidroxiureataxanos (tales como paclitaxel y doxetaxel) y/o 50 antibióticos de antraciclina. La preparación y los esquemas de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o según lo determine empíricamente el médico experto en la técnica. La preparación y los esquemas de dosificación de tal quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).
- 55 55 El antagonista de c-met se puede combinar con un compuesto antihormonal; p.ej., un compuesto antiestrógeno tal como tamoxifeno; un antiprogestina tal como onapristona (véase, EP 616 812); o un antiandrógeno tal como flutamida, en dosis conocidas para tales moléculas. Cuando el cáncer se debe tratar como cáncer independiente de andrógenos, el paciente puede haber sido sometido previamente a terapéutica antiandrógenos, y después de que el 60 cáncer se transforme en independiente de andrógenos, se puede administrar el antagonista de c-met al paciente.
- 65 En ocasiones, puede ser beneficioso coadministrar también un cardioprotector (a fin de prevenir o reducir la disfunción de miocardio asociada con la terapéutica) o una o más citocinas al paciente. Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede ser sometido a la extracción quirúrgica de células cancerosas y/o radioterapia antes, simultáneamente, o después de la terapia con el antagonista de c-met. Las dosis adecuadas para

cualquiera de los agentes coadministrados anteriores son las actualmente usadas y pueden ser reducidas debido a la acción combinada (sinergia) del agente y el antagonista de c-met.

5 Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, el médico elegirá la dosis y el modo de administración de acuerdo con los criterios conocidos. La dosis apropiada del antagonista de c-met dependerá del tipo de enfermedad tratada, según se definió antes, la gravedad y el curso de la enfermedad, si se administra el antagonista de c-met con fines preventivos o terapéuticos, la terapéutica previa, los antecedentes clínicos del paciente y la respuesta al antagonista de c-met, y el criterio del médico a cargo. El antagonista de c-met es administrado en forma adecuada al paciente por una vez o en una serie de tratamientos. En una forma de realización, el antagonista de c-met se administra por infusión intravenosa o por inyecciones subcutáneas. Según el tipo y la gravedad de la enfermedad, la dosis candidata inicial para la administración al paciente puede ser de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal (p.ej., aproximadamente 0,1-15 mg/kg/dosis) de anticuerpo, ya sea, por ejemplo, en una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Un régimen de dosificación puede comprender la administración de una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo antagonista de c-met. No obstante, otras dosis pueden ser útiles. Una dosis diaria común puede variar de aproximadamente 1 mg/kg a 100 mg/kg o más, según los factores mencionados antes. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, según la condición, se mantiene el tratamiento hasta que ocurra una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. El progreso de esta terapéutica puede ser monitoreado fácilmente por métodos y ensayos convencionales y sobre la base de los criterios conocidos por el médico u otras personas expertas en la técnica.

20 Además de la administración de un polipéptido modulador (p.ej., polipéptido, anticuerpo, etc.) al paciente, la invención contempla la administración de un modulador por terapia génica. Dicha administración de un ácido nucleico que comprende/que codifica el antagonista de c-met está incluida en la expresión "administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de c-met". Véase, por ejemplo, WO96/07321 publicada el 14 de marzo de 1996 respecto del uso de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

25 Existen dos enfoques principales para obtener el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células del paciente; *in vivo* y *ex vivo*. Para la provisión *in vivo* se inyecta el ácido nucleico directamente al paciente, usualmente en el sitio donde se requiere el antagonista de c-met. Para el tratamiento *ex vivo*, se extraen las células del paciente, se introduce el ácido nucleico en estas células aisladas y se administran las células modificadas al paciente en forma directa o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan dentro del paciente (Véase, p.ej., las Patentes de los Estados Unidos N° 4.892.538 y 5.283.187). Hay varias técnicas disponibles para introducir ácido nucleicos en células viables. Las técnicas varían según si el ácido nucleico es transferido a células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del huésped pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico a células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextran, el método de precipitación de fosfato de calcio, etc. Un vector de uso común para la entrega *ex vivo* del gen es un vector retroviral.

30 35 40 45 50 55 40 En una forma de realización, las técnicas de transferencia de ácido nucleico *in vivo* incluyen la transfer transfección con vectores virales (tales como adenovirus, Herpes simplex I virus, o virus adenoasociados) y sistemas basados en lípidos (los lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). Para la revisión de los protocolos actualmente conocidos de marcación de genes y terapia génica véase Anderson et al., Science 256:808-813 (1992). Véase también WO 93/25673 y las referencias allí citadas.

Los anticuerpos antagonistas de c-met para el uso de acuerdo con la invención pueden estar de diferentes formas abarcadas por la definición de "anticuerpo" en la presente. En consecuencia, los anticuerpos incluyen los anticuerpos de longitud total o intactos, los fragmentos de anticuerpo, el anticuerpo de secuencia nativa o de variantes de aminoácidos, anticuerpos humanizados, quiméricos o de fusión, y sus fragmentos funcionales.

Se describe una composición que comprende un antagonista de c-met, y un portador. Una composición puede comprender un antagonista de c-met en combinación con otros agentes terapéuticos tales como agentes citotóxicos o inhibidores del crecimiento, incluso agentes quimioterapéuticos. También se describen formulaciones que comprenden un antagonista de c-met, y un portador. Opcionalmente, la formulación es una formulación terapéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

#### G. Artículos de fabricación y Kits

60 En la presente se describe un artículo de fabricación que contiene materiales de utilidad para el tratamiento de un trastorno que utiliza un antagonista de c-met. El artículo de fabricación comprende un contenedor y un rótulo o embalaje o un prospecto de embalaje sobre o asociado con el contenedor. Los contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los contenedores pueden estar formados por diversos materiales tales como vidrio o plástico. El contenedor guarda una composición que es efectiva para tratar la condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el contenedor ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un antagonista de c-met. El rótulo o el prospecto del embalaje indican que la composición se usa para tratar un

trastorno particular. El rótulo o prospecto del embalaje también comprenderá instrucciones para administrar la composición al paciente. Además, el artículo de fabricación también puede comprender un segundo contenedor que comprende un buffer farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución fisiológica con buffer fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales de interés desde los puntos de vista comercial y del usuario, incluso otros buffer, diluyentes, filtros, ahujas y jeringas.

5 También se proveen kits que son útiles para varios fines. Se pueden proveer kits que contienen antagonista de c-mets de la invención para la detección y la cuantificación de c-met hiperestabilizado in vitro, p.ej., en ELISA o inmunotransferencia Western. Al igual que con el artículo de fabricación, el kit comprende un contenedor y un rótulo 10 o prospecto de embalaje sobre o asociado con el contenedor. El contenedor guarda una composición que comprende al menos un antagonista de c-met de la invención. Se pueden incluir otros contenedores adicionales que contienen, p.ej., diluyentes y buffer, anticuerpos control. El rótulo o el prospecto del embalaje pueden proveer una descripción de la composición, así como las instrucciones para el uso pretendido in vitro o de detección.

15 15 H. Antagonistas de c-met que comprenden polipéptidos, ácidos nucleicos y anticuerpos-*Formas y aplicaciones específicas*

En una forma de realización, los ácidos nucleicos para el uso de acuerdo con la invención incluyen oligonucleótidos 20 antisentido/polinucleótidos que comprenden a una secuencia de ácido nucleico monocatenaria (ARN o ADN) capaz de fijarse a ácidos nucleicos que codifican c-met hiperestabilizado endógeno. Los oligonucleótidos antisentido, de acuerdo con la presente invención, comprende al menos un fragmento de la región codificadora de ADN de c-met hiperestabilizado. Dicho fragmento generalmente comprende al menos aproximadamente 14 nucleótidos, de preferencia de aproximadamente 14 a 30 nucleótidos. La capacidad para derivar un oligonucleótido antisentido, 25 sobre la base de una secuencia cADN que codifica determinada proteína se describen, por ejemplo, en Stein y Cohen (Cancer Res. 48:2659, 1988) y van der Krol et al. (BioTechniques 6:958, 1988).

La fijación de los oligonucleótidos antisentido a las secuencias de ácido nucleicos blanco da por resultado la 30 formación de dobletes que bloquean la transcripción o la traducción de la secuencia blanco por uno de varios medios, incluso una mayor degradación de los dobletes, la prematura terminación de la transcripción o la traducción, o por otros medios. Tales métodos están contemplados en la presente invención. En consecuencia, los oligonucleótidos antisentido se pueden usar para bloquear la expresión de una proteína c-met hiperestabilizada en 35 las células. Los oligonucleótidos antisentido también comprenden oligonucleótidos con esqueletos de azúcar-fosfodiéster modificados (u otros enlaces azúcar, tales como los descritos WO 91/06629) y donde tales enlaces azúcar son resistentes a las nucleasas endógenas. Tales oligonucleótidos con enlaces azúcar resistentes son estables in vivo (es decir, capaces de resistir la degradación enzimática) pero retienen la especificidad de secuencia para poder fijarse a las secuencias de nucleótido blanco.

Los sitios intragénicos de preferencia para la fijación antisentido incluyen la región que incorpora el codón de inicio de la traducción/de inicio (5'-AUG / 5'-ATG) o el codón de terminación/detención (5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA / 5'-TAA, 40 5'-TAG y 5'-TGA) del marco de lectura abierto (ORF) del gen. Estas regiones se refieren a una porción del mARN o gen que abarca desde aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') respecto del codón de inicio o de terminación de la traducción. Otros ejemplos de regiones para la fijación antisentido incluyen: intrones; exones; uniones intrón-exón; el marco de lectura abierto (ORF) o "región codificadora", que es la región entre el codón de inicio de la traducción y el codón de terminación de la traducción; el 45 casquete 5' de un mARN que comprende un residuo N7-metilado de guanosina unido al residuo más cercano a 5' del mARN mediante un enlace trifosfato 5'-5' e incluye la propia estructura del casquete 5', así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes al casquete; la región 5' no traducida (5'UTR), la porción de un mARN en la dirección 5' desde el codón de inicio de la traducción, y así incluye los nucleótidos entre el sitio del casquete 5' y el codón de inicio de la traducción de un mARN o los correspondientes nucleótidos en el gen; y la región 3' no traducida (3'UTR), la porción de un mARN en la dirección hacia 3' desde el codón de terminación de la traducción, y así incluye los 50 nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un mARN o los correspondientes nucleótidos en el gen.

Los ejemplos específicos de los compuestos antisentido de utilidad para inhibir la expresión de polipéptido c-met 55 hiperestabilizado incluye los oligonucleótidos que contienen esqueletos modificados o enlaces entre nucléosidos no modificados. Los oligonucleótidos que tienen esqueletos modificados incluyen los que retienen un átomo de fósforo en el esqueleto y los que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto. A los fines de la presente especificación, y tal como ocasionalmente se refiere en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto entre nucleótidos también pueden considerarse oligonucleósidos. Los ejemplos de esqueletos de 60 oligonucleótidos modificados incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquilfosfonatos que incluyen 3'-alquilenfosfonatos, 5'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionaalquilfosfonatos, tionaalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5', análogos de estos unidos 2'-5', y los que tienen polaridad invertida, donde uno o más enlaces internucleótido es un enlace 3'-3', 5'-5' o 2'-2'. Los ejemplos de oligonucleótidos que tienen polaridad invertida comprende un único enlace 3'-3' en el enlace internucleótido más cercano a 3', es decir un único 65

residuo de nucleósido invertido que puede ser abásico (falta la nucleobase o tiene un grupo hidroxilo en su lugar). También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácidos libres. Las Patentes de los Estados Unidos Representativas que enseñan la preparación de enlaces que contienen fósforo incluyen, sin limitaciones, las Patentes de los Estados Unidos N.º 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423;

5 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.194.599; 5.565.555; 5.527.899; 5.721.218; 5.672.697 y 5.625.050.

10 Los ejemplos de esqueletos de oligonucleótidos modificados que no incluyen un átomo de fósforo tienen esqueletos formados por cortas cadenas de enlaces internucleósidos alquilo o cicloalquilo, mezclas de heteroátomos y enlaces internucleósidos alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósidos de cadenas cortas heteroatómicas o heterocíclicas. Estas incluyen los que tienen enlaces morfolino (formados en parte por la porción azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilenformacetilo y tioformacetilo; esqueletos de riboacetilo; esqueletos que contienen alquenos; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos amida; y otros que poseen partes de componentes mixtos de N, O, S y CH<sub>2</sub>. Las Patentes de los Estados Unidos Representativas que enseñan la preparación de tales oligonucleótidos incluyen, sin limitaciones, las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 20 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; 5.792.608; 5.646.269 y 5.677.439.

25 En otros ejemplos de oligonucleótidos antisentido, tanto el azúcar como el enlace internucléido, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótido han sido reemplazadas por grupos nuevos. Se mantienen las unidades de base para la hibridación con un compuesto de ácido nucleico blanco apropiado. Uno de estos compuestos oligoméricos, un oligonucleótido-mimético en el que se han demostrado excelentes propiedades de hibridación se refiere como ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido es reemplazado por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases quedan retenidas y están unidas en forma directa o indirecta a átomos de nitrógeno aza de la porción amida del esqueleto. Las Patentes de los Estados Unidos Representativas que enseñan esta preparación incluyen, sin limitaciones, las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Ulteriores enseñanzas sobre los compuestos PNA se pueden hallar en Nielsen et al., *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

30 35 Los ejemplos de oligonucleótidos antisentido incorporan esqueletos de fosforotioato y/o esqueletos de heteroátomos, y en particular -CH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>- [denominado esqueleto metilen(metilimino) o MMI], -CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>- y -O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- [donde el esqueleto fosfodiéster nativo está representado como -O-P-O-CH<sub>2</sub>-] descritos en la antes referida patente de los Estados Unidos N.º 5.489.677, y los esqueletos amida de la antes referida patente de los Estados Unidos N.º 5.602.240. Otros ejemplos adicionales son oligonucleótidos antisentido que tienen estructuras de esqueletos de morfolino de la antes referida patente de los Estados Unidos N.º 5.489.677, y los esqueletos amida de la antes referida patente de los Estados Unidos N.º 5.034.506.

40 45 Los oligonucleótidos modificados también pueden contener una o más fracciones azúcar sustituidas. Los ejemplos de oligonucleótidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-alquilo, S-alquilo, o N-alquilo; O-alquenilo, S-alquenilo, o N-alquenilo; O-alquinilo, S-alquinilo o N-alquinilo; o O-alquilo-O-alquilo, donde el alquilo, alquenilo y alquinilo pueden ser C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub> alquilo o C<sub>2</sub> a C<sub>10</sub> alquenilo y alquinilo sustituidos o no sustituidos. De particular preferencia son O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>, y O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros ejemplos de oligonucleótidos antisentido comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub> alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alquenilo, alquinilo, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo reportador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes con propiedades similares. Una posible modificación incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, también denominado 2'-O-(2-metoxietil) o 2'-MOE) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504) es decir, un grupo alcoxialcoxi. Otra modificación de preferencia incluye 2'-dimetilaminoetoxietoxi, es decir, un grupo O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, también denominado 2'-DMAOE, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocidos en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietil o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-OCH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>).

50 55 60 Otra modificación incluye ácido nucleicos bloqueados (LNA) donde el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono 3' o 4' del anillo azúcar, por lo que forma una fracción azúcar bicíclica. El enlace puede ser un grupo metileno (-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> que forma un puente entre el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4' donde n es 1 o 2. Los LNA y su preparación se describen en WO 98/39352 y WO 99/14226.

65 66 Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH<sub>3</sub>), 2'-aminopropoxi (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> NH<sub>2</sub>), 2'-alilo (2'CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 2'-O-alilo (2'-O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación 2' puede estar en la posición arabino

(ascendente) o la posición ribo (descendente). Una modificación 2'-arabino es 2'-F. También se pueden hacer modificaciones similares en otras posiciones sobre los oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal o en los oligonucleótidos unidos 2'-5' y la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los oligonucleótidos también pueden tener azúcar-miméticos tales como fracciones ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las Patentes de los Estados Unidos Representativas que enseñan la preparación de estas estructuras de azúcar modificadas incluyen, sin limitaciones, las Patentes de los Estados Unidos N.º 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.792.747; y 5.700.920.

5 Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de la nucleobase (a menudo referidas en la técnica simplemente como "base"). Tal como se usa en la presente, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros alquildervados de adenina y guanina, 2-propil y otros alquildervados de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil(-C=C-CH<sub>3</sub> o -CH<sub>2</sub>-C=CH) uracilo y citosina y otros derivados alquinilo de bases de pirimidina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (seudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalcilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-aminoadenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Otras nucleobases modificadas incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazincitidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenoxazincitidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), grapas G tales como una fenoxazincitidina sustituida (p.ej. 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazolcitidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindolcitidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las nucleobases modificadas 10 también pueden incluir aquellas en las cuales la base purina o pirimidina está reemplazada por otros heterociclos, por ejemplo 7-deazaadenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Otras nucleobases incluyen las escritas en la patente de los Estados Unidos N.º 3.6 87.808, las descritas en The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, y las descritas por Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613. Algunas de estas nucleobases son 15 particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Estos incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidines y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluso 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las 5-metilcitosina sustituciones incrementan la estabilidad del doblete de ácidos nucleicos en 0,6-1,2 grados C (Sanghvi et al., Antisentido Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y son ejemplos de sustituciones de bases, p.ej., 20 cuando se combinan con modificaciones 2'-O-metoxietil azúcar. Las Patentes de los Estados Unidos Representativas que enseñan la preparación de estas nucleobases modificadas incluyen, sin limitaciones, las Patentes de los Estados Unidos N.º 3.687.808, 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121. 5.596.091; 5.614.617; 5.645.985; 5.830.653; 5.763.588; 6.005.096; 5.681.941 y 5.750.692.

25 20 Los oligonucleótidos antisentido comprende el enlace químico al oligonucleótido de una o más fracciones o conjugados que incentivan la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Los compuestos de la invención pueden incluir grupos conjugados unidos por covalencia a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la invención incluyen grupos intercaladores, moléculas reportadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que incentivan 25 las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros, y grupos que incentivan las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados característicos incluyen colesteroles, lípidos, lípidos catiónicos, fosfolípidos, fosfolípidos catiónicos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, 30 cumarinas y colorantes. Los grupos que incentivan las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de la presente invención, incluyen grupos que mejoran la captación de oligómeros, mejoran la resistencia de los oligómeros a la degradación, y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con ARN. Los grupos que incentivan las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de la presente invención, incluyen grupos que mejoran la captación, la 35 distribución, el metabolismo o la excreción de los oligómeros. Las fracciones conjugadas incluyen sin limitaciones fracciones lipídicas tales como una fracción de colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, p.ej., hexil-S-tritiotiolo (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolecterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, p.ej., redisuos dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, p.ej., di-hexadecil-rac- 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100

glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietil-amonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido adamantanacético (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), una fracción palmitilo (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), o una fracción octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la invención 95 también se pueden conjugar a las sustancias farmacológicas activas, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofeno, fenbufeno, cetoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-

triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometacina, un barbiturato, una cefalosporina, una sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Los conjugados oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en Patentes de los Estados Unidos N.º 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

10 No es necesario que todas las posiciones de determinado compuesto estén modificadas uniformemente, y de hecho más de una de las modificaciones antes mencionadas pueden ser incorporadas en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente invención también incluye compuestos antisentido que son compuestos químicos. Los compuestos antisentido "químicos" o "quimeras", en el contexto de la 15 presente invención, son compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente diferenciadas, cada una conformada por al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleótido. En general, estos oligonucleótidos contienen al menos una 20 región donde el oligonucleótido está modificado, a fin de conferir al oligonucleótido mayor resistencia a la degradación por nucleasa, aumentar la captación celular, y/o aumentar la afinidad de unión por el ácido nucleico blanco. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para las enzimas capaces de escindir 25 híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNsa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena ARN de un doblete ARN:ADN. En consecuencia, la activación de ARNsa Ha da por resultado la escisión del blanco de ARN, por lo que mejora en gran medida la eficiencia de la inhibición de la expresión génica por el oligonucleótido. En consecuencia, a menudo se pueden obtener resultados comparables con oligonucleótidos más 30 coros cuando se usan oligonucleótidos químicos, en comparación con fosforotioato-desoxi-oligonucleótidos que se hibridan a la misma región blanco. Los compuestos antisentido químicos de la invención se pueden formar como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o oligonucleotidomiméticos tal como se describió con anterioridad. Los ejemplos de oligonucleótidos antisentido 35 químicos incorporan al menos un azúcar 2' modificado (de preferencia 2'-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>) en 3' terminal a fin de conferir resistencia a nucleasa y una región con al menos 4 azúcares 2'-H contiguos para conferir actividad de ARNsa H. Tales compuestos también se han referido en la técnica como híbridos o gapmers. Los ejemplos de gapmers tienen una región de azúcares 2' modificados (de preferencia 2'-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>) en el 3'-terminal y en el 5' terminal separados por al menos una región que tiene al menos 4 azúcares 2'-H contiguos y pueden incorporar enlaces de esqueleto de fosforotioato. Las Patentes de los Estados Unidos Representativas que enseñan la preparación de estas estructuras híbridas incluyen, sin limitaciones, las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922.

40 Los compuestos antisentido usados de conformidad con la presente invención pueden ser preparados en forma conveniente y rutinaria mediante la bien conocida técnica de síntesis de fase sólida. El equipo para dicha síntesis es vendido por varios vendedores, incluso, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Alternativamente, se puede emplear cualquier otro medio para dicha síntesis conocido en la técnica. Es bien conocido usar técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. Los compuestos de la invención también se pueden mezclar, encapsular, conjugar o de otros modo asociar con otras moléculas, 45 estructuras de moléculas o mezclas de compuestos, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas o de otro tipo, para facilitar la captación, la distribución y/o la absorción. Las Patentes de los Estados Unidos Representativas que enseñan la preparación de las formulaciones que facilitan tales captación, distribución y/o absorción incluyen, sin limitaciones, las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.

55 Otros ejemplos de oligonucleótidos antisentido incluyen los oligonucleótidos que están unidos covalentemente a fracciones orgánicas, tales como las descritas en WO 90/10048, y otras fracciones que incrementan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácido nucleico blanco, tal como poli-(L-lisina). Además, se pueden adosar agentes intercaladores, tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos a los oligonucleótidos antisentido o con sentido para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido antisentido o con sentido de la secuencia de nucleótido blanco.

60 Se pueden introducir oligonucleótidos antisentido a una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico blanco por cualquier método de transferencia de genes, incluso, por ejemplo, transfección, electroporación de ADN mediada por CaPO<sub>4</sub>, o mediante el uso de vectores de transferencia de genes tales como el virus Epstein-Barr. En un ejemplo de procedimiento, se inserta un oligonucleótido antisentido o con sentido en un vector retroviral adecuado. Una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico blanco se pone en contacto con el vector retroviral recombinante, ya sea in vivo o ex vivo. Los vectores retrovirales adecuados incluyen, sin limitaciones, los derivados del retrovirus

murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV), o los vectores de copia doble designados DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase WO 90/13641).

5 Los oligonucleótidos antisentido también se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de nucleótido blanco por formación de un conjugado con una molécula fijadora de ligando, tal como se describe en WO 91/04753. Las moléculas fijadoras de ligando adecuadas incluyen, sin limitaciones, receptores de superficie celular, factores de crecimiento, otras citocinas u otros ligandos que se fijan a los receptores de superficie celular. En general, la conjugación de la molécula fijadora de ligando de preferencia no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula fijadora de ligando para fijar su correspondiente molécula o receptor, o bloquear la entrada del oligonucleótido con sentido o antisentido o su versión conjugada al interior de la célula.

10 Alternativamente, un oligonucleótido antisentido puede ser introducido dentro de una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico blanco por formación de un complejo oligonucleótido-lípido, tal como se describe en WO 90/10448. El complejo oligonucleótido antisentido-lípido de preferencia es disociado dentro de la célula por una 15 lipasa endógena.

20 Las moléculas de ARN o ADN antisentido generalmente tienen al menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, o 1000 nucleótidos de longitud, donde en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia del nucleótido de referencia más o menos el 10 % de dicha longitud de referencia.

25 Los ARN y ADN antisentido se pueden usar como agentes terapéuticos para el bloqueo de la expresión de ciertos genes in vivo. Ya se ha demostrado que se pueden importar los oligonucleótidos antisentido cortos al interior de la célula, donde actúan como inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares causadas por la 30 captación restringida por la membrana de la célula (Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986]). Los oligonucleótidos pueden ser modificados para mejorar la captación, p.ej. al sustituir sus grupos fosfodiéster de carga negativa por grupos no cargados.

35 Hay varias técnicas disponibles para introducir ácido nucleicos en células viables. Las técnicas varían según si el ácido nucleico es transferido dentro de células cultivadas in vitro, o in vivo en las células del huésped pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico al interior de células de mamífero in vitro incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextran, el método de precipitación de fosfato de calcio, etc. Las técnicas de transferencia de genes in vivo de preferencia actualmente incluyen la transfección con vectores virales (generalmente retrovirales) y la transfección mediada por proteinliposoma de la 40 cubierta viral (Dzau et al., Trends in Biotechnology 11, 205-210 [1993]). En algunas situaciones es deseable proporcionar a la fuente de ácido nucleico un agente dirigido a las células blanco, tal como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de la superficie de la célula o la célula blanco, un ligando para un receptor sobre la célula blanco, etc. Cuando se emplean liposomas, se pueden usar proteínas que se fijan a una proteína de membrana de la superficie celular, asociadas por endocitosis para dirigir y/o facilitar la captación, p.ej. proteínas del 45 cápside o sus fragmentos tróficos para un tipo celular particular, anticuerpos para proteínas que son sometidas a internalización en ciclado, proteínas dirigidas a la localización intracelular y mejoran la vida media intracelular. Se describe la técnica de endocitosis mediada por receptor, por ejemplo, en Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); y Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990). Para la revisión de los protocolos de marcado génico y terapia génica véase Anderson et al., Science 256, 808-813 (1992).

50 50 Se pueden usar los polipéptidos antagonista de c-met y las moléculas de ácidos nucleicos en el diagnóstico de la tipificación tisular, donde los polipéptidos de c-met hiperestabilizado se expresan en forma diferencial en un tejido, comparado con otro, de preferencia en un tejido enfermo, comparado con un tejido normal del mismo tipo de tejido.

55 55 Los métodos para analizar compuestos e identificar los que modulan el c-met hiperestabilizado también se describen en la presente. Los ensayos de búsqueda de los candidatos de antagonista-fármaco se diseñan para identificar compuestos que se fijan o forman complejos con el polipéptido c-met hiperestabilizado, o de otro modo interfieren con la interacción de los polipéptidos de c-met hiperestabilizado con otras proteínas celulares, incluso p.ej., inhibiendo la expresión de polipéptido c-met hiperestabilizado de las células.

60 60 Los ensayos pueden realizarse de diversos formatos, incluso ensayos de fijación proteína-proteína, ensayos de análisis bioquímico, inmunoensayos y ensayos celulares, que están bien caracterizados en la técnica.

65 Todos los ensayos para antagonistas son comunes en cuanto a poner en contacto el fármaco candidato con un polipéptido de c-met hiperestabilizado en condiciones y durante el tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen.

En ensayos de fijación, la interacción es la fijación y el complejo formado se puede aislar o detectar en la mezcla de reacción. En una forma de realización particular, el polipéptido de c-met hiperestabilizado o el fármaco candidato es inmovilizado en una fase sólida, p.ej., en una placa de microtitulación, mediante unión covalente o no covalente. La unión no covalente generalmente se logra al recubrir la superficie sólida con una solución del polipéptido de c-met hiperestabilizado y secar. Alternativamente, se puede usar un anticuerpo inmovilizado, p.ej., un anticuerpo monoclonal, específico para inmovilizar el polipéptido c-met hiperestabilizado, a fin de anclarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza por agregado del componente no inmovilizado, que se puede rotular mediante un rótulo detectable, al componente inmovilizado, p.ej., la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando se complete la reacción, se extraen los componentes que no reaccionaron, p.ej., por lavado, y se detectan los complejos anclados sobre la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado porta un rótulo detectable, la detección del rótulo inmovilizado sobre la superficie indica que se formó el complejo. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no porta un rótulo detectable, se puede detectar la formación de complejo, mediante el uso de un anticuerpo rotulado que se fije específicamente al complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato interactúa pero no se fija al polipéptido de c-met hiperestabilizado, se puede ensayar su interacción con c-met hiperestabilizado por métodos bien conocidos para detectar las proteína-proteína. Tales ensayos incluyen enfoques tradicionales, tales como, p.ej., formación de enlaces cruzados, coimmunoprecipitación y copurificación por columnas de gradientes o cromatográficas. Además, se pueden monitorear las interacciones entre proteínas mediante el uso de un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores (Fields y Song, *Nature* (London), 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)) descrito por Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Muchos activadores de transcripción, tales como GAL4 de levaduras, consisten de dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como dominio fijador de ADN, y el otro que funciona como dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levaduras descrito en las publicaciones anteriores (referidas en general como "sistema de dos híbridos") aprovecha esta propiedad, y emplea dos proteínas híbridas, una en la que la proteína blanco se fusiona al dominio fijador de ADN de GAL4, y otro en el cual las proteínas activadoras candidatas se fusionan al dominio de activación. La expresión de un gen reportero GAL1-lacZ bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 por la interacción entre proteínas. Las colonias que contienen polipéptidos interactuantes se detectan mediante un sustrato cromogénico para  $\beta$ -galactosidasa. Un kit completo (MATCHMAKER<sup>TM</sup>) para identificar las interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas mediante el uso de la técnica de dos híbridos está disponible en el comercio en Clontech. Este sistema también se puede extender al mapeo de los dominios de las proteínas que intervienen en las interacciones de las proteínas específicas, así como señalar los residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

Los compuestos que interfieren con la interacción de c-met hiperestabilizado y otros componentes intra o extracelulares pueden estudiarse como sigue: por lo general se prepara una mezcla de reacción que contiene c-met hiperestabilizado y el componente intra o extracelular bajo condiciones y durante un tiempo que permita la interacción y la fijación de los dos productos. Para estudiar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la fijación, la reacción se corre en ausencia y en presencia del compuesto de prueba. Además, se puede agregar un placebo a una tercera mezcla de reacción, a fin de servir como control positivo. La fijación (formación de complejo) entre el compuesto de prueba y el componente intra o extracelular presente en la mezcla es monitoreada tal como se describe más arriba. La formación de un complejo en la reacción control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de prueba indica que el compuesto de prueba interfiere con la interacción del compuesto de prueba y su contrapartida de reacción.

Para el análisis de antagonistas, se puede agregar el compuesto a analizar para una actividad particular a una célula que expresa c-met hiperestabilizado, y la capacidad del compuesto de inhibir la actividad de interés indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido c-met hiperestabilizado. El polipéptido c-met hiperestabilizado puede ser rotulado, por ejemplo por radiactividad, de manera tal que se puede usar la cantidad de moléculas de polipéptido c-met hiperestabilizado presentes en la célula para determinar la efectividad del posible antagonista.

Un posible antagonista de c-met hiperestabilizado es un constructo de ARN o ADN antisentido preparado mediante tecnología antisentido, en donde, p.ej., una molécula de ARN o ADN antisentido actúa bloqueando directamente la traducción de mARN al hibridarse al mARN blanco e impedir la traducción de proteína. Se puede usar tecnología antisentido para controlar la expresión génica mediante o de formación hélice triple o ADN o ARN antisentido, ambos métodos basados en la fijación de un polinucleótido a ADN o ARN. Por ejemplo, se puede usar la fracción codificadora 5' de la secuencia de polinucleótido que codifica la proteína de c-met hiperestabilizado madura para diseñar un oligonucleótido ARN antisentido de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido ADN para ser complementario a la región del gen que interviene en la transcripción (hélice triple, véase Lee et al., *Nucl. Acids Res.*, 6:3073 (1979); Cooney et al., *Science*, 241: 456 (1988); Dervan et al., *Science*, 251:1360 (1991)), por lo que se impide la transcripción y la producción del polipéptido de c-met hiperestabilizado. El oligonucleótido ARN antisentido se hibrida al mARN in vivo y bloquea la traducción de la molécula de mARN en el polipéptido c-met hiperestabilizado (antisentido -Okano, *Neurochem.*, 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos antes descritos también pueden ser entregados a las células de manera tal que el ARN o ADN antisentido pueda ser expresado in

vivo para inhibir la producción del polipéptido c-met hiperestabilizado. Cuando se usa ADN antisentido, se prefieren los oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la traducción, p.ej., entre aproximadamente -10 y +10 posiciones desde la secuencia del nucleótido del gen blanco.

5 Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de ARN. Las ribozimas actúan por hibridación específica de secuencia al ARN blanco complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Los sitios específicos de escisión por ribozimas dentro de un posible ARN se pueden identificar mediante técnicas conocidas. Para más detalles véase, p.ej., Rossi, Current Biology, 4:469-471 (1994), y la publicación PCT N.ºWO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

10 Las moléculas de ácidos nucleicos en formación de hélice triple usados para inhibir la transcripción deben ser monocatenarios y compuestos por deoxinucleótidos. La composición de base de estos oligonucleótidos está diseñada de manera tal que promueve la formación de la hélice triple según las normas de apareamiento de bases de Hoogsteen, que generalmente requiere extensiones destacadas de purinas o pirimidinas en una cadena de un doblete. Para más detalles véase, p.ej., la publicación PCT N.ºWO 97/33551, supra.

15 Estas pequeñas moléculas pueden ser identificadas por uno cualquiera o más de los ensayos de búsqueda analizados con anterioridad y/o por cualquier otra técnica bien conocida por los expertos en la técnica.

20 En una forma de realización, se prefiere internalizar los anticuerpos. Los anticuerpos pueden poseer ciertas características, o ser modificados para poseer tales características que mejoran la transferencia de anticuerpos a las células. Las técnicas para logar esto son conocidas en la técnica. En aún otra forma de realización, Se puede expresar un anticuerpo en una célula blanco al introducir un ácido nucleico capaz de expresar el anticuerpo dentro de la célula blanco. Véase, p.ej., las Patentes de los Estados Unidos N.º 6.703.019; 6.329.173; y Pub. PCT N.º 25 2003/077945. También se pueden usar lipofecciones o liposomas para transferir el anticuerpo al interior de la célula. Cuando se usan fragmentos de anticuerpos, generalmente es ventajoso el fragmento inhibitorio más pequeño que se fija específicamente al dominio fijador de la proteína blanco. Por ejemplo, sobre la base de las secuencias de la 30 región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que retienen la capacidad para retener la secuencia de la proteína blanco. Dichos péptidos pueden ser sintetizados por medios químicos y/o producidos por tecnología de ADN recombinante. Véase, p.ej., Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

35 El ingreso de los polipéptidos moduladores al interior de las células blanco puede ser mejorado por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, ciertas secuencias, tales como las derivadas de HIV Tat o la proteína de homeodominio de Antennapedia pueden dirigir la captación eficiente de proteínas heterólogas a través de las membranas celulares. Véase, p.ej., Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), 96:4325-4329.

40 Los anticuerpos de antagonista de c-met para el uso de acuerdo con la invención pueden ser cualquier anticuerpo que sea capaz de interferir con la actividad de c-met. Algunos ejemplos específicos incluyen un anticuerpo anti-c-met que comprende:

45 (a) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco secuencias de regiones hipervariables (HVR) seleccionadas del grupo que consiste de:

(i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A17, donde A1-A17 es KSSQSLLYTSSQKNILA (SEQ ID NO:1) }

50 (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B 1-B7, donde B 1-B7 es WASTRES (SEQ ID NO:2)

(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es QQYYAYPWT (SEQ ID NO:3)

55 (iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, donde D1-D10 es GYTFTSYWLH (SEQ ID NO:4)

(v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, donde E1-E18 es GMIDPSNSDTRFNPNFKD (SEQ ID NO:5) y

55 (vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F11, donde F1-F1 es XYGSYVSPLDY (SEQ ID NO:6) y X no es R; y

60 (b) al menos un variante HVR, donde la secuencia del variante HVR comprende la modificación de al menos un residuo de la secuencia mostrada en SEQ ID NOs:1, 2, 3, 4, 5 o 6. En una forma de realización, HVR-L1 de un anticuerpo comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1. En una forma de realización, HVR-L2 de un anticuerpo comprende la secuencia de SEQ ID NO:2. En una forma de realización, HVR-L3 de un anticuerpo comprende la secuencia de SEQ ID NO:3. En una forma de realización, HVRH1 de un anticuerpo comprende la secuencia de SEQ ID NO:4. En una forma de realización, HVR-H2 de un anticuerpo comprende la secuencia de SEQ ID NO:5. En una forma de realización, HVR-H3 de un anticuerpo comprende la secuencia de SEQ ID NO:6. En una forma de realización, HVR-H3 comprende TYGSYVSPLDY (SEQ ID NO: 7). En una forma de realización, HVR-H3 comprende SYGSYVSPLDY (SEQ ID NO: 8). En una forma de realización, un anticuerpo que comprende estas secuencias (en combinación tal como se describe en la presente) es humanizado o humano.

- En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR, donde cada HVR comprende, consiste o consiste esencialmente de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8, y donde SEQ ID NO:1 corresponde a un HVR-L1, SEQ ID NO:2 corresponde a un HVRL2, SEQ ID NO:3 corresponde a un HVR-L3, SEQ ID NO:4 corresponde a un HVR-H1, SEQ ID NO:5 corresponde a un HVR-H2, y SEQ ID NOs:6, 7 o 8 corresponden a un HVR-H3. En una forma de realización, un anticuerpo comprende HVRL1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, donde cada uno, en orden, comprende SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5 y 7. En una forma de realización, un anticuerpo comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, donde cada uno, en orden, comprende SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, y 8.
- Los variantes HVR en un anticuerpo pueden tener modificaciones de uno o más residuos dentro del HVR en una forma de realización, un variante HVR-L2 comprende 1-5 (1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: B1 (M o L), B2 (P, T, G o S), B3 (N, G, R o T), B4 (I, N o F), B5 (P, I, L o G), B6 (A, D, T o V) y B7 (R, I, M o G). En una forma de realización, un variante HVR-H1 comprende 1-5 (1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: D3 (N, P, L, S, A, I), D5 (I, S o Y), D6 (G, D, T, K, R), D7 (F, H, R, S, T o V) y D9 (M o V). En una forma de realización, un variante HVR-H2 comprende 1-4 (1, 2, 3 o 4) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: E7 (Y), E9 (I), E10 (I), E14 (T o Q), E15 (D, K, S, T o V), E16 (L), E17 (E, H, N o D) y E18 (Y, E o H). En una forma de realización, un variante HVRH3 comprende 1-5 (1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: F1 (T, S), F3 (R, S, H, T, A, K), F4 (G), F6 (R, F, M, T, E, K, A, L, W), F7 (L, I, T, R, K, V), F8 (S, A), F10 (Y, N) y F11 (Q, S, H, F). Las letras entre paréntesis después de cada posición indican una sustitución ilustrativa (es decir, reemplazo) de aminoácido; como sería evidente para un experto en la técnica, la adecuación de otros aminoácidos como aminoácidos de sustitución en el contexto que se describe en la presente puede ser evaluada de rutina mediante el uso de las técnicas en la técnica aplicable y/o que se describen en la presente. En una forma de realización, un HVR-L1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1. En una forma de realización, F1 en un variante HVR-H3 es T. En una forma de realización, F1 en un variante HVR-H3 es S. En una forma de realización, F3 en un variante HVR-H3 es R. En una forma de realización, F3 en un variante HVR H3 es S. En una forma de realización, F7 en un variante HVR-H3 es T. En una forma de realización, un anticuerpo comprende un variante HVRH3 donde F1 es T o S, F3 es R o S, y F7 es T.
- En una forma de realización, un anticuerpo comprende un variante HVR-H3 donde F1 es T, F3 es R y F7 es T. En una forma de realización, un anticuerpo comprende un variante HVR-H3 donde F1 es S. En una forma de realización, un anticuerpo comprende un variante HVR-H3 donde F1 es T, y F3 es R. En una forma de realización, un anticuerpo comprende un variante HVR-H3 donde F1 es S, F3 es R y F7 es T. En una forma de realización, un anticuerpo comprende un variante HVR-H3 donde F1 es T, F3 es S, F7 es T, y F8 es S. En una forma de realización, un anticuerpo comprende un variante HVR-H3 donde F1 es T, F3 es S, F7 es T, y F8 es A. En algunas formas de realización, dicho anticuerpo variante HVR-H3 también comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 y HVR-H2 donde cada uno comprende, en orden, la secuencia mostrada en SEQ ID NOs:1, 2, 3, 4 y 5. En algunas formas de realización, estos anticuerpos también comprenden una secuencia de consenso de marco de cadena pesada de subgrupo III humano. En una forma de realización de estos anticuerpos, la secuencia de consenso de marco comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas formas de realización de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una forma de realización de estos anticuerpos, estos anticuerpos también comprenden una secuencia de consenso en marco de cadena liviana kI humana.
- En una forma de realización, un anticuerpo comprende un variante HVR-L2 donde B6 es V. En algunas formas de realización, dicho anticuerpo variante HVR-L2 también comprende HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada uno comprende, en orden, la secuencia mostrada en SEQ ID NOs:1, 3, 4, 5 y 6. En algunas formas de realización, dicho anticuerpo variante HVR-L2 también comprende HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada uno comprende, en orden, la secuencia mostrada en SEQ ID NOs:1, 3, 4, 5 y 7. En algunas formas de realización, dicho anticuerpo variante HVR-L2 también comprende HVRL1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada uno comprende, en orden, la secuencia mostrada en SEQ ID NOs:1, 3, 4, 5 y 8. En algunas formas de realización, estos anticuerpos también comprenden una secuencia de consenso en marco de cadena pesada de subgrupo III humana. En una forma de realización de estos anticuerpos, la secuencia de consenso en marco comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas formas de realización de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una forma de realización de estos anticuerpos, estos anticuerpos también comprenden una secuencia de consenso en marco de cadena liviana kI.
- En una forma de realización, un anticuerpo comprende un variante HVR-H2 donde E14 es T, E15 es K y E17 es E. En una forma de realización, un anticuerpo comprende un variante HVR-H2 donde E17 es E. En algunas formas de realización, dicho anticuerpo de variante HVR-H3 también comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, y HVR-H3 donde cada uno comprende, en orden, la secuencia mostrada en SEQ ID NOs:1, 2, 3, 4 y 6. En algunas formas de realización, dicho anticuerpo de variante HVR-H2 también comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, y HVR-H3, donde cada uno comprende, en orden, la secuencia mostrada en SEQ ID NOs:1, 2, 3, 4, y 7. En algunas formas de realización, dicho anticuerpo de variante HVR-H2 también comprende HVR-L1, HVRL2, HVR-L3, HVR-H1, y HVR-H3, donde cada uno comprende, en orden, la secuencia mostrada en SEQ ID NOs:1, 2, 3, 4, y 8. En algunas formas de realización, estos anticuerpos también comprenden una secuencia de consenso en marco de

cadena pesada de subgrupo III humana. En una forma de realización de estos anticuerpos, la secuencia de consenso en marco comprende sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas formas de realización de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. en una forma de realización de estos anticuerpos, estos anticuerpos también comprenden una secuencia de consenso en marco de cadena liviana k1.

5 La formulación en la presente también puede contener más de un compuesto activo, según necesidad para la indicación particular tratada, de preferencia los con actividades complementarias que no se afecten entre sí. Alternativamente, además, la composición puede comprender un agente que mejora su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citocina, agente quimioterapéutico o agente inhibitorio del crecimiento. Dichas 10 moléculas están presentes en forma adecuada en combinación y en cantidades que son efectivas para los fines pretendidos.

15 Siguen ejemplos de los métodos y las composiciones de la invención. Se entiende que se pueden poner en práctica varias otras formas de realización, dada la descripción general provista más arriba. Los ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos.

#### EJEMPLOS

##### Materiales y métodos

20 Cultivo celular

25 Las líneas celulares se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC), NCI Division of Cancer Treatment and Diagnosis tumor repository, o Japanese Health Sciences Foundation. Todas las líneas celulares, con la excepción de 293 y Rat 1A fueron mantenidas en RPMI 1640 suplementado 10 % de FBS (Sigma), penicilina/estreptomicina (GIBCO), y L-glutamina 2 mM. Las células 293 y Rat 1A fueron mantenidas en DMEM elevado en glucosa y suplementado tal como se describió.

30 Plásmidos y líneas celulares estables

35 Previamente se describió Met WT-V5/His de longitud total (Kong-Beltran et al, 2004). Met WT-V5/His sirvió de plantilla molde para producir una mutación puntual Y1003F usando los cebadores descritos con anterioridad (Peschard et al, 2001) por mutagénesis dirigida a sitio de QuikChange (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se eliminó exón 14 mediante el uso de grupos de cebadores que crearon nuevos sitios de restricción

40 Nhel flanqueadores de exón 14 de Met (aa 963-1011) por mutagénesis dirigida a sitio de QuikChange y posterior digestión con Nhel seguido de nueva unión del plásmido. Las mutaciones se verificaron por determinación de secuencia de ADN. Para generar líneas celulares estables Met en células Rat 1A, se digirieron 10 mg de cada uno de pRK5TKneo, Met WT-V5/His, Met Y1003F -V5/His, o Met ΔEx14-V5/His ADN con KpnI y se purificó (Qiagen). Las células Rat 1A fueron transfectadas con 4 mg de cada ADN en una placa de 6 cavidades mediante Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Al día siguiente se trataron las células con trisina y se sembraron en platos de 10 cm. A las 24 horas se agregó 500 mg/ml de G418 (Sigma). La selección continuó durante aproximadamente dos semanas antes de seleccionar los clones Met-positivos por FACS usando anticuerpo 3D6 (véase patente de los Estados Unidos N.º 6.099.841) y tinción PE. Se colocó una célula por cavidad. Los clones expandidos se lisaron y analizaron para Met por inmunoblotting con anticuerpo V5 (Invitrogen).

45 Immunoprecipitación y análisis de inmunotransferencia Western

50 Para los análisis de expresión de proteína en especímenes de tejido congelado, se homogeneizó (-100 mg) en 200 ml de buffer de lisis celular (Cell Signaling) que contiene cóctel inhibidor de proteasa (Sigma), cócteles de inhibidor de fosfatasa I y II (Sigma), fluoruro de sodio 50 mM, y ortovanadato de sodio 2 mM mediante un homogenizador Politron® (Kinematica). Las muestras se lisaron por agitación suave durante 1 hora a 4°C, antes de la limpieza preliminar con una mezcla de Protein A Sepharose Fast Flow (Amersham) y Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham). Se determinaron las concentraciones de proteína con reactive de Bradford (BioRad). Después se resolvieron las proteínas (20 mg) SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, y se realizó inmunoblotting con anticuerpos Met (DL-21, Upstate) o β-actina (I-19, Santa Cruz). Las proteínas se visualizaron por centelografía mejorada (ECL Plus, Amersham). Mediante estudios de coimmunoprecipitación con Met y Cb1 transfectados, se transfirieron 3 mg de cada constructo de Met y 3 mg de Cb1-flag a 293 células con FuGENE6 (Roche). Al día siguiente, se estimularon las células con 100 ng/ml de rHuHGF durante 30 minutos antes de la cosecha con buffer de lisis 1 % de NP40 [Tris 50 mM (pH 7,45), NaCl 150 mM, y 1 % de Nonidet 40] que contenía un comprimido de cóctel de inhibidor de proteasa completo (Roche) y cóctel II de inhibidor de fosfatasa. Se centrifugaron los restos celulares y se inmunoprecipitó 1 mg de lisado con 1,5 ml de anticuerpos V5 (Invitrogen) o 2 mg de Cb1 (C-15, Santa Cruz) a 4°C con rotación durante la noche, seguido de incubación con perlas de Proteína G o A durante 2 h. Se agregó 2X buffer de muestra (Invitrogen) que contiene DTT 20 mM (Sigma) y se hirvieron las muestras durante 5 minutos. Las muestras se cargaron en geles 4-12 % de Tris-glicina (Invitrogen) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 mm (Invitrogen). La membrana se bloqueó con leche descremada al 5 % durante 1 h, seguido de inmunoblotting con anticuerpos V5, flag polyclonal (Sigma) o P-Tyr (4G10, Upstate). Para los

estudios de fijación con Cb1 endógeno, 293 células fueron transfectadas con 6 mg de cada constructo de ADN por placa de 10 cm mediante FuGENE6. Al día siguiente se estimularon las células con 100 ng/ml de rhuHGF durante 30 minutos antes de la cosecha. Las muestras se inmunoprecipitaron con 2 mg de anticuerpos Cb1 o 1,5 mg de anticuerpos V5, seguido de inmunoblotting con anticuerpos V5 o Cb1. El blot inmunoprecipitado V5 se disgregó con 5 Restore western blot stripping buffer (Pierce) y se volvió a sondar con P-Met Y1003 (Biosource), P-Met Y1234/Y12345 (Cell Signaling), P-Met Y1349 (Cell Signaling), o P-Met 1365 (Biosource). Para los estudios de degradación, se transfectaron 293 células con 0,25 mg de pRK5TKneo, Met WT-V5/His, Met Y1003F-V5/His, o mutante Met  $\Delta$ Ex14-V5/His con FuGENE6 en una placa de 6 cavidades. Al día siguiente se trataron las células con 10 mg/ml de cicloheximida (Sigma) durante los tiempos indicados. Los lisados se analizaron por SDS-PAGE y se 10 realizó inmunoblotting de la membrana con anticuerpos V5 o actina.

#### Ensayo de ubiquitinación

15 Se transfectaron 293 células con 3 mg de constructos de Met, 2 mg de Cb1-flag, 1 mg de HA-ubiquitina, y vectores vacíos pRK5TKneo o pFlag5a de ser necesario para tener un total de 6 mg de ADN por muestra mediante FuGENE6. Al día siguiente se trataron las células con MG-132 25 mM (Calbiochem) durante 4 horas antes de la cosecha. Las células se lisaron en buffer de lisis NP-40 al 1 % que contiene inhibidores, MG-132 25 mM, y N- 20 etilmaleimida 10 mM. Los lisados (1 mg) se inmunoprecipitaron con 1,5 mg de anticuerpo V5 y se sometieron a inmunoblotting con anticuerpo de ubiquitina (P4D1, Santa Cruz) y luego se disgregaron y se volvieron a sondar con anticuerpo V5.

#### Señales celulares y estudios de inhibición

25 A fin de examinar las señales prolongadas en clones estables H226, H596, H358, o Rat 1A-Met, las células se enjuagaron con PBS y luego se privaron de nutrientes en suero en medios RPMI o DMEM que contienen BSA al 0,5 %, glutamina 2 mM, y penicilina/estreptomicina durante una hora. Se agregó rhuHGF o el anticuerpo monoclonal agonista anti-Met, 3D6 (Genentech) al medio sin suero durante 10 minutos. La monocapa de células se enjuagó con PBS y se incubó en medio sin suero hasta la extracción en los momentos indicados. Luego se enjuagaron las células una vez con PBS, se lisaron con buffer de muestra 1X SDS que contiene 1X DTT (Invitrogen), se sonicaron brevemente, y se hirvieron durante 5 minutos. Para analizar la inhibición de receptor Met, a las células privadas de nutrientes se les agregó anticuerpo anti-Met 5D5 al medio sin suero en las concentraciones indicadas durante 30 minutos. Luego se estimularon las células durante 15 minutos (para el análisis de la activación de Met) o 30 minutos (para los análisis de Akt y MAPK) con 100 ng/ml de rhuHGF y se lisaron con buffer de muestra 1X SDS que contiene DTT. Las muestras hervidas se analizaron por SDS-PAGE y se sometieron a inmunoblotting con P-Met 30 (Y1230/Y1234/Y1235, BioSource), P-Met (Y1234/Y1235), Met (DL-21), P-MAPK (E10, Cell Signaling), PMAPK (Cell Signaling), P-Akt (587F11, Cell Signaling), o Akt (Cell Signaling). Los anticuerpos secundarios usados eran conjugado antconejo- AlexaFluor680 (Molecular Probes) o conjugado antirratón-IRDye800 (Rockland Immunochemicals). Las proteínas transferidas a las membranas de nitrocelulosa se detectaron por escaneo infrarrojo con Odyssey (LiCor) de acuerdo con las instrucciones de inmunotransferencia Western recomendadas por el fabricante, seguido de cuantificación. Para el ensayo de viabilidad celular, se plaquearon las células por triplicado con  $\sim 1 \times 10^4$  células por cavidad en placas de 96 cavidades en RPMI que contiene 0,5 % de FBS (medio de ensayo) durante la noche, antes de la estimulación con medio de ensayo que contiene 50 ng/ml de rhuHGF. Se agregó medio de ensayo sin rhuHGF a las cavidades no estimuladas. Después de 72 h, se midió la viabilidad celular mediante el ensayo Celltiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega). Se determinaron los índices de estimulación por división de las unidades promedio de viabilidad celular de los cultivos estimulados con HGF, por las unidades promedio de viabilidad celular de los cultivos no estimulados. Se determinaron los índices promedio de estimulación para un mínimo de 3 experimentos diferentes. Los ensayos de inhibición del crecimiento se condujeron de forma similar, con OA-5D5 o una Ig control agregada en el momento de la estimulación con HGF.

#### 50 Modelo de xenoinjerto in vivo

55 Ratones hembra atípicos desnudos (Charles River, Hollister) fueron inoculados por vía subcutánea pools de líneas celulares estables Rat1A que expresan Met WT, Met Y1003F, Met  $\Delta$ Ex14, o vector control (5 millones de células/ratón, n=5). Se administró 10 mg/kg de anticuerpo agonista anti-Met 3D6 que solo reconoce Met humano para la estimulación de receptor Met, por vía intraperitoneal, una vez por semana. Se midieron los tumores dos veces por semana mediante un calibre digital y se calcularon los volúmenes tumorales con la siguiente ecuación: volumen de tumor ( $\text{mm}^3$ ) =  $(\text{p/6})(\text{A})(\text{B})(\text{B})$ . A= ancho mayor; B= ancho menor.

#### 60 RESULTADOS Y ANÁLISIS

65 Determinamos las secuencias de todos los exones codificadores de Met de un panel de especímenes de tumores de pulmón y colon que representaban tumores primarios, líneas celulares tumorales y modelos de xenoinjertos de tumores primarios. En nuestro trabajo de determinación de secuencias, identificamos mutaciones somáticas heterocigotas en especímenes de tumores de pulmón primarios en las regiones intrónicas que flanquean el exón 14 (Fig. 1). Estas mutaciones eran específicas de tumor y no se identificaron en tejido pulmonar no neoplásico proveniente de los mismos individuos (datos no mostrados). En H596, una línea celular de cáncer de pulmón de

células no pequeñas (NSCLC), identificamos una mutación puntual homocigota en el sitio donante del corte y empalme 3p. La presencia de mutaciones dentro del consenso de sitio de corte y empalme dinucleotídico y el tracto secuencia arriba de polipirimidina del exón 14, combinado con la observación de que el exón 13 y el exón 15 permanecían en fase, sugiere que un posible transcripto de Met carente de exón 14 aún podría producir una proteína Met funcional. Para analizarlo, realizamos primero la amplificación por RT-PCR de ARN de Met proveniente de los tumores mutantes y la línea celular. Las tres mutaciones intrónicas dieron por resultado un transcripto de menor longitud, comparado con el tipo silvestre, consistente con la delección del exón 14 (datos no mostrados). También confirmamos la ausencia del exón 14 por determinación de las secuencias de los productos de RT-PCR, y nuestros resultados mostraron una delección en marco que elimina los aminoácidos L964 a D1010 de Met. Es interesante destacar, que la forma mutante del receptor es la forma expresada más predominante, a pesar de que las muestras de tumor eran heterocigotas para la delección del exón 14 (datos no mostrados), lo cual indica una expresión preferencial del transcripto variante. Esto fue confirmado más tarde por inmunotransferencia Western que demostró la expresión predominante de una proteína Met truncada. Los especímenes que contienen estas mutaciones intrónicas eran de tipo silvestre para K-ras, B-raf, EGFR, y HER2 en las secuencias de exones relevantes estudiadas (datos no mostrados). Tomados en conjunto, estos resultados indican la naturaleza dominante de estas mutaciones intrónicas de Met. Es interesante destacar que una previamente se ha informado una variante de corte y empalme de Met carente de exón 14 en tejido normal de ratón, si bien la consecuencia funcional respecto de la tumorigénesis no era clara (20, 21). Sin embargo, no detectamos expresión de este variante de corte y empalme en ninguno de los especímenes de pulmón humano normal examinados (datos no mostrados). La falta de este variante de corte y empalme en tejido humano normal ha sido adicionalmente sustanciada, como se analizó previamente (21). Se ha informado un cADN que comprende un variante de corte y empalme carente de exón 14 en un espécimen de NSCLC humano primario; no obstante, no se evaluó el papel de la mutagénesis somática en la mediación de los defectos de corte y empalme, ni era la consecuencia funcional, si la hubiera, de algún c-met mutante que se podría haber expresado (22). Dado que los ácidos nucleicos que comprenden variantes de corte y empalme no son infrecuentes en células cancerosas, se desconoce la relevancia funcional del variante de corte y empalme informado.

La delección de 47 aminoácidos del exón 14 dentro del dominio de yuxtapamembrana de Met (L964-D1010) extrae el sitio de fosforilación Y1003 necesario para la fijación de Cb1 y la regulación negativa del receptor activado. Estudios previos demuestran que una mutación Y1003F impide la fijación de Cb1 y mantiene la activación de Met (6). Primero confirmamos la pérdida de la fijación de Cb1 del Met mutante asociado a tumor mediante estudios de coimmunoprecipitación. Se transfirieron 293 células con Met de tipo Silvestre (Met WT), Met mutante Y1003F (Met Y1003F), y Met con eliminación de exón 14 (Met ΔEx14) por transfección de estos constructos Met con Cb1-flag en 293 células. Observamos que la fijación de Cb1 a Met ΔEx14 está reducida en comparación con WT Met (Fig. 2A) y confirmamos la pérdida de la fijación de Cb1 a Met Y1003F (6). La fosforilación de tirosina de Cb1 por Met WT y Met mutantes era equivalente, lo cual indica que las mutaciones de Met no alteraron la fosforilación general de Cb1. Nuestros datos también indicaron que Met WT co-inmunoprecipita con Cb1 endógeno, pero no con Met ΔEx14 (Fig. 2B), lo cual concuerda con la coexpresión observada de Met y Cb1. Además, examinamos los sitios de fosforilación de tirosina necesarios para la activación de receptor Met. Nuestros datos indican que la fosforilación de Y1234/Y1235, Y1349, y Y1365 se mantiene en Met WT y Met ΔEx14 (Fig. 2B). Como era de esperar, se observó pérdida de fosforilación de Y1003 en Met ΔEx14, en contraste Met WT (Fig. 2B). Dado que se ha informado que la actividad de E3-ligasa de Cb1 facilita la degradación mediada por ubiquitin del receptor (6, 8), se condujeron ensayos de ubiquitinación en células transfundidas con Met WT, Met Y1003F y Met ΔEx14. Tanto Met ΔEx14 como Met Y1003F mostraron ubiquitinación atenuada, comparado con Met WT, en presencia de Cb1 (Fig. 2C). Confirmamos que la fosforilación de Y1234/Y1235 se mantuvo en todos los constructos de Met y se perdió fosfo-Y1003 en los mutantes, como antes (datos no mostrados). Es interesante destacar que se detectó menos Met WT procesado con co-expresión de Cb1, comparado con los mutantes o la expresión de Met WT solo (Fig. 2C). Estas observaciones sugieren que el Met WT que fija Cb1 es ubiquitinado y degradado preferentemente (6, 24) en contraste con Met ΔEx14. A fin de determinar si la ubiquitinación reducida de Met ΔEx14 conduce a una regulación negativa del receptor, se transfirieron células con constructos de Met y se trataron con cicloheximida para bloquear nueva síntesis proteica. Met ΔEx14 mostró retardo en la regulación negativa del receptor con el paso del tiempo, comparado con Met WT (Fig. 2D). El mutante Met Y1003F mostró resultados similares (datos no mostrados). Es significativo que los tumores primarios que contenían el variante de corte y empalme del exón 14 exhibieron concentraciones elevadas de proteína Met, tanto respecto del tejido pulmonar adyacente normal correspondiente del paciente y los adenocarcinomas de Met de tipo salvaje (datos no mostrados), a pesar de expresar concentraciones equivalentes de Met en el nivel de transcripto. Además, el análisis inmunohistoquímico de la expresión de Met en estos tumores del paciente con delección del exón 14-deleted revela una intensa expresión membranosa en todas las células neoplásicas; en contraste, se observa esporádica expresión de Met en los tumores con Met WT y en los tejidos adyacentes normales (datos no mostrados).

A fin de determinar si la reducción de la regulación hacia debajo de Met ΔEx14 afectó las señales celulares secuencia abajo tras la estimulación con HGF, se examinaron los niveles de fosforilación de Met, Akt, y MAPK en líneas celulares tumorales NSCLC que contienen la delección del exón 14 (H596) o Met WT (H226 y H358). Las células H596 mostraron que tanto los niveles de fosfo-Met como los de fosfo-MAPK se mantenían hasta 3 horas después de la estimulación con HGF, mientras que las líneas celulares H226 y H358, que expresan el receptor Met WT, exhibieron una pérdida constante de la fosforilación con el paso del tiempo (Fig. 2E). Es interesante destacar

- que los niveles de fosfo-Akt no se mantuvieron con el tiempo, a pesar de la activación inicial en respuesta a HGF. También se examinó la fosforilación de Stat3 y Stat5, pero no exhibió activación elevada (datos no mostrados). Dado que estas líneas celulares fueron derivadas de diferentes antecedentes genéticos, generamos líneas celulares estables en células Rat1A con vector vacío, Met WT, y Met ΔEx14 para comparar. Rat1A Met ΔEx14 mostró 5 prolongada fosforilación de MAPK, pero no activación con Akt, comparado con Met WT luego de la estimulación con el agonista de Met 3D6 que activa el receptor recombinante humano solo (25) (Fig. 2F, 5), lo cual corrobora los datos obtenidos de las líneas celulares tumorales NSCLC.
- 10 Se examinaron las consecuencias de las señales sostenidas de Met y MAPK en la proliferación mediada por HGF de células H596 que contienen el Met con delección de exón 14 en el contexto de un panel de 28 líneas celulares NSCLC adicionales (Fig. 3A). Las células H596 exhibieron siempre el máximo potencia proliferativo tras la estimulación por HGF en este panel de líneas celulares NSCLC. Además, a fin de evaluar el crecimiento in vivo de la delección en Met, se inocularon los ratones con las líneas celulares estables de Rat 1A Met ΔEx14 y se compararon Rat 1A Met WT en la capacidad para formar tumores. Se observó incremento de la proliferación celular en células 15 Met ΔEx14 y Met Y1003F Rat1A, comparado con Met WT (datos no mostrados). Tras la estimulación con 3D6, las células Rat 1A Met ΔEx14 eran altamente tumorigénicas y desarrollaron mayores tumores, comparados con los de Rat 1A Met WT (Fig. 3B). Estos resultados fueron coherentes con el mayor papel oncogénico de Met con delección del exón 14.
- 20 A fin de determinar si los antagonistas de Met podían inhibir las células tumorales que contienen la delección de Met, se trataron células H596 con un conocido antiinhibidor de c-met (también referido como anti-Met OA-5D5 (26)). Anti-Met OA-5D5 es un anticuerpo que comprende 3 polipéptidos de inmunoglobulina -con cadenas livianas y cadenas pesadas intactas que comprenden secuencias de dominio variable (mostrado en la Fig. 9), y una cadena pesada truncada en N-terminal que comprende una fracción Fc que se dimeriza con la fracción Fc de la cadena pesada de 25 longitud total. La construcción y la generación de anti-Met OA-5D5 también se describe en Soli. Publ. de Pat. N.º PCT/US2004/042619 (presentada el 17 de diciembre de 2004). La fosforilación de Met y MAPK disminuyó con el agregado de anti-Met OA-5D5 en forma dependiente de la dosis (Fig. 4A, 6). Además, el tratamiento de las células H596 con OA-5D5 dio como resultado la inhibición dependiente de la dosis de la proliferación celular en forma dependiente de ligando (Fig. 4B). Estos resultados avalan un enfoque terapéutico dirigido a cánceres que expresan 30 c-met hiperestabilizado (tal como un c-met mutante que exhibe la delección de la yuxtamembrana) con un antagonista Met.
- 35 A pesar de la naturaleza intrínseca del corte y empalme aberrante en las células tumorales, es algo inesperado que un variante de corte y empalme asociado a tumor realmente codifique una proteína de receptor mutante, cuya degradación intracelular sea más lenta y que exhiba aumento de la actividad oncogénica. Nuestros datos sugieren con fuerza que un evento de corte y empalme, por ejemplo inducido por mutagénesis somática, es utilizado por los tumores para activar un producto génico oncogénico. En el estudio actual, la identificación de múltiples tipos de 40 mutaciones intrónicas que afectan en forma diferencial el ensamblaje de un espliceosoma y excluyen selectivamente el exón 14, destaca la relevancia de dicho evento mutagénico Met. Es interesante destacar que las eliminaciones e inserciones en el dominio de yuxtamembrana parecen jugar un papel importante en la activación de ciertas tirosinacinasas de receptor al alterar la conformación y la activación del dominio de cinasa del receptor (Hubbard, S Nature Rev Mol Cell Bio, 5:464, 2004). Se ha identificado la delección de la yuxtamembrana de KIT (Hirota et al Science 279:577, 1998) y PDGFRa (Heinrich, MC. et al Science 299:708, 2003) en tumores del estroma gastrointestinal; repeticiones en tandem internas dentro de la yuxtamembrana activan FLT3 en la leucemia mieloide 45 aguda (Nakao, M et al, Leukemia 10:1.91911, 1996). Sin embargo, nuestra identificación de una delección de yuxtamembrana en la presente caracteriza un mecanismo de activación de Met totalmente diferente, que retarda la regulación negativa del receptor, lo cual da por resultado una proteína mutante c-met con estabilidad significativamente aumentada en células cancerosas. Estos datos sugieren que las mutaciones que impulsan la regulación negativa del receptor podrían conducir a la activación oncogénica y el desarrollo tumoral
- 50 Listado parcial de referencias
1. L. Trusolino, P. M. Comoglio, Nat Rev Cancer 2, 289 (Abr., 2002).
  2. C. Birchmeier, W. Birchmeier, E. Gherardi, G. F. Vande Woude, Nat Rev Mol Cell Biol 4, 915 (Dic, 2003).
  3. C. Ponzetto et al., Cell 77, 261 (Abr. 22, 1994).
  4. K. M. Weidner et al., Nature 384, 173 (Nov. 14, 1996).
  5. G. Pelicci et al., Oncogene 10, 1631 (Abr. 20, 1995).
  6. P. Peschard et al., Mol Cell 8, 995 (Nov., 2001).
  7. P. Peschard, N. Ishiyama, T. Lin, S. Lipkowitz, M. Park, J Biol Chem 279, 29565 (Jul. 9, 2004).
  8. A. Petrelli et al., Nature 416, 187 (Mar. 14, 2002).
  9. K. Shtiegman, Y. Yarden, Semin Cancer Biol 13, 29 (Feb., 2003).
  10. M. D. Marmor, Y. Yarden, Oncogene 23, 2057 (Mar. 15, 2004).
  11. P. Peschard, M. Park, Cancer Cell 3, 519 (Jun., 2003).
  12. J. M. Siegfried et al., Ann Thorac Surg 66, 1915 (Dic., 1998).
  13. P. C. Ma et al., Anticancer Res 23, 49 (Ene.-Feb., 2003).
  14. B. E. Elliott, W. L. Hung, A. H. Boag, A. B. Tuck, Can J Physiol Pharmacol 80, 91 (Feb., 2002).

15. C. Seidel, M. Borset, H. Hjorth-Hansen, A. Sundan, A. Waage, *Med Oncol* 15, 145 (Sep., 1998).
16. G. Maulik et al., *Cytokine Factor del crecimiento Rev* 13, 41 (Feb., 2002).
17. R. Wang, L. D. Ferrell, S. Faouzi, J. J. Maher, J. M. Bishop, *J Cell Biol* 153, 1023 (May. 28, 2001).
18. L. Schmidt et al., *Nat Genet* 16, 68 (May., 1997).
- 5 19. M. Jeffers et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11445 (Oct. 14, 1997).
20. C. C. Lee, K. M. Yamada, *J Biol Chem* 269, 19457 (Ju.I 29, 1994).
21. C. M. Baek, S. H. Jeon, J. J. Jang, B. S. Lee, J. H. Lee, *Exp Mol Med* 36, 283 (Ago. 31, 2004).
22. P. C. Ma et al., *Cancer Res* 65, 1479 (Feb. 15, 2005).
23. P. C. Ma et al., *Cancer Res* 63, 6272 (Oct. 1, 2003).
- 10 24. M. Jeffers, G. A. Tailor, K. M. Weidner, S. Omura, G. F. Vande Woude, *Mol Cell Biol* 17, 799 (Feb., 1997).
25. K. Ohashi et al., *Nat Med* 6, 327 (Mar., 2000).
26. Schwall, R. et al. *Proc Am Assoc Cancer Res* 44, 1424 (2004).

## REIVINDICACIONES

1. Un antagonista que inhibe la actividad de señalización de c-met de un polipéptido c-met hiperestabilizado humano, donde el polipéptido c-met hiperestabilizado comprende una delección en marco del exón 14, la delección que elimina el sitio de fosforilación de Y1003, tal que la degradación del polipéptido está disminuida en comparación con c-met de tipo silvestre, y donde el polipéptido c-met hiperestabilizado tiene actividad de señalización de c-met, para el uso en un método para tratar un tumor que comprende c-met hiperestabilizado en un sujeto, donde dicho método comprende administrar dicho antagonista a un sujeto, por lo que se trata el tumor, donde el antagonista es
- 5 10 (i) un anticuerpo que se fija a un polipéptido c-met hiperestabilizado humano; o  
(ii) un ARN inhibidor o un oligonucleótido antisentido que inhiben la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido c-met hiperestabilizado humano.
- 15 15 2. El antagonista para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el tumor es un tumor de pulmón.
3. El antagonista para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde el tumor es un tumor de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).
- 20 4. El antagonista para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la inhibición de la actividad de señalización de c-met del antagonista comprende aumentar la degradación celular de la proteína c-met hiperestabilizada.
5. El antagonista para el uso de acuerdo con la reivindicación 1(i), donde el antagonista está unido a una toxina.
- 25 6. El antagonista para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el antagonista no inhibe sustancialmente la actividad de polipéptido c-met humano de tipo silvestre.
7. El antagonista para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el antagonista es un anticuerpo que no se fija específicamente al polipéptido c-met humano de tipo silvestre.
- 30 8. El antagonista para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el antagonista es un anticuerpo que se fija a un epitopo formado por corte y empalme en marco del exón 13 y del exón 15 de c-met humano.
9. El antagonista para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el antagonista es un ARN inhibidor o un oligonucleótido antisentido que preferentemente inhibe la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un variante de corte y empalme de c-met donde el exón 13 está cortado y empalmado con el exón 15.
- 35 10. El antagonista para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el antagonista es un anticuerpo que es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo químérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo humano, anticuerpo multiespecífico o anticuerpo monocatenario.
11. El antagonista para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el método comprende administrar el antagonista en conjunción con un agente que induce la degradación de la proteína del receptor.
- 40 12. Uso de un antagonista tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 10 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un tumor que comprende c-met hiperestabilizado en un sujeto.
13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde el tratamiento es tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 u 11.

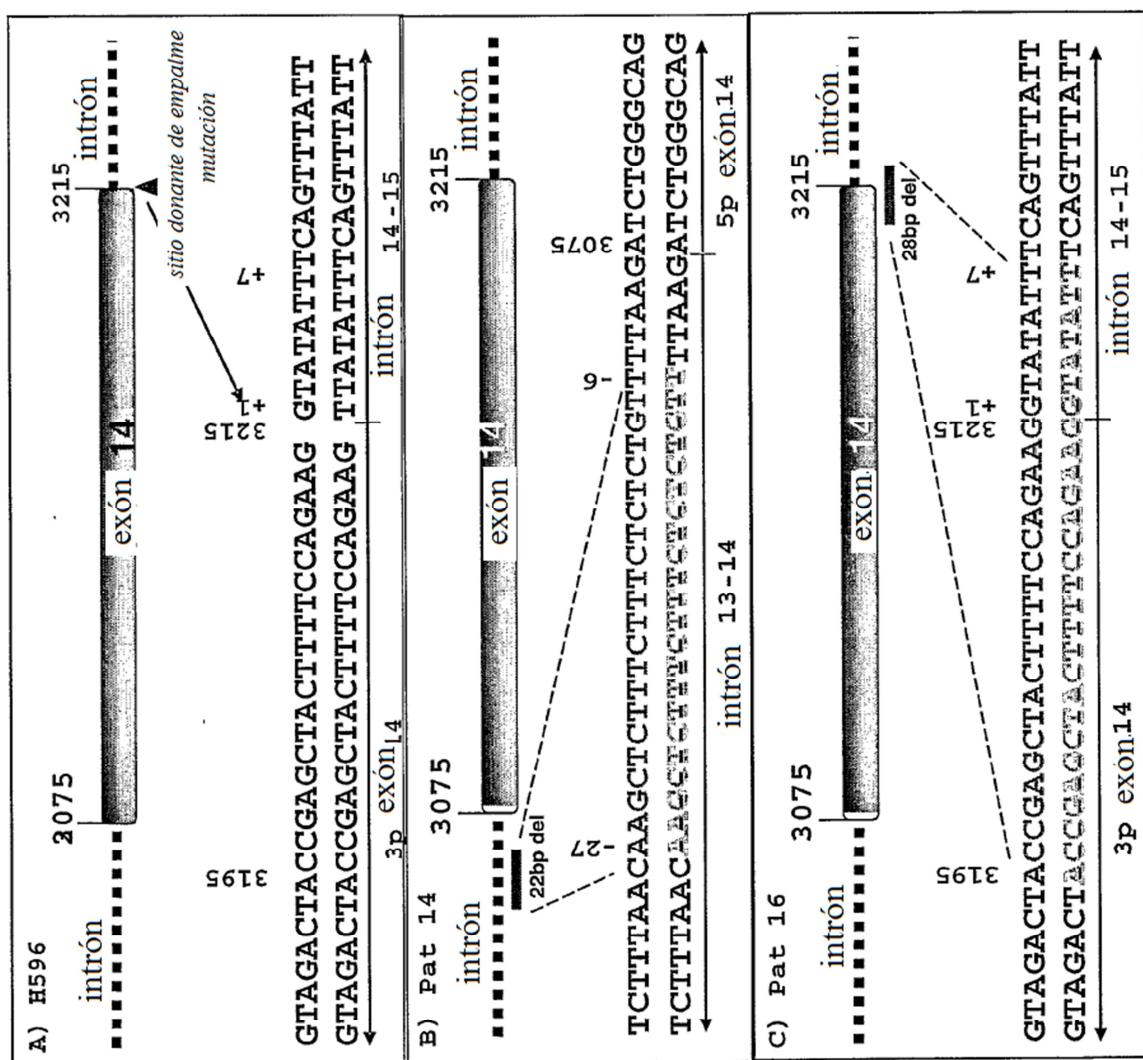


FIG. 1

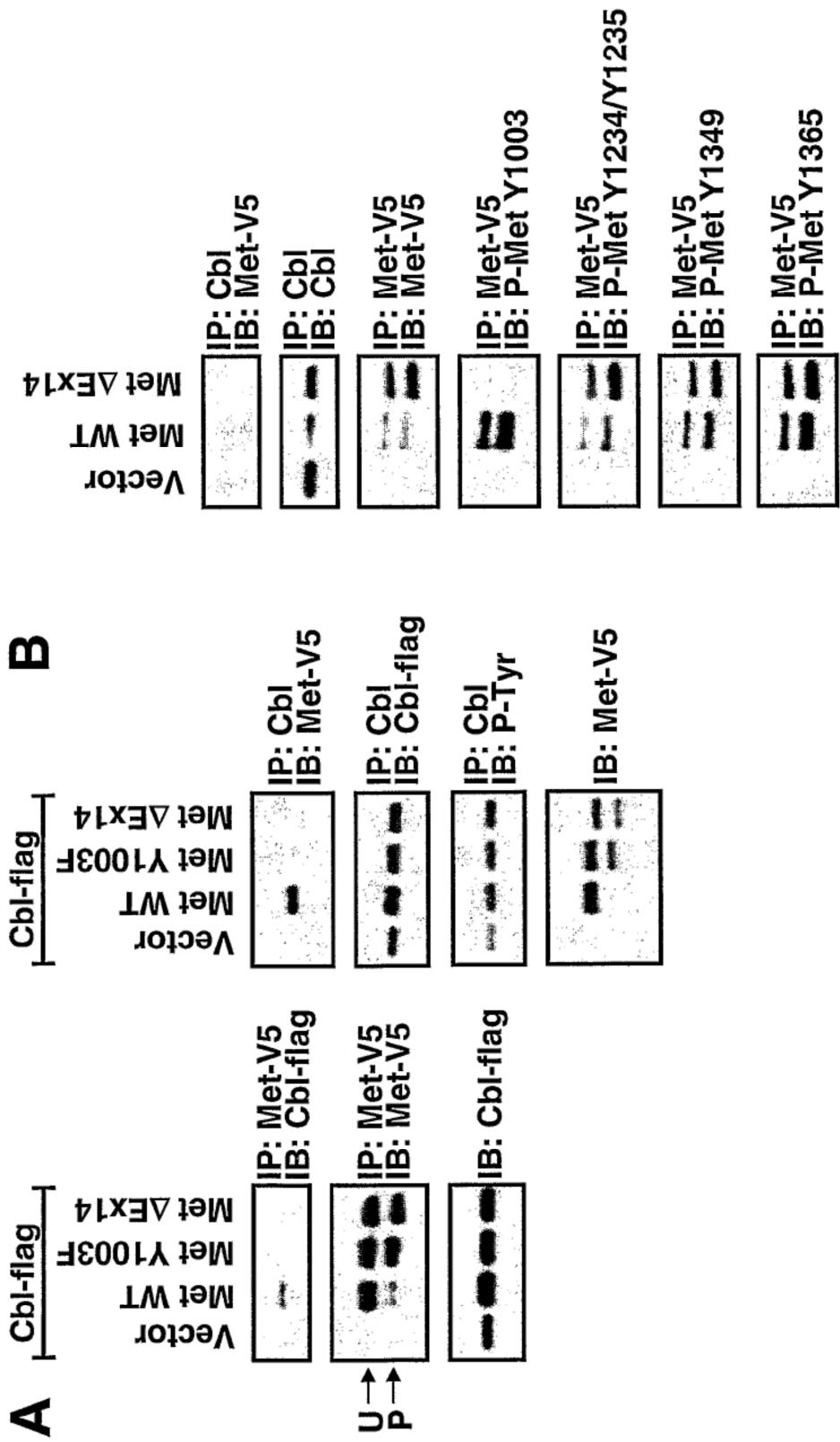


FIG. 2A

FIG. 2B

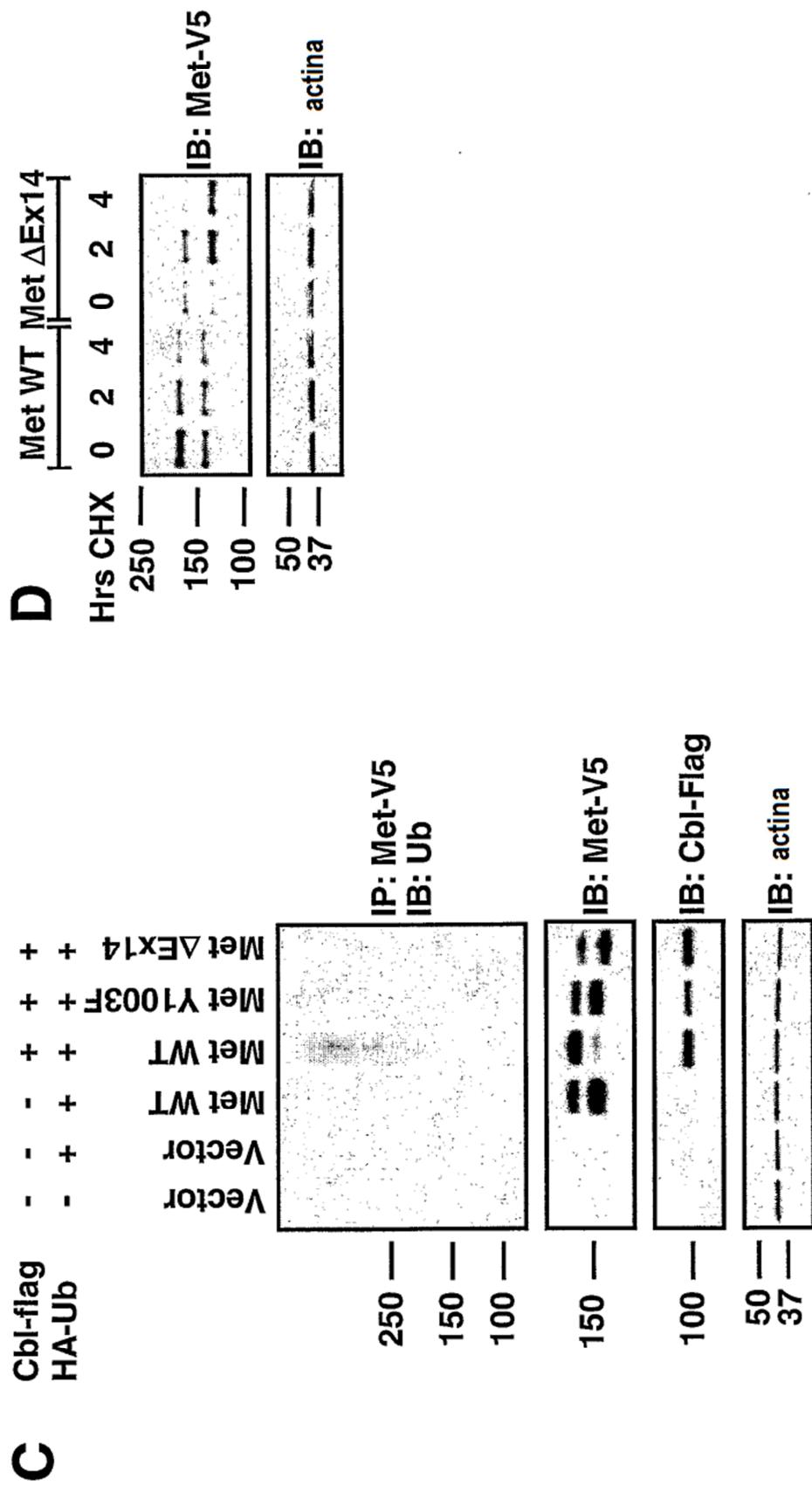


FIG.\_2C

FIG.\_2D

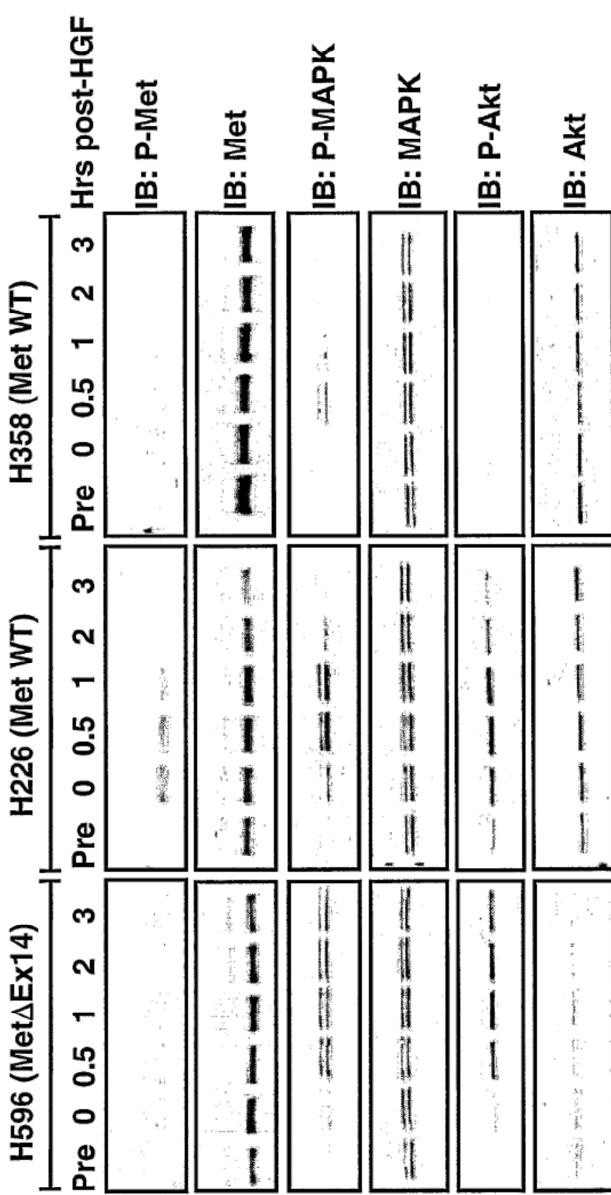


FIG. 2E

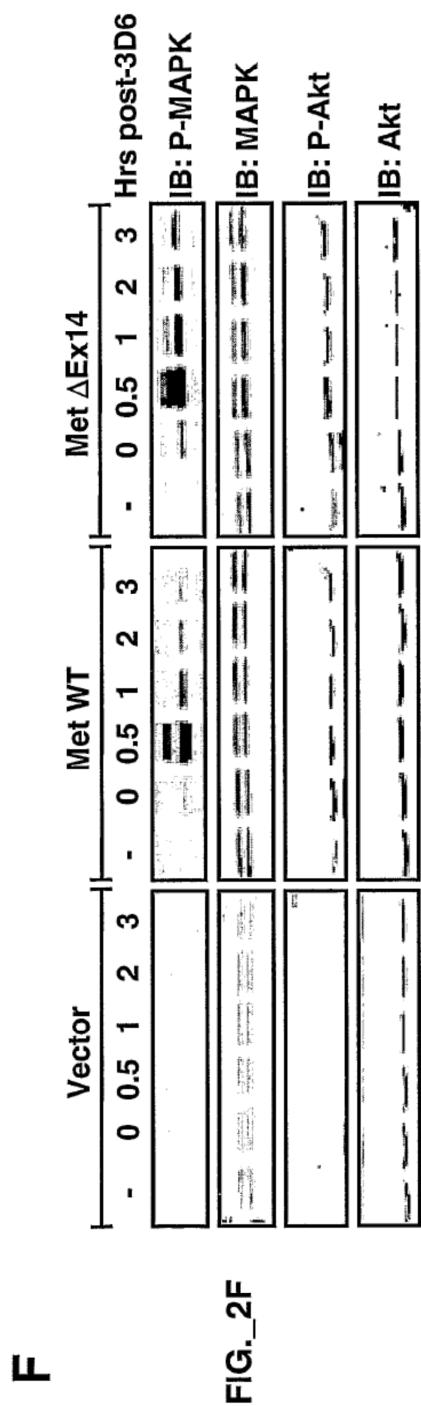


FIG. 2F

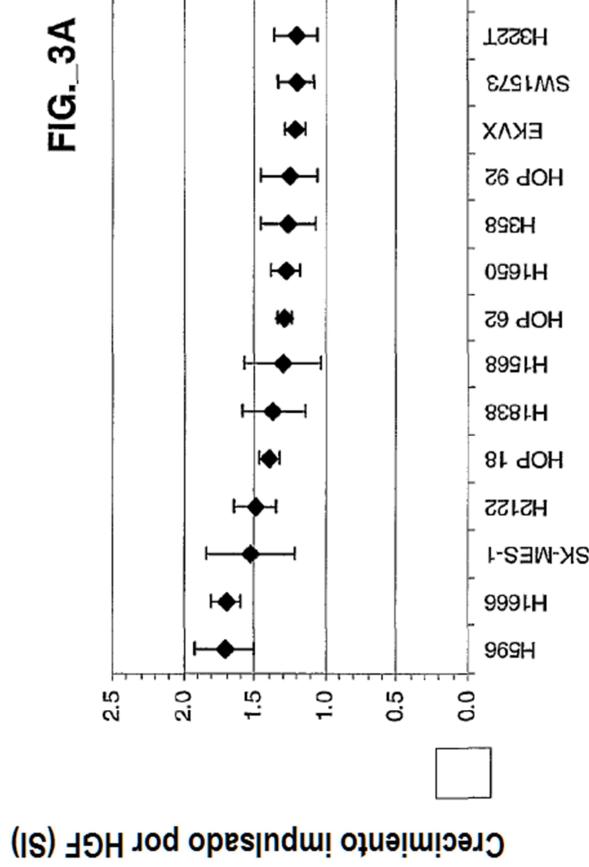
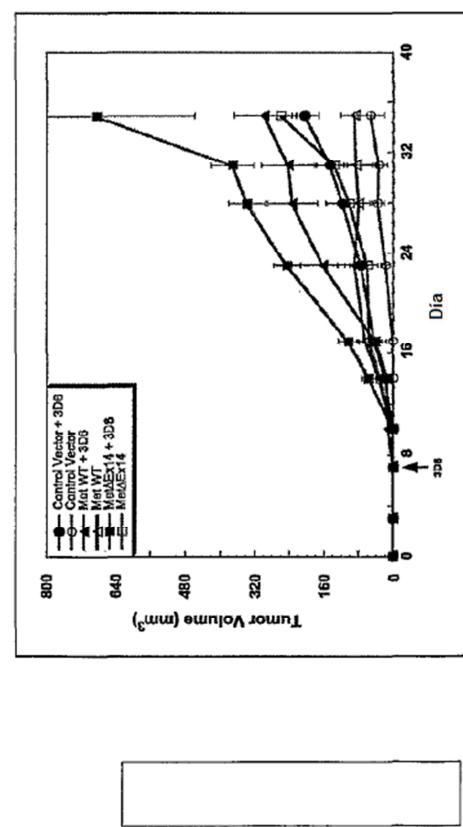
**A****B**

FIG. 4

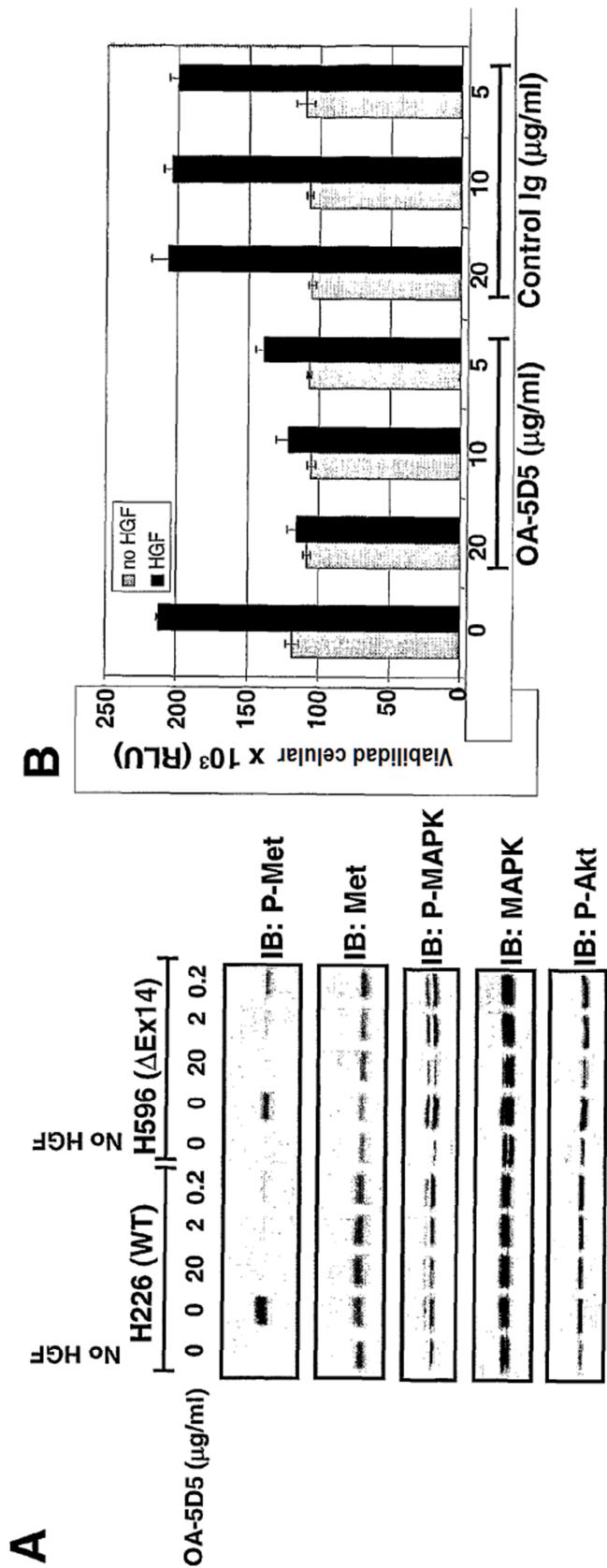


FIG. 5

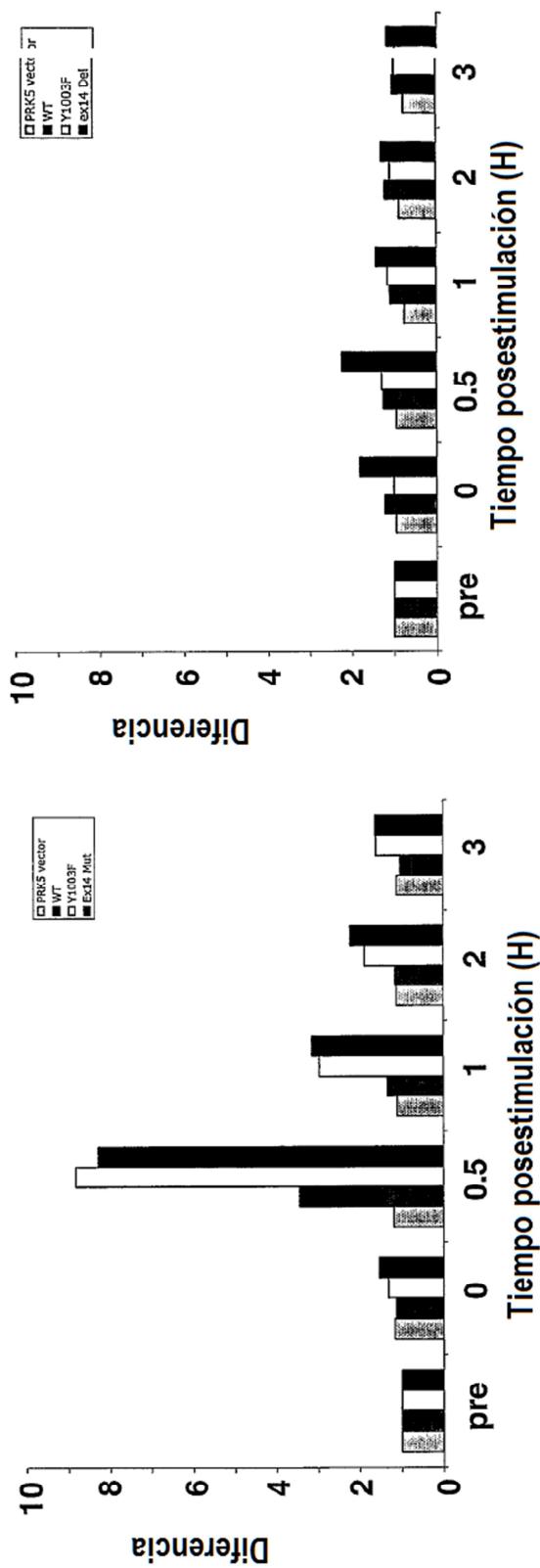
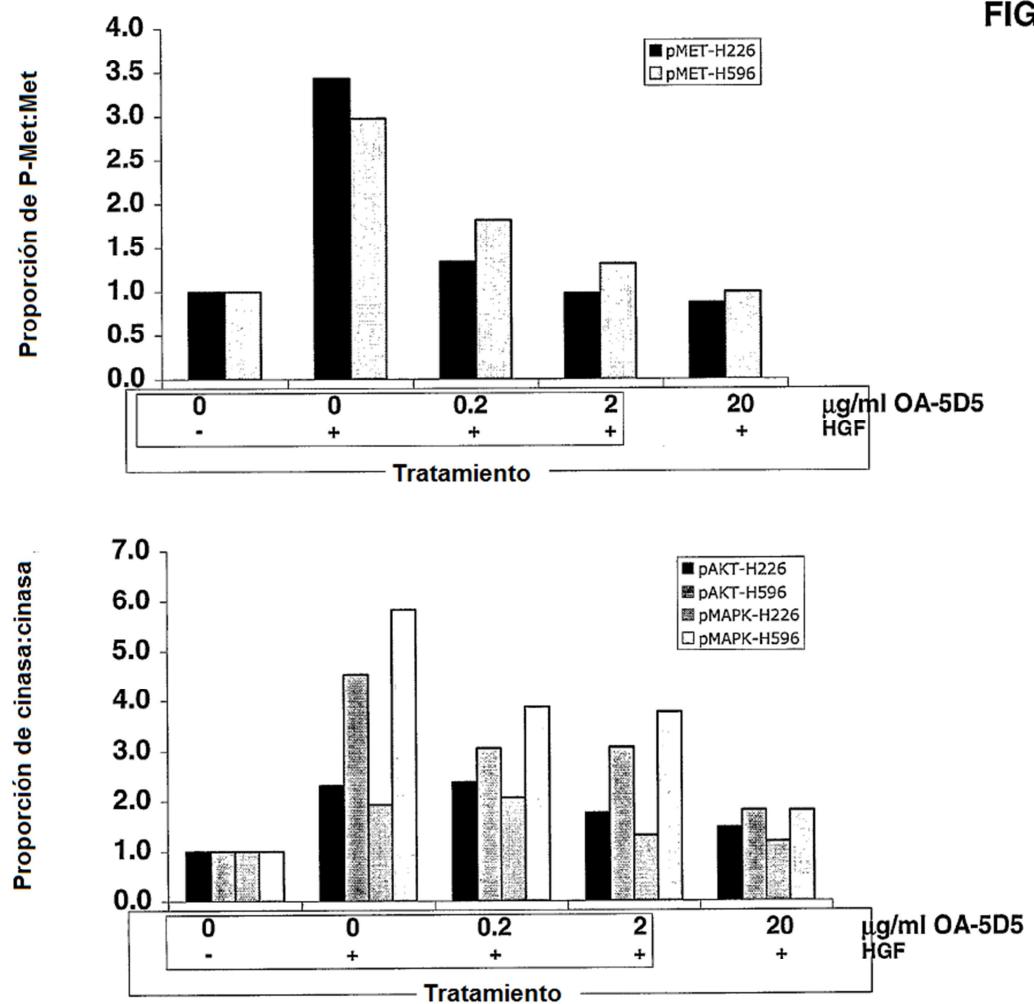


FIG.\_6



**FIG. 7**

Estructuras de corte y empalme ilustrativas que incluyen los límites de los intrones/extrones de exón 14 de c-met humano

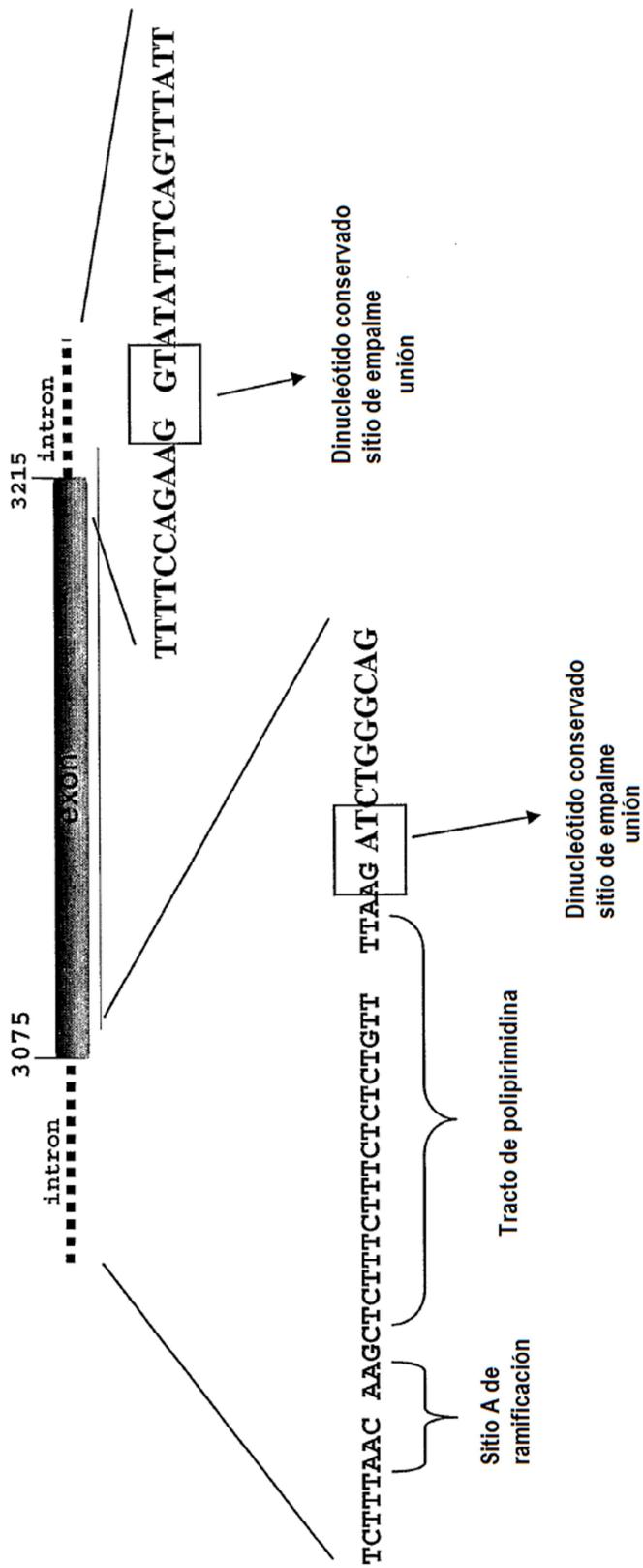


FIG. 8

1  
51 MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRNSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAET  
P1QNVILHEHHIFLGAATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTCGVPELEHPDCFPQCD  
CSSKANLSGGVWKDNINNMALVUDTYYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNH  
101 TADIQSEVHCIFSPQEEPSQSCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFNFVQGNT  
151 INSSYFPDHPPLHSISVRRLKETKDGFMFLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYV  
201 HAFESNNFIYFLTVQRETTLDAQTFHTRIIRFCISNSGLHSYMEMPLECIL  
251 TEKRRKKRSTKKEVFNLQAAVYSKPGAGLARQIGASLNDLIFGVFAQSK  
301 PDSAEPMDRSAMCAFPIKYVNDFFNKIVNKNVRCQLQHFYGPNHEHCFNR  
351 TLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVIDLFMGQFSEVLLTSISTFIKGDL  
401 TIANLGTTSEGGRFMQVWVSRSGPSTPHVNFLLDSPVSPPEVIEHTLNQNG  
451 YTLVITGKKITKIPILNGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEE  
501 CLSGTWQTQICLPAIYKVFPNSAPLEGGTRLTICWDGFRRNNKFDLKK  
551 TRVLLGNESCTLTLSESTMNTLKCCTVGPAMNKHFNMIIISSNGHGTQYS  
601 TFSYYDPVITSISKYGPMAGGTLLTGTGNYLNSGNSNRHSIGGKTCILK  
651 SVSNSILECYTPAQQTISTEFAVVKLKDLANRETSIFSYREDPVIYEIHPT  
701 KSFISGGSTTITGVGKNNLNSVSUPRMVINVHEAGRNFVTACQHRSNSEIIC  
751 CTPPSLQQLNLQLPLKTKAFFMIDGILSKYFDLIVVHNPVFKPFEKPVMI  
801 SMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGNKSCENIHLHSEAVLCTVPNDL  
851 LKLNSELNEWKQQAISSTVLGKIVQPDQNFTGLIAGVVSISTALLLG  
901 FFLWLKKRKQIKDGLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTTEMVSNES  
951 VDYRATFPEDQFPNSQNGSCRQVQYPLTDMSPILTSGDSDISSPLLQNT  
1001 VHIDL SALNPELVQAVQHVVIGPSSLIVHFNEIGRGHFGCVYHGTLLDN  
1051 DGKKIHKCAVSKSLNRITTDIGEVSQFLTEGIMKDFSHPNVLSLGICLSE  
1101 GSPLVLPYMKHGDLLRNFINRETHNPTVKDLIGFGLQVAKAMKYASKKF  
1151 VHRDLAARNCMILDEKFTVKADEFGLARDMYDKEYSSVHNKTTGAKLPLVKWM  
1201 ALESLOQTQKFTTKSDVWSFGVVLWELMTRGAPPYDVTNTFDITYVLLQGR  
1251 RLLQPEYCPDPLYEVMLKGWHPKAEMRPSFSELVSRISAIFSTFIGEHYV  
1301 HVNATYVNWKCVAPYPSLSSEDNADDEVDTRPASFWETS  
1351 (SEQ ID NO: \_\_\_\_)

## FIG. 9

Secuencia de dominio de cadena liviana variable de anti-c-met OA-5D5

DIQMTQSPSSLSSASVGDRVTITCKSSQQSLLYTTSSQQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSG  
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYAYPwTFGQQGTTKVEIK

Secuencia de dominio de cadena pesada variable de anti-c-met OA-5D5

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMDPSNSDTRFNPNFKDRF  
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQQGTLVTVSS