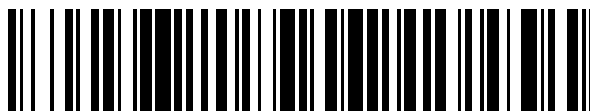


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 493**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2011 PCT/EP2011/069369**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12059561**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2011 E 11778618 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2635602**

54 Título: **Anticuerpos anti-c-Met**

30 Prioridad:

03.11.2010 US 409866 P

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

20.12.2016

73 Titular/es:

**ARGEN-X BV (100.0%)
Willemstraat 5
4811 AH Breda, NL**

72 Inventor/es:

**HULTBERG, ANNA;
SAUNDERS, MICHAEL;
DE HAARD, JOHANNES;
FESTJENS, ELS;
DE JONGE, NATALIE;
MICHIELI, PAULO;
BASILICO, CRISTINA y
DREIER, TORSTEN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 594 493 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

Anticuerpos anti-c-Met

Campo de la técnica

5 La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen específicamente al receptor proteico c-Met humano y que actúan como antagonistas estrictos de la activación del receptor c-Met mediada por el factor de crecimiento del hepatocito (HGF) y/o inhibe la activación del receptor c-Met independiente de HGF.

10 Antecedentes

El receptor de la tirosina cinasa, c-Met, y su ligando el factor de crecimiento del hepatocito (HGF) se han convertido en candidatos destacados para las terapias dirigidas contra el cáncer.

15 El c-Met es el receptor de superficie para el factor de crecimiento del hepatocito (HGF), también conocido como factor disperso. El receptor c-Met es un heterodímero unido por disulfuro que consiste en las cadenas α y β extracelulares. La cadena α heterodimerizada con la parte del extremo amino de la cadena β , forma el sitio principal de unión al ligando del dominio extracelular. La unión con HGF induce la heterodimerización del receptor c-Met y la fosforilación de dos restos de tirosina (Y1234 e Y1235) en el sitio catalítico, que regula la actividad cinasa.

20 La activación de c-Met mediada por HGF da como resultado un complejo programa genético al que se hace referencia como "crecimiento invasivo", que consiste en una serie de procesos fisiológicos, que incluyen la proliferación, invasión, y angiogénesis, que se producen en condiciones fisiológicas normales durante el desarrollo embrionario y patológicamente durante la oncogénesis. La señalización por medio de c-Met promueve la proliferación y supervivencia celular por medio de una variedad de efectores corriente abajo.

25 En las células tumorales, la activación de c-Met produce la puesta en marcha de una serie diversa de cascadas de señalización que dan como resultado el crecimiento celular, proliferación, invasión y protección frente a la apoptosis. Los mecanismos biológicos subyacentes de la tumorigenicidad de c-Met se alcanzan típicamente de tres maneras distintas: (a) con el establecimiento de bucles autocrinos HGF/c-Met; (b) por medio de la sobre-expresión de c-Met o HGF; y (c) en presencia de mutaciones activadoras de cinasa en la secuencia codificante del receptor c-Met. La expresión de HGF y c-Met se ha observado en biopsias tumorales en la mayoría de los tumores sólidos, y la señalización de c-Met se ha documentado en un amplio intervalo de tumores malignos humanos, incluyendo los cánceres de vejiga, mama, de cuello uterino, colorrectal, gástrico, cabeza y cuello, hígado, pulmón, ovárico, pancreático, próstata, renal y de tiroides.

30 La activación de c-Met por su ligando, el HGF, puede producirse de manera paracrina o autocrina. La activación paracrina puede ser patológica en presencia de producción de HGF anormal. La activación autocrina se produce cuando las células tumorales expresan aberrantemente tanto el HGF como su receptor. Además, la activación de c-Met puede producirse de una manera independiente de HGF, mediada por la heterodimerización de c-Met.

35 Un amplio intervalo de tumores malignos humanos presenta una estimulación de c-Met sostenida, sobre-expresión o mutación, incluyendo carcinomas de mama, hígado, pulmón, ovario, riñón y tiroides. Las mutaciones activadoras de c-Met se han identificado positivamente en pacientes con una forma hereditaria particular de cáncer renal papilar, implicando directamente el c-Met en la tumorigénesis humana. La señalización aberrante de la ruta de señalización de c-Met debido a la falta de regulación del receptor c-Met o la sobre-expresión de su ligando, HGF, se ha asociado con un fenotipo agresivo. La extensa evidencia de que la señalización de c-Met está implicada en la progresión y diseminación de varios cánceres y un aumento del entendimiento de su papel en la enfermedad han generado un interés considerable en c-Met y HGF como dianas principales en el desarrollo de fármacos para el cáncer (Eder et al, Clin Cancer Research; 15(7); 2009).

40 Actualmente están bajo investigación clínica una variedad de antagonistas de la ruta de c-Met con potenciales aplicaciones clínicas. El potencial de los antagonistas de c-Met incluye los anticuerpos monoclonales que bloquean la interacción de c-Met con su ligando el HGF. El que se ha descrito más ampliamente es el anticuerpo anti-c-Met 5D5 generado por Genentech (documento WO96/38557). El 5D5 se comporta como un potente agonista cuando se añade solo en varios modelos y como antagonista cuando se utiliza como un fragmento Fab o un anticuerpo de un brazo (MetMab).

45 El documento WO 2009/007427 describe anticuerpos monoclonales de ratón contra c-Met y variantes quiméricas en las que los dominios de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal de ratón, o una variante humanizada del mismo, se acoplan con la región constante de IgG1 humana. Sin embargo, aunque el anticuerpo monoclonal de ratón, 224G11, presenta una actividad antagonista sin actividad agonista intrínseca significativa, al acoplar los dominios de unión al antígeno de 224G11 a la IgG1 humana, se generaba una forma quimérica de 224G11 que presentaba algo de actividad agonista asociada con una reducción de la eficacia antagonista: La actividad agonista que presenta la forma quimérica de 224G11 puede revertirse construyendo mutaciones puntuales en el dominio de bisagra de la cadena pesada de la IgG1 humana. En esta variante modificada se sustituyen varios restos amino

humanos de la región de bisagra se sustituyen por restos murinos que se existen en las posiciones equivalentes de la secuencia de IgG1 murina. La actividad antagonista del receptor c-Met se restaura en la variante modificada resultante, pero se reduce la homología estructural total y de secuencia con los anticuerpos humanos como resultado de las mutaciones que se necesitan en la región de bisagra. Además, al menos uno de los bucles hipervariables de 224G11 adopta una estructura canónica que no se encuentra en el repertorio de anticuerpos humanos.

El documento WO 2007/126799 describe anticuerpos monoclonales humanos completos contra c-Met. Estos anticuerpos se comportan como antagonistas de la interacción con HGF, pero no se presentan datos respecto a la actividad agonista intrínseca de estos anticuerpos o su capacidad para inhibir la dimerización de c-Met.

El documento WO 2010/059654 también describe anticuerpos c-Met monoclonales. Estos anticuerpos se caracterizan por unirse a la cadena α de c-Met humano e inducir la internalización del c-Met humano de la superficie celular.

Descripción de la invención

Se proporciona en el presente documento un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une específicamente a la proteína c-Met humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR3, CDR2 y CDR1 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR3, CDR2 y CDR1, donde:

la secuencia variable CDR3 de cadena pesada es SEQ ID NO: 21;
 la secuencia variable CDR2 de cadena pesada se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 84; y
 la secuencia variable CDR1 de cadena pesada es SEQ ID NO: 19; y el dominio variable de cadena ligera incluye una combinación de CDR que se selecciona de entre lo siguiente:

(i) la secuencia variable CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO: 33;
 la secuencia variable CDR 2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 32;
 la secuencia variable CDR1 de cadena ligera es SEQ ID NO: 31; o

(ii) la secuencia variable CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO: 145;
 la secuencia variable CDR2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 32;
 la secuencia variable CDR1 de cadena ligera es SEQ ID NO: 144; o

(iii) la secuencia variable CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO: 146;
 la secuencia variable CDR2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 32;
 la secuencia variable CDR2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 31; o

(iv) la secuencia variable CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO: 147;
 la secuencia variable CDR2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 32;
 la secuencia variable CDR1 de cadena ligera es SEQ ID NO: 144; o

(v) la secuencia variable CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO: 148;
 la secuencia variable CDR2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 32;
 la secuencia variable CDR1 de cadena ligera es SEQ ID NO: 144.

Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede bloquear la unión de HGF al sitio de unión a HGF de baja afinidad de la proteína c-Met humana.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede comprender una región bisagra que contiene una secuencia completamente humana. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno también puede tener alta homología con el humano, como se define en el presente documento.

En una realización se proporciona un anticuerpo de acuerdo con las presentes reivindicaciones que tienen alta homología con el humano que se une específicamente a un receptor proteico c-Met humano y que antagoniza con la activación del receptor c-Met mediada por HGF.

En una realización se proporciona un anticuerpo aislado de acuerdo con las presentes reivindicaciones que tiene alta homología con el humano, que se une específicamente a un receptor proteico c-Met humano, donde el anticuerpo es un antagonista estricto de la activación del receptor c-Met mediada por HGF y comprende una región bisagra que tiene una secuencia completamente humana, donde la presencia de la región bisagra humana no afecta adversamente la actividad antagonista del anticuerpo.

En una realización más se proporciona un anticuerpo de acuerdo con las presentes reivindicaciones que tiene una alta homología con el humano, o un fragmento de unión al antígeno el mismo, que se une específicamente a una proteína c-Met humana, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno bloquea la unión de HGF al sitio de unión de alta afinidad de HGF de dicha proteína c-Met humana y es un antagonista estricto de la activación del receptor c-Met mediada por HGF.

En cada una de las realizaciones anteriores, el anticuerpo puede ser cualquiera de, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal completamente humano, o un anticuerpo monoclonal humanizado, cada uno de los cuales puede presentar una unión bivalente a la proteína c-Met humana.

En una realización particular, el anticuerpo que tiene una alta homología con el humano, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL), donde el dominio VH y VL, o una o más de las CDR de los mismos, se derivan de camélidos.

En una realización se proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno, de acuerdo con las presentes reivindicaciones, que se une específicamente a una proteína c-Met humana y es un antagonista estricto de la activación del receptor c-Met mediada por HGF, cuyo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL), donde los dominios VH y VL, o una o más de las CDR de los mismos, se derivan de camélidos. En una realización particular el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno, puede comprender dominios VH y VL de llama, o dominios VH y VL de llama humanizados. Este anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, puede también presentar una "alta homología con el humano", como se define en el presente documento.

En realizaciones no limitantes, la invención proporciona los siguientes anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se definen en referencia a características estructurales específicas, es decir, las secuencias de aminoácidos especificadas de cualquiera de las CDR o los dominios variables completos. Todos estos anticuerpos se unen específicamente a la proteína c-Met humana y son antagonistas estrictos de la activación del receptor c-Met mediada por HGF. En realizaciones particulares, los anticuerpos definidos por las siguientes características estructurales pueden presentar adicionalmente una alta homología con los humanos, como se define en el presente documento. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales producidos por medios recombinantes. Las CDR de los anticuerpos c-Met siguientes pueden derivarse de camélidos, es decir, derivados de los anticuerpos convencionales que se producen por la inmunización de camélidos (específicamente llamas) con el antígeno c-Met. La invención también proporciona variantes humanizadas o humanizados de la línea germinal, variantes de afinidad y variantes que contienen sustituciones conservadoras de aminoácidos, como se define en el presente documento. Específicamente se proporcionan anticuerpos quiméricos que contienen dominios VH y VL que se derivan de camélidos, o variantes humanizadas o alineadas germinalmente de los mismos, fusionados con dominios constantes de anticuerpos humanos, en particular de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas. Estos anticuerpos pueden incluir una región bisagra que tiene una secuencia completamente humana, como se define en el presente documento.

Las realizaciones ejemplares de los anticuerpos c-Met se describen ahora adicionalmente en referencia a las características estructurales.

36C4 y variantes del mismo

La presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína c-Met humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno un dominio variable de cadena pesada en el que la secuencia variable CDR3 de cadena pesada es SEQ ID NO: 21.

En una realización del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo la secuencia variable CDR3 de cadena pesada es SEQ ID NO: 21; la secuencia variable CDR2 de cadena pesada es SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 83; y la secuencia variable CDR1 de cadena pesada es SEQ ID NO: 19.

En una realización adicional se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une específicamente a la proteína c-Met humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, donde:

la secuencia variable CDR3 de cadena pesada es SEQ ID NO: 21;
la secuencia variable CDR2 de cadena pesada se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 84; y
la secuencia variable CDR1 de cadena pesada es SEQ ID NO: 19; y el dominio variable de cadena ligera incluye una combinación de CDR que se selecciona de entre lo siguiente:

- (i) la secuencia variable CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO: 33;
la secuencia variable CDR 2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 32;
la secuencia variable CDR1 de cadena ligera es SEQ ID NO: 31; o
- 5 (ii) la secuencia variable CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO: 145;
la secuencia variable CDR2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 32;
la secuencia variable CDR1 de cadena ligera es SEQ ID NO: 144; o
- 10 (iii) la secuencia variable CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO: 146;
la secuencia variable CDR2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 32;
la secuencia variable CDR1 de cadena ligera es SEQ ID NO: 144; o
- 15 (iv) la secuencia variable CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO: 147;
la secuencia variable CDR2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 32;
la secuencia variable CDR1 de cadena ligera es SEQ ID NO: 144; o
- 20 (v) la secuencia variable CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO: 148;
la secuencia variable CDR2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 32;
la secuencia variable CDR1 de cadena ligera es SEQ ID NO: 144.
- El anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, se une a un epítipo del péptido 98-VDTYYDDQLISCGSVNRGTGQRHVFPNHHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGN TINSSYFPDHLPLHSIVRRLKETK-199 (SEQ ID NO: 181) en el dominio SEMA de c-Met humano.
- 25 En una realización ejemplar el presente anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, puede ser un antagonista estricto de la activación de la proteína c-Met humana mediada por HGF y también puede inhibir la activación de la proteína c-Met humana independiente de HGF, y preferentemente no induce una regulación negativa de la proteína c-Met humana de superficie.
- 30 En una realización el presente anticuerpo puede incluir el dominio CH1, región bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de un anticuerpo humano, en particular una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana.
- En una realización adicional se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une específicamente a la proteína c-Met humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, comprendiendo el dominio variable de cadena pesada una secuencia VH con al menos un 85% de identidad de secuencia, o al menos un 90% de identidad de secuencia, o al menos un 95% de identidad de secuencia, o al menos un 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, con una secuencia que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 51, 88, 92, 94, 96 y 98.
- 35 40 En una realización adicional se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une específicamente a la proteína c-Met humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, comprendiendo el dominio variable de cadena pesada una secuencia de aminoácidos VH que se selecciona de entre el grupo que consiste en: SEQ ID NO: 51, 88, 92, 94, 96 y 98.
- 45 En una realización adicional se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une específicamente a la proteína c-Met humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, comprendiendo el dominio variable de cadena ligera una secuencia V Lambda con al menos un 80% de identidad de secuencia, o al menos un 85% de identidad de secuencia, o al menos un 90% de identidad de secuencia, o al menos un 95% de identidad de secuencia, o al menos un 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 55, 93, 95, 97, 99, 158, 159, 160, 161, 162, 163 y 164.
- 50 55 En una realización adicional se proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une específicamente a la proteína c-Met humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, comprendiendo el dominio variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos V Lambda que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 55, 93, 95, 97, 99, 158, 159, 160, 161, 162, 163 y 164.
- 60 En una realización adicional se proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une específicamente a la proteína c-Met humana y es preferentemente un antagonista estricto de la activación del receptor c-Met mediada por HGF,
- 65

- comprendiendo el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia VH con al menos un 85% de identidad de secuencia, o al menos un 90% de identidad de secuencia, o al menos un 95% de identidad de secuencia, o al menos un 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, con una secuencia que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 51, 88, 92, 94, 96 y 98, y el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia V Lambda con al menos un 80% de identidad de secuencia, o al menos un 85% de identidad de secuencia, o al menos un 90% de identidad de secuencia, o al menos un 95% de identidad de secuencia, o al menos un 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 55, 93, 95, 97, 99, 158, 159, 160, 161, 162, 163 y 164.
- 5 El presente anticuerpo se une a un epítipo en el péptido 98-VDTYYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPNHNT ADIQSEVHCIFSPQIEEPSQPCDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNINSSYFPDHLHSISVRRLKETK-199 (SEQ ID NO: 181) en el dominio SEMA del c-Met humano.
- 10
- 15 En una realización ejemplar, el presente anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, puede ser un antagonista estricto de la activación de la proteína c-Met humana mediada por HGF y también puede inhibir la activación de la proteína c-Met humana independiente de HGF, y preferentemente no induce una regulación negativa significativa de la proteína c-Met humana de la superficie celular.
- 20 En una realización el presente anticuerpo puede incluir el dominio CH1, región bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de un anticuerpo humano, en particular de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana.
- En una realización adicional se proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína c-Met humana y es preferentemente un antagonista estricto de la activación del receptor c-Met mediada por HGF, comprendiendo el anticuerpo un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 88 o una variante humanizada o de afinidad del mismo, y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 55, o una variante humanizada, o de afinidad del mismo.
- 25
- 30 En una realización ejemplar, el presente anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, puede ser un antagonista estricto de la activación de la proteína c-Met humana mediada por HGF y también puede inhibir la activación de la proteína c-Met humana independiente de HGF, y preferentemente no induce una regulación negativa significativa de la proteína c-Met humana de la superficie celular.
- 35 En una realización el presente anticuerpo puede incluir el dominio CH1, región bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de un anticuerpo humano, en particular de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana.
- En una realización adicional se proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une significativamente a una proteína c-Met humana y es preferentemente un antagonista estricto de la activación del receptor c-Met mediada por HGF, comprendiendo el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia VH con al menos un 85% de identidad de secuencia, o al menos un 90% de identidad de secuencia, o al menos un 95% de identidad de secuencia, o al menos un 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, con una secuencia que se muestra en SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 88, y el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia V Lambda con al menos un 80% de identidad de secuencia, o al menos un 85% de identidad de secuencia, o al menos un 90% de identidad de secuencia, o al menos un 95% de identidad de secuencia, o al menos un 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 55, o una variante humanizada, o de afinidad de la misma.
- 40
- 45 El presente anticuerpo o región de unión al antígeno del mismo puede comprender CDR de cadena pesada que son idénticas a las CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 51 o a las CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 88 y CDR de cadena ligera que son idénticas a las CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 55, mientras que presenta variaciones de secuencia de aminoácidos en las regiones marco conservadas.
- 50
- 55 El presente anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a un epítipo en el péptido 98-VDTYYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPNHNTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQPCDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGN TINSSYFPDHLHSISVRRLKETK-199 (SEQ ID NO: 181) del dominio SEMA del c-Met humano.
- 60 En una realización ejemplar, el presente anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede ser un antagonista estricto de la activación de la proteína c-Met humana mediada por HGF y también puede inhibir la activación de la proteína c-Met humana independiente de HGF, y preferentemente no induce una regulación negativa significativa en la proteína c-Met humana de la superficie celular.
- 65 En una realización, el presente anticuerpo puede incluir el dominio CH1, región bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de un anticuerpo humano, en particular de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana.

En una realización adicional se proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína c-Met humana y es preferentemente un antagonista estricto de la activación del receptor c-Met mediada por HGF, cuyo anticuerpo es una variante humanizada de la línea germinal del anticuerpo 36C4, comprendiendo dicha variante de anticuerpo alineado germinalmente:

- 5 (a) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 92, y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 93; o
- 10 (b) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 94, y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 95; o
- (c) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 96, y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 97; o
- 15 (d) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 98, y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 99; o
- (e) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 88, y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163 y SEQ ID NO: 164.

Se identificó que estas variantes de anticuerpos 36C4, o regiones de unión al antígeno, comprendían una combinación de un dominio VH, definido en referencia a una secuencia de aminoácidos específica, y un dominio VL (V Kappa), también definido en referencia a una secuencia de aminoácidos específica. Para cada combinación VH/VL específica enumerada, esta definición se debería entender como que incluye anticuerpos, o regiones de unión al antígeno, que se forman por la combinación de un dominio VH que tiene al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 97%, o al menos un 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de VH establecida y un dominio VL que tiene al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 97%, o al menos un 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos VL establecida. En cada caso los dominios VH y VL definidos por el % de identidad de secuencia con respecto a las secuencias de aminoácidos de VH y VL establecidas pueden mantener secuencias CDR idénticas a las presentes en las secuencias de aminoácidos de VH y VL establecidas, aunque presentan variaciones de secuencia de aminoácidos en las regiones marco conservadas.

35 El presente anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a un epítipo en el péptido 98-VDTYYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGN TINSSYFPDHLPLHSISVRLKETK-199 (SEQ ID NO: 181) del dominio SEMA del c-Met humano.

40 En una realización ejemplar, el presente anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, puede ser un antagonista estricto de la activación de la proteína c-Met humana mediada por HGF y también puede inhibir la activación de la proteína c-Met humana independiente de HGF, y preferentemente no induce una regulación negativa significativa de la proteína c-Met humana de la superficie celular.

45 En una realización, el presente anticuerpo puede incluir el dominio CH1, región bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de un anticuerpo humano, en particular una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana.

En una realización adicional se proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína c-Met humana y es preferentemente un antagonista estricto de la activación del receptor c-Met mediada por HGF, cuyo anticuerpo es una variante de afinidad de 36C4Q, comprendiendo dicha variante de afinidad un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 88, y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163 y SEQ ID NO: 164.

50 En una realización ejemplar, el presente anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, puede ser un antagonista estricto de la activación de la proteína c-Met humana mediada por HGF y también puede inhibir la activación de la proteína c-Met humana independiente de HGF, y preferentemente no induce una regulación negativa significativa de la proteína c-Met humana de la superficie celular.

60 En una realización ejemplar, el presente anticuerpo puede incluir el dominio CH1, región bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de un anticuerpo humano, en particular de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana.

65 Cuando se identifica que anticuerpos particulares, o regiones de unión al antígeno, comprenden una combinación de un dominio VH, que se define en referencia a una secuencia de aminoácidos específica, y un dominio VL (V Kappa),

también identificado en referencia a una secuencia de aminoácidos específica, entonces para cada combinación VH/VL específica enumerada (a menos de que se establezca otra cosa) esta definición se puede entender como que incluye anticuerpos, o regiones de unión al antígeno, que se forman por la combinación de un dominio VH que tiene al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 97%, o al menos un 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de VH establecida y un dominio VL que tiene al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 97%, o al menos un 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de VL establecida. En cada caso los dominios VH y VL definidos por el % de identidad de secuencia respecto a las secuencias de aminoácidos de VH y VL establecidas pueden mantener secuencias de CDR idénticas a las presentes en las secuencias de aminoácidos de VH y VL establecidas, aunque presentan variaciones de secuencia en las regiones marco conservadas.

A menos de que se establezca otra cosa en la presente solicitud, el % de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar comparando las dos secuencias alineadas de manera óptima, en las cuales la secuencia de aminoácidos que se va a comparar puede comprender adiciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia para un alineamiento óptimo entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas en las cuales el resto de aminoácido es idéntico entre las dos secuencias, dividiendo este número de posiciones idénticas por el número total de posiciones, en la ventana de comparación y multiplicando el resultado obtenido por 100 con el fin de obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias. Por ejemplo, es posible utilizar el programa BLAST, "BLAST 2 sequences" (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) disponible en el sitio de internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/b12.html>, siendo los parámetros que se utilizan los que se dan por defecto (en particular para los parámetros "penalización de hueco abierto": 5, y "penalización de extensión de huecos": 2; eligiéndose la matriz, por ejemplo, la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa), el porcentaje de identidad entre las dos secuencias que se van a comparar lo calcula directamente el programa.

Los anticuerpos c-Met, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se proporcionan en el presente documento pueden presentar cada uno, una o más, o cualquier combinación, de las siguientes propiedades/características:

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede actuar como un inhibidor de la activación del receptor c-Met independiente de HGF.

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede inhibir la dimerización independiente de HGF, y más particularmente la homodimerización y/o heterodimerización, de la proteína c-Met humana.

El anticuerpo puede presentar una o más funciones efectoras que se seleccionan de entre la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP) contra las células que expresan la proteína c-Met humana sobre la superficie celular.

El anticuerpo puede presentar ADCC contra las células cancerosas adictas a c-Met.

El anticuerpo puede presentar una función de aumento de ADCC en comparación con un anticuerpo de referencia que es un anticuerpo equivalente que comprende un dominio Fc nativo humano. En una realización no limitante, la función ADCC puede tener al menos un aumento de 10x en comparación con el anticuerpo de referencia que comprende un dominio Fc nativo humano. En este contexto "equivalente" puede entenderse como que significa que el anticuerpo con función ADCC aumentada presenta sustancialmente una especificidad de unión al antígeno idéntica y/o comparte una secuencia de aminoácidos idéntica al anticuerpo de referencia, excepto por algunas modificaciones que se hacen (con respecto al Fc nativo humano) con el fin de aumentar la ADCC.

El anticuerpo puede contener la región bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de la IgG humana, más preferentemente de la IgG1 humana.

El anticuerpo puede incluir modificaciones en la región Fc, como se explica en otro sitio del presente documento. En particular, el anticuerpo puede ser una IgG no fucosilada.

En aspectos adicionales, la invención también proporciona moléculas de polinucleótido que codifican los anticuerpos c-Met enumerados anteriormente y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, además de vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos, células huésped que contienen los vectores y métodos de expresión/producción recombinantes de los anticuerpos c-Met.

En un aspecto adicional más, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más de los anticuerpos c-Met que se han descrito anteriormente y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto adicional más de la invención se refiere a métodos de tratamiento médico que utiliza los anticuerpos c-

Met enumerados anteriormente, particularmente en el tratamiento del cáncer, que incluyen tanto los cánceres dependientes de HGF como los cánceres independientes de HGF.

Definiciones

5 **“Anticuerpo” o “inmunoglobulina”** – Como se utiliza en el presente documento, el término “inmunoglobulina” incluye un polipéptido que tiene una combinación de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras que posee o no una inmunorreactividad específica. “Anticuerpos” se refiere a dichos ensamblajes que tienen una actividad inmunorreactiva específica significativa que se conozca contra un antígeno de interés (por ejemplo, c-Met humano).

10 La expresión “anticuerpos c-Met” se utiliza en el presente documento para referirse a anticuerpos que presentan una especificidad inmunológica por una proteína c-Met humana. Como se explica en otro sitio del presente documento, “especificidad” por el c-Met humano no excluye la reacción cruzada con especies homólogas de c-Met. Los anticuerpos e inmunoglobulinas comprenden cadenas ligeras y pesadas, con o sin una unión covalente intercatenaria entre ellas. Las estructuras de inmunoglobulina básica en sistemas vertebrados se entienden relativamente bien.

20 El término genérico “inmunoglobulina” comprende cinco clases de anticuerpo distintas que se pueden distinguir bioquímicamente. Las cinco clases de anticuerpo están en el ámbito de la presente invención, la siguiente exposición generalmente se dirigirá a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a la IgG, las inmunoglobulinas comprenden dos cadenas de polipéptido ligeras idénticas de un peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltons, y dos cadenas pesadas idénticas de un peso molecular de 53.000-70.000. Las cuatro cadenas están unidas por enlaces disulfuro con una configuración de “Y” en la que las cadenas ligeras se engarzan con las cadenas pesadas comenzando en la boca de la “Y” y continúan a través de la región variable.

25 Las cadenas ligeras de un anticuerpo se clasifican como kappa o lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada se puede unir con la cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligera y pesada están unidas covalentemente entre ellas, y las porciones de “cola” de las dos cadenas pesadas se unen entre ellas por enlaces disulfuro covalentes o no covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan por hibridomas, células B o células huésped modificadas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos transcurren desde el extremo N en los extremos bifurcados de la configuración en Y hasta el extremo C en el fondo de cada cadena. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon (γ , μ , α , δ y ϵ) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la “clase” del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos) por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc. están bien caracterizadas y se sabe que confieren una especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente diferenciables por el experto en vista de la presente divulgación y, en consecuencia, están dentro del ámbito de la presente invención.

40 Como se ha indicado anteriormente, la región variable de un anticuerpo permite al anticuerpo reconocer selectivamente y unirse específicamente a epítopos y antígenos. Es decir, el dominio VL y el dominio VH de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión al antígeno tridimensional. Esta estructura cuaternaria del anticuerpo forma el sitio de unión al antígeno presente al final de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno se define por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) en cada una de las cadenas VH y VL.

45 **“Proteína c-Met” o “receptor c-Met”** – Como se utilizan en el presente documento, las expresiones “proteína c-Met” o “receptor c-Met” o “c-Met” se utilizan de manera intercambiable y se refieren al receptor tirosina cinasa que, en su forma de tipo silvestre, se une con el Factor de Crecimiento del Hepatocito (HGF). Las expresiones “proteína c-Met humana” o “receptor c-Met humano” o “c-Met humano” se utilizan de manera intercambiable para referirse al c-Met humano, que incluye la proteína c-Met nativa humana que se expresa de manera natural en el huésped humano y/o en la superficie de líneas celulares humanas que se cultivan, así como a las formas recombinantes y fragmentos de la misma y también a las formas mutantes de origen natural, variantes polimórficas y las formas mutantes funcionalmente activas. Ejemplos específicos de c-Met humano incluyen, por ejemplo, el polipéptido humano codificado por la secuencia de nucleótido proporcionado con el N° de registro de GenBank NM_000245, o la proteína humana codificada por la secuencia de polipéptido proporcionada con el N° de registro de GenBank NP_000236, o el dominio extracelular de la misma. El precursor de cadena sencilla de la proteína c-Met se escinde tras la traducción para producir las subunidades alfa y beta, que están unidas por disulfuro para formar el receptor maduro. Los anticuerpos c-Met que se proporcionan en el presente documento se unen típicamente tanto a la proteína c-Met humana madura como a la que se expresa en la superficie celular, por ejemplo, la que se expresa en la línea celular gástrica humana MKN-45 y la proteína c-Met humana recombinante (por ejemplo el c-Met dimérico recombinante que se puede obtener en R&D systems, 358-MT/CF).

65 **“Sitio de unión”** – Como se utiliza en el presente documento, la expresión “sitio de unión” comprende una región de un polipéptido que es responsable de unirse selectivamente a un antígeno diana de interés (por ejemplo, el c-Met humano). Los dominios de unión o regiones de unión comprenden al menos un sitio de unión. Los dominios de unión ejemplares incluyen un dominio variable de anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo de la invención pueden

comprender un único sitio de unión al antígeno o múltiples (por ejemplo, dos, tres, o cuatro) sitios de unión al antígeno.

5 **“Derivado de”** – Como se utiliza en el presente documento, la expresión “derivado de” una proteína determinada (por ejemplo un anticuerpo c-Met o un fragmento de unión al antígeno del mismo) se refiere al origen del polipéptido. En una realización, el polipéptido o secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de partida particular es una secuencia CDR o una secuencia relacionada con esta. En una realización, la secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de partida particular no está contigua. Por ejemplo, en una realización una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR se derivan de un anticuerpo de partida. En una realización, el polipéptido o la secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de partida particular o secuencia de aminoácidos tiene una secuencia de aminoácidos que es esencialmente idéntica a la secuencia de partida, o una parte de la misma en la que la parte consiste en al menos 3-5 aminoácidos, 5-10 aminoácidos, al menos 10-20 aminoácidos, al menos 20-30 aminoácidos, o al menos 30-50 aminoácidos, o que se puede identificar de otra manera por un experto habituado en la técnica como que tiene su origen en la secuencia de partida. En una realización la una o más secuencias de CDR que se derivan del anticuerpo de partida están modificadas para producir variantes de secuencias CDR, por ejemplo, variantes de afinidad, en las que las variantes de secuencias CDR mantienen la actividad de unión a c-Met.

20 **“Derivado de camélidos”** – En ciertas realizaciones preferidas, las moléculas de anticuerpo c-Met de la invención comprenden secuencias de aminoácidos de regiones marco conservadas y/o secuencias de aminoácidos de CDR derivadas de un anticuerpo convencional de camélidos que se produce por la inmunización activa de un camélido con el antígeno c-Met. Sin embargo, los anticuerpos c-Met que comprenden secuencias de aminoácidos derivados de camélidos se pueden modificar para que comprendan regiones marco conservadas y/o secuencias de región constante derivadas de una secuencia de aminoácidos humana u otras especies de mamíferos no camélidos. Por ejemplo, una región marco conservada de un ser humano o un primate no humano, la parte de cadena pesada, y/o la parte bisagra pueden incluirse en los anticuerpos c-Met de interés. En una realización, pueden estar presentes uno o más aminoácidos no camélidos en la región marco conservada de un anticuerpo c-Met “derivado de camélidos”, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de una región marco conservada de camélidos puede comprender una o más mutaciones de aminoácidos en las que está presente el resto de aminoácido que corresponde con el del ser humano o el primate no humano. Además, los dominios VH y VL derivados de camélidos, o las variantes humanizadas de los mismos, se pueden unir a los dominios constantes de los anticuerpos humanos para producir una molécula quimérica, como se describe ampliamente en otro sitio del presente documento.

35 **“Sustitución conservadora de aminoácidos”** – Una “sustitución conservadora de aminoácidos” es una en la que el resto de aminoácido se sustituye con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, e incluyen cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, se puede sustituir un resto de aminoácido no esencial en un polipéptido de inmunoglobulina con otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. En otra realización, se puede sustituir una cadena de aminoácidos con una cadena estructuralmente similar que se diferencia en el orden y/o composición de los miembros de la familia de cadenas laterales.

45 **“Parte de cadena pesada”** – Como se utiliza en el presente documento, el término “parte de cadena pesada” incluye secuencias de aminoácidos que se derivan de los dominios constantes de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una parte de cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio CH1, una región bisagra (por ejemplo, una región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, o una variante o fragmento de las mismas. En una realización, una molécula de unión de la invención puede comprender la parte Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo una parte de bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3). En otra realización, una molécula de unión de la invención carece de al menos una parte de un dominio constante (por ejemplo, todo o parte de un dominio CH2). En ciertas realizaciones, al menos uno, y preferentemente todos, los dominios constantes se derivan de la cadena pesada de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, en una realización preferida, las partes de cadena pesada comprenden un dominio bisagra completamente humano. En otras realizaciones preferidas, la parte de cadena pesada comprende una parte Fc completamente humana (por ejemplo, las secuencias de bisagra, CH2 y CH3 de una inmunoglobulina humana). En ciertas realizaciones, los dominios constantes constitutivos de la parte de cadena pesada son de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una parte de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH3 derivado de una molécula de IgG1 y la región bisagra se deriva de una molécula de IgG3 o IgG4. En otras realizaciones, los dominios constantes son dominios quiméricos que comprenden partes de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una bisagra puede comprender una primera parte de una molécula de IgG1 y una segunda parte de una molécula de IgG3 o IgG4. Como se ha expuesto anteriormente, el experto habituado en la técnica entenderá que los dominios constantes de una parte de la cadena pesada se pueden modificar de manera que se diferencien en la secuencia de aminoácidos de la molécula de aminoácidos de origen natural (tipo silvestre). Es decir, los polipéptidos de la invención que se desvelan en el presente documento pueden

comprender alteraciones o modificaciones en uno más de los dominios constantes de cadena pesada (CH1, bisagra, CH2 o CH3) y/o del dominio constante de cadena ligera (CL). Las modificaciones ejemplares incluyen adiciones, eliminaciones o sustituciones de uno o más aminoácidos de uno o más dominios.

- 5 **“Quimérico”** – Una proteína “quimérica” comprende una primera secuencia de aminoácidos unida a una segunda secuencia de aminoácidos con la que no se une naturalmente en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos pueden existir normalmente en proteínas separadas que se ponen juntas en el polipéptido de fusión o pueden existir normalmente en la misma proteína pero se colocan en una disposición nueva en el polipéptido de fusión. Una proteína quimérica se puede crear, por ejemplo, por síntesis química o creando y traduciendo un polinucleótido en el que se codifican las regiones peptídicas en la relación deseada. Los anticuerpos c-Met quiméricos ejemplares incluyen proteínas de fusión que comprenden dominios VH y VL derivados de camélidos, o variantes humanizadas de los mismos, fusionados con dominios constantes de un anticuerpo humano, por ejemplo de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas.
- 10
- 15 **“Región variable” o “domino variable”** – El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables VH y VL se diferencian ampliamente entre las secuencias de los anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo en particular por su antígeno diana. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentran en tres segmentos llamados “bucles hipervariables” en cada dominio VL y dominio VH que forman parte del sitio de unión al antígeno.
- 20 Se hace referencia en el presente documento al primer, segundo y tercer bucle hipervariable del dominio V Lambda de cadena ligera como L1(λ), L2(λ) y L3(λ) y se pueden definir como que comprenden los restos 24-33 (L1(λ), que consiste en 9, 10 u 11 restos de aminoácidos), 49-53 (L2(λ), que consiste en tres restos) y 90-96 (L3(λ), que consiste en 5 restos) en el dominio VL (Morea et al., Methods 20:267-279 (2000)). Se hace referencia en el presente documento al primer, segundo y tercer bucles hipervariables del dominio V Kappa de la cadena ligera como L1(κ), L2(κ) y L3(κ) y se pueden definir como que comprenden los restos 25-33 (L1(κ), que consisten en 6, 7, 8, 11, 12 o 13 restos), 49-53 (L2(κ), que consiste en 3 restos) y 90-97 (L3(κ), que consisten en 6 restos) en el dominio VL (Morea et al., Methods 20:267-279 (2000)). Se hace referencia en el presente documento al primer, segundo y tercer bucles hipervariables del dominio VH como H1, H2 y H3 y se pueden definir como que comprenden los restos 25-33 (H1, que consiste en 7, 8 o 9 restos), 52-56 (H2, que consiste en 3 o 4 restos) y 91-105 (H3, altamente variable de longitud) en el dominio VH (Morea et al., Methods 20:267-279 (2000)).
- 30

A menos de que se indique otra cosa, los términos L1, L2 y L3 respectivamente se refieren al primer, segundo y tercer bucles hipervariables de un dominio VL, y engloba los bucles hipervariables que se obtienen de ambos isotipos V kappa y V lambda. Los términos H1, H2 y H3 respectivamente se refieren al primer, segundo y tercer bucles hipervariables del dominio VH, y engloba los bucles hipervariables que se obtienen de cualquiera de los isotipos de cadena pesada que se conocen, incluyendo γ , μ , α , δ y ϵ .

35

Los bucles hipervariables L1, L2, L3, H1, H2 y H3 pueden comprender cada uno parte de una “región determinante de complementariedad” o “CDR”, como se define posteriormente. Las expresiones “bucle hipervariable” y “región determinante de complementariedad” no son sinónimos estrictamente, ya que los bucles hipervariables (HV) se definen basándose en la estructura, mientras que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se definen basándose en la variabilidad de secuencia (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1983) y los límites de los HV y las CDR pueden ser diferentes en algunos dominios VH y VL.

40

45

Las CDR de los dominios VL y VH pueden definirse típicamente como que comprenden los siguientes restos de aminoácidos 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) y 89-97 (CDRL3) en el dominio variable de la cadena ligera, y los restos 31-35 o 31-35b (CDRH1), 50-65 (CDRH2) y 96-102 (CDRH3) en el dominio variable de la cadena pesada (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1991). Por lo tanto los HV pueden estar comprendidos en las CDR correspondientes y la referencia en el presente documento a “bucles hipervariables” de los dominios VH y VL se deberían interpretar como que también engloban las correspondientes CDR y viceversa, a menos de que se indique otra cosa.

50

Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman la región marco conservada (FR), como se define posteriormente. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cuatro FR (FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente), que sobre todo adoptan una configuración de láminas β , conectadas por tres bucles hipervariables. Los bucles hipervariables de cada cadena se mantienen juntos en estrecha proximidad por las FR y, con los bucles hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. El análisis estructural de los anticuerpos revelaba la relación entre la secuencia y la forma del sitio de unión formado por las regiones determinantes de complementariedad (Chothia et al., J. Mol. Biol. 227: 799-817 (1992)); Tramontano et al., J. Mol. Biol., 215:175-182 (1990)). A pesar de su alta variabilidad de secuencia, cinco de los seis bucles adoptan solo un pequeño repertorio de conformaciones de cadena principales, llamadas “estructuras canónicas”. Estas conformaciones se determinan antes de nada por la longitud de los bucles y en segundo lugar por la presencia de restos clave en ciertas posiciones de los bucles y en las regiones marco conservadas que determinan la conformación por medio de su empaque, uniones de hidrógeno o la capacidad para asumir conformaciones de cadena principales inusuales.

55

60

65

“CDR” – Como se utiliza en el presente documento, el término “CDR” o “región determinante de complementariedad” significa los sitios de combinación antigénica no contiguos que se encuentran en la región variable de ambos polipéptidos de cadena pesada y ligera. Estas regiones particulares han sido descritas por Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) y Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991), y por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) y por MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) donde las definiciones incluyen el solapamiento de subgrupos de restos de aminoácidos cuando se comparan entre ellos. Los restos de aminoácidos que engloban las CDR como se define en cada una de las referencias que se han citado anteriormente se exponen para su comparación. Preferentemente, el término “CDR” es una CDR como define Kabat basándose en las comparaciones de secuencia.

Tabla 1: Definiciones de CDR

	Definiciones de CDR		
	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

¹Numeración de restos según la nomenclatura de Kabat et al., *supra*
²Numeración de restos según la nomenclatura de Chothia et al., *supra*
³Numeración de restos según la nomenclatura de MacCallum et al., *supra*

“Región marco conservada” – La expresión “región marco conservada o “región FR” como se utiliza en el presente documento, incluye los restos de aminoácidos que son parte de la región variable, pero no son parte de las CDR (por ejemplo, utilizando la definición de Kabat de las CDR). Por lo tanto una estructura marco conservada de la región variable tiene entre 100-120 aminoácidos de longitud pero incluye solo los aminoácidos fuera de las CDR. En el ejemplo específico de una región variable de cadena pesada y de las CDR según define Kabat et al., la región marco conservada 1 corresponde con el dominio de la región variable que engloba los aminoácidos 1-30; la región marco conservada 2 se corresponde con el dominio de la región variable que engloba los aminoácidos 36-49; la región marco conservada 3 se corresponde con el dominio de la región variable que engloba los aminoácidos 66-94, y la región marco conservada 4 se corresponde con el dominio variable desde el aminoácido 103 hasta el final de la región variable. Las regiones marco conservadas de la cadena ligera están separadas de manera similar por cada una de las CDR de la región variable de cadena ligera. De manera similar, la utilización de la definición de CDR de Chothia et al. o McCallum et al. los límites de la región marco conservadas se separan por los respectivos extremos de CDR como se ha descrito anteriormente. En realizaciones preferidas, las CDR se definen según Kabat.

En los anticuerpos de origen natural, las seis CDR presentes en cada anticuerpo monomérico son secuencias de aminoácidos cortas, no contiguas que se posicionan específicamente para formar el sitio de unión al antígeno según el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los dominios variables de cadena ligera y pesada muestra menos variabilidad inter-molecular en la secuencia de aminoácidos y se denominan regiones marco conservadas. Las regiones marco conservadas adoptan en gran parte una conformación en lámina β y las CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de láminas β . Por lo tanto, estas regiones de marco conservadas actúan para formar un armazón que proporcionan el posicionamiento de las seis CDR en la orientación correcta por interacciones intercatenarias no covalentes. El sitio de unión al antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie de complementariedad con el epítipo del antígeno inmunorreactivo. Esta superficie de complementariedad promueve la unión no covalente del anticuerpo al epítipo del antígeno inmunorreactivo. La posición de las CDR puede ser identificada fácilmente por un experto habituado en la técnica.

“Región bisagra” – Como se utiliza en el presente documento, la expresión “región bisagra” incluye la parte de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 restos y es flexible, permitiendo de esta manera que las dos regiones de unión al antígeno del extremo N se muevan independientemente. Las regiones bisagra se pueden subdividir en tres dominios distintos, los dominios de bisagra superior, medio e inferior (Roux et al. J. Immunol. 1998 161:4083). Los anticuerpos c-Met que comprenden una región bisagra “completamente humana” pueden contener una de las secuencias de región bisagra que se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Secuencias bisagra humanas

IgG	Bisagra superior	Bisagra media	Bisagra inferior
IgG1	EPKSCDKTHT SEQ ID NO: 182	CPPCP SEQ ID NO: 183	APELLGGP SEQ ID NO: 184
IgG3	ELKTPGLDTHHT SEQ ID NO: 185	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃ SEQ ID NO: 186 SEQ ID NO: 187	APELLGGP SEQ ID NO: 184
IgG4	ESKYGPP SEQ ID NO: 18	CPSCP SEQ ID NO: 189	APEFLGGP SEQ ID NO: 190
IgG42	ERK SEQ ID NO: 191	CCVECPPPSP SEQ ID NO: 192	APPVAGP SEQ ID NO: 193

5 **“Dominio CH2”** – Como se utiliza en el presente documento la expresión “dominio CH2” incluye la parte de una molécula de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente el resto 244 al resto 360 de un anticuerpo utilizando los esquemas de numeración convencional (restos 244 a 360, sistema de numeración de Kabat; y restos 231-340, sistema de numeración EU, Kabat EA et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest. Bethesda, US Department of Health and Human Services, NIH. 1991). El dominio CH2 es único en que no se empareja estrechamente con otro dominio. Más bien, se interponen dos cadenas ramificadas de carbohidrato unidas por N entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG intacta nativa. También está bien documentado
10 que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 hasta el extremo C de la molécula de IgG y comprende aproximadamente 108 restos.

15 **“Fragmento”** – El término fragmento se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o una cadena de anticuerpo que contiene menos restos de aminoácido que un anticuerpo o cadena de anticuerpo completo o intacto. La expresión “fragmento de unión al antígeno” se refiere a un fragmento de polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une al antígeno o compete con el anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que se derivaron) por la unión al antígeno (es decir, unión específica al c-Met humano). Como se utiliza en el presente documento, el término “fragmento” de una molécula de anticuerpo incluye los fragmentos de unión al antígeno de anticuerpo, por ejemplo un dominio variable de cadena ligera (VL), un dominio variable de cadena pesada (VH), un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento de anticuerpo de dominio único (DAb), un anticuerpo con un brazo (monovalente), o una molécula de unión al antígeno formada por la combinación, ensamblaje o conjugación de dichos fragmentos de unión al antígeno. Los fragmentos se pueden obtener, por ejemplo, por medio de tratamiento enzimático o químico de un anticuerpo o una cadena de anticuerpo completo o intacto o por medios recombinantes.
20

25 **“Valencia”** – Como se utiliza en el presente documento, “valencia” se refiere al número de sitios potenciales de unión a la diana en el polipéptido. Cada sitio de unión a la diana se une específicamente a una molécula diana o sitio específico en una molécula diana. Cuando un polipéptido comprende más de un sitio de unión a la diana, cada sitio de unión a la diana se puede unir específicamente a la misma o diferentes moléculas (por ejemplo, se puede unir a diferentes ligandos o diferentes antígenos, o diferentes epítopos sobre el mismo antígeno). El sujeto de unión a moléculas preferentemente tiene al menos un sitio de unión específico para una molécula de c-Met humana. En realizaciones particulares los anticuerpos c-Met que se proporcionan en el presente documento pueden ser al menos bivalentes.
30

35 **“Especificidad”** – El término especificidad se refiere a la capacidad de unirse específicamente (por ejemplo, inmunorreactar con) una diana determinada, por ejemplo, c-Met. Un polipéptido puede ser mono-específico y contiene uno o más sitios de unión que se unen específicamente a una diana o un polipéptido puede ser multiespecífico y contener dos o más sitios de unión que se unen específicamente al mismo o diferentes dianas. En una realización, un anticuerpo de la invención es específico para más de una diana. Por ejemplo, en una realización, una molécula de unión multiespecífica de la invención se une a c-Met y a una segunda molécula que se expresa en una célula tumoral. Los anticuerpos ejemplares que comprenden los sitios de unión al antígeno que se unen a los antígenos que se expresan en las células tumorales se conocen en la técnica y se puede incluir una o más CDR de dichos anticuerpos en un anticuerpo de la invención.
40

45 **“Sintético”** – Como se utiliza en el presente documento, el término “sintético” con respecto a polipéptidos incluye los polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que no es de origen natural. Por ejemplo, polipéptidos de origen no natural que son formas modificadas de polipéptidos de origen natural (por ejemplo, que comprenden una mutación tal como una adición, sustitución o eliminación) o que comprenden una primera secuencia de aminoácido (que puede ser de origen natural o no) que se une en una secuencia lineal de aminoácidos con una
50 segunda secuencia de aminoácidos (que puede ser de origen natural o no) a la cual no está unida naturalmente en la naturaleza.

“Modificado genéticamente” – Como se utiliza en el presente documento, la expresión “modificado genéticamente” incluye la manipulación de ácido nucleico o moléculas de polipéptido por medios sintéticos (por ejemplo por técnicas recombinantes). Preferentemente, los anticuerpos de la invención están modificados genéticamente, incluyendo por ejemplo, anticuerpos humanizados y/o quiméricos, y anticuerpos que se han modificado genéticamente para mejorar una o más propiedades, tales como la unión al antígeno, la estabilidad/semivida o la función efectora.

“Anticuerpo modificado” – Como se utiliza en el presente documento, la expresión “anticuerpo modificado” incluye formas sintéticas de anticuerpos que se alteran de manera que no existen naturalmente, por ejemplo, anticuerpos que comprenden al menos dos partes de cadena pesada pero no son cadenas pesadas completas (tal como anticuerpos con dominios eliminados o minicuerpos); formas de anticuerpo multiespecíficas (por ejemplo, biespecíficas, trispecíficas, etc.) modificados para unirse a dos o más antígenos diferentes o a diferentes epítopos en el mismo antígeno); moléculas de cadena pesada unidas a moléculas scFv y similares. Se conocen las moléculas scFv en la técnica y se han descrito por ejemplo en la Patente de EE. UU. N° 5.892.019. Además, la expresión “anticuerpo modificado” incluye formas multivalentes de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos trivalentes, tetravalentes, etc., anticuerpos que se unen a tres o más copias del mismo antígeno). En otra realización, un anticuerpo modificado de la invención es una proteína de fusión que comprende al menos una parte de cadena pesada que carece de un dominio CH2 y que comprende un dominio de unión de un polipéptido que comprende la parte de unión de un miembro de una pareja receptor-ligando.

La expresión “anticuerpo modificado” puede utilizarse también en el presente documento para referirse a variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo c-Met. Un experto habituado en la técnica entenderá que un anticuerpo c-Met se puede modificar para que produzca una variante de anticuerpo c-Met que varía en la secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo c-Met del que se deriva. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de nucleótidos o aminoácidos que den lugar a sustituciones conservadoras o cambios con restos de aminoácidos “no esenciales” (por ejemplo, en restos de CDR y/o marco conservadas). Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir la sustitución de uno o más aminoácidos con un aminoácido de origen natural o no.

“Sustituciones humanizantes” – Como se utiliza en el presente documento, el término “sustituciones humanizantes” se refiere a sustituciones de aminoácidos en los que el resto de aminoácido presente en una posición particular del dominio de anticuerpo VH o VL del anticuerpo c-Met (por ejemplo, un anticuerpo c-Met derivado de camélidos se sustituye con un resto de aminoácido que existe en una posición equivalente en un dominio VH o VL humano de referencia. El dominio VH o VL humano de referencia puede ser un dominio VH o VL codificado por la línea germinal humana, en cuyo caso se puede hacer referencia a los restos sustituidos como “sustituciones de alineamiento germinal”. Las sustituciones humanizantes/de alineamiento germinal se pueden hacer en las regiones marco conservadas y/o las CDR de un anticuerpo c-Met, que se define en el presente documento.

“Variantes de afinidad” – Como se utiliza en el presente documento, la expresión “variante de afinidad” se refiere a “una variante de anticuerpo que presenta uno o más cambios de una secuencia de aminoácidos en comparación con un anticuerpo c-Met de referencia, en el que la variante de afinidad presenta una afinidad alterada para la proteína c-Met humana en comparación con el anticuerpo de referencia. Típicamente, las variantes de afinidad presentarán una mejor afinidad por el c-Met humano, en comparación con el anticuerpo c-Met de referencia. La mejoría puede ser por una K_D más baja, para el c-Met humano, o una velocidad de disociación más rápida para el anticuerpo c-Met humano o una alteración en el patrón de reactividad cruzada con homólogos de c-Met no humanos. Las variantes de afinidad típicamente presentan uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos de las CDR, en comparación con el anticuerpo c-Met de referencia. Dichas sustituciones pueden dar como resultado la sustitución del resto de aminoácido original presente en una posición determinada de las CDR con un resto de aminoácido diferente, que puede ser un resto de aminoácido de origen natural o un resto de aminoácido de origen no natural. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservadoras o no conservadoras.

“Alta homología humana” – Un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL) se considerará que tiene alta homología humana si los dominios VH y los dominios VL, en conjunto, presentan al menos un 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con la coincidencia más estrecha de las secuencias VH y VL de la línea germinal humana. Los anticuerpos que tienen alta homología humana pueden incluir anticuerpos que comprenden los dominios VH y VL de anticuerpos nativos no humanos que presentan un % suficientemente alto de identidad de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana, incluyendo por ejemplo anticuerpos que comprenden los dominios VH y VL de anticuerpos convencionales de camélidos, así como las variantes modificadas, especialmente humanizadas, de dichos anticuerpos y también los anticuerpos “completamente humanos”.

En una realización el dominio VH del anticuerpo con alta homología humana puede presentar una identidad de secuencias de aminoácidos o una homología de secuencia del 80% o mayor con uno o más dominios VH humanos a lo largo de las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 y FR4. En otras realizaciones la identidad de secuencia de aminoácidos o la secuencia de homología entre el dominio VH del polipéptido de la invención y la coincidencia más estrecha con la secuencia del dominio VH de la línea germinal humana puede ser del 85% o mayor, del 90% o mayor, del 95% o mayor, del 97% o mayor, o hasta del 99% o incluso del 100%.

En una realización, el dominio VH del anticuerpo con alta homología humana puede contener una o más (por ejemplo, de 1 a 10) faltas de coincidencia de secuencia de aminoácidos a lo largo de las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3, y FR4, en comparación con la coincidencia más estrecha con la secuencia de VH humana.

5 En otra realización el dominio VL del anticuerpo con alta homología humana puede presentar una identidad de secuencia u homología de secuencia del 80% o mayor con uno o más dominios VL humanos a lo largo de las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 y FR4. En otras realizaciones la identidad de secuencia u homología de secuencia entre el dominio VL del polipéptido de la invención y la coincidencia más estrecha con la secuencia del dominio VL de la línea germinal humana puede ser del 85% o mayor, el 90% o mayor, el 95% o mayor, el 97% o mayor, o hasta el 99% o incluso el 100%.

10 En una realización el dominio VL del anticuerpo con alta homología humana puede contener una o más (por ejemplo de 1 a 10) faltas de coincidencia a lo largo de las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 y FR4, en comparación con la coincidencia más estrecha con la secuencia VL humana.

Antes de analizar el porcentaje de identidad de secuencia entre VH y VL del anticuerpo con alta homología humana y la línea germinal humana, se pueden determinar los plegamientos canónicos, que permiten la identificación de la familia de segmentos de la línea germinal humana con la combinación idéntica de plegamientos canónicos para H1 y H2 o L1 y L2 (y L3). Posteriormente el miembro de la familia de la línea germinal humana que tenía el grado más alto de homología de secuencia con la región variable del anticuerpo de interés se escoge para valorar la homología de secuencia. La determinación de las clases canónicas según Chothia de los bucles hipervariables L1, L2, L3, H1 y H2 se puede llevar a cabo con herramientas bioinformáticas disponibles públicamente en la página de internet www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html. El resultado del programa muestra las necesidades del resto clave en un archivo de datos. En estos archivos de datos, las posiciones de los restos clave se muestran con los aminoácidos permitidos en cada posición. La secuencia de la región variable del anticuerpo de interés se da como entrada y primero se alinea con una secuencia de anticuerpo de consenso para asignar el esquema de numeración de Kabat. El análisis de los plegamientos canónicos utiliza un grupo de matrices de restos clave que se derivan con un método automático desarrollado por Martin y Thornton (Martin et al., J. Mol. Biol. 263:800-815 (1996)).

30 Una vez que se conoce el segmento V de la línea germinal humana particular, que utiliza la misma combinación de plegamientos canónicos para H1 y H2 o L1 y L2 (y L3), se puede determinar el miembro de la familia con la mejor coincidencia en términos de homología de secuencia. Se puede determinar con herramientas bioinformáticas el porcentaje de identidad de secuencia entre las secuencias de aminoácidos de la región marco conservada de los dominios VL y VH del anticuerpo de interés y las secuencias correspondientes codificadas por la línea germinal humana, pero actualmente, se puede aplicar también un alineamiento manual de las secuencias. Las secuencias de inmunoglobulina humana se pueden identificar a partir de varias bases de datos proteicas, tal como VBase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) o la base de datos Pluckthun/Honegger (<http://www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germlines>). Para comparar las secuencias humanas con las regiones V de los dominios VH o VL en un anticuerpo de interés se puede utilizar un algoritmo de alineamiento tal como los disponibles por medio de páginas de internet como www.expasy.ch/tools/#align, pero también se puede llevar a cabo el alineamiento similar con un grupo de secuencias limitado. Se seleccionan las secuencias de la cadena pasada y ligera de la línea germinal humana de las familias con las mismas combinaciones de plegamientos canónicos y con el grado de homología más alto de las regiones marco conservadas 1, 2 y 3 de cada cadena y se comparan con la región variable de interés; también se comprueba la FR4 contra las regiones JH y JK o JL de la línea germinal humana.

50 Nótese que en el cálculo del porcentaje total de homología de secuencia los restos de FR1, FR2 y FR3 se evalúan utilizando la secuencia con la coincidencia más estrecha de la familia de la línea germinal humana con la combinación idéntica de plegamientos canónicos. Solamente los restos diferentes de la coincidencia más estrecha u otros miembros de la misma familia con la misma combinación de plegamientos canónicos se valoran (NB-excluyendo cualquier diferencia codificada por un cebador). Sin embargo, con fines de humanización, los restos de las regiones marco conservadas idénticas a los miembros de otras familias de la línea germinal humana, que no tienen la misma combinación de plegamientos canónicos, se pueden considerar "humanos", a pesar del hecho de que estas se valoran como "negativas" de acuerdo con las condiciones rigurosas descritas anteriormente. Esto se asume basándose en la estrategia de "mezcla y coincidencia" para la humanización en la que cada una de las FR1, FR2, FR3 y FR4 se compara por separado con su secuencia de coincidencia más estrecha de la línea germinal humana y por tanto la molécula humanizada contiene una combinación de FR diferentes según fue realizado por Qu y sus colegas (Qu et al., Clin. Cancer Res. 5:3095-3100 (1999)) y Ono y sus colegas (Ono et al., Mol. Immunol. 36:387-395 (1999)). Los límites de las regiones marco conservadas individuales se pueden asignar utilizando el esquema de numeración IMGT, que es una adaptación del esquema de numeración de Chothia (Lefranc et al., NAR 27: 209-212 (1999); <http://im-gt.cines.fr>).

65 Los anticuerpos con alta homología humana pueden comprender bucles hipervariables o CDR que tengan plegamientos canónicos humanos o tipo humanos, como se expone con detalle posteriormente. En una realización, al menos un bucle hipervariable o CDR en el dominio VH o el dominio VL del anticuerpo con alta homología humana

se puede obtener o derivar a partir de un dominio VH o VL de un anticuerpo no humano, por ejemplo un anticuerpo convencional de una especie de Camelidae, ya que presenta una estructura de plegamiento canónico actual o previsto que es sustancialmente idéntica a una estructura de plegamiento canónico que se produce en los anticuerpos humanos.

5 Se ha establecido bien en la técnica que aunque las secuencias de aminoácidos primarias de los bucles hipervariables presentes en los dominios VH y dominios VL codificados por la línea germinal humana son, por definición, altamente variables, todos los bucles hipervariables, excepto en la CDR H3 del dominio VH, adoptan solamente unas pocas conformaciones estructurales distintas, llamadas plegamientos canónicos (Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Tramontano et al. Proteins 6:382-94 (1989)), que dependen tanto de la longitud del bucle hipervariable y la presencia de los denominados restos de aminoácidos canónicos (Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las estructuras canónicas actuales de los bucles hipervariables en los dominios VH o VL intactos se pueden determinar por análisis estructural (por ejemplo, cristalografía de rayos X), pero también es posible prever la estructura canónica basándose en los restos de aminoácidos clave que son característicos de una estructura particular (expuesto más a fondo posteriormente). En esencia, el patrón específico de restos que determina cada estructura canónica forma una “firma” que hace posible que se reconozca la estructura canónica en los bucles hipervariables de un dominio VH o VL de estructura desconocida; las estructuras canónicas se pueden prever por lo tanto basándose en la secuencia de aminoácidos primaria sola.

20 Las estructuras de plegamiento canónico previstas para los bucles hipervariables de una secuencia VH o VL determinadas en un anticuerpo con alta homología humana se pueden analizar utilizando algoritmos que están disponibles públicamente en www.bio-inf.org.uk/abs/chothia.html, www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/antibodies.html y www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germlines/Vbase_hVh.html. Estas herramientas permiten indagar secuencias VH o VL que se van a alinear frente a secuencias de dominio VH o VL humanas de estructura canónica conocida, y se hace una predicción de la estructura canónica para los bucles hipervariables de la secuencia que se busca.

30 En el caso del dominio VH, los bucles H1 y H2 se pueden valorar como que tienen una estructura de plegamiento canónico “sustancialmente idéntica” a una estructura de plegamiento canónico conocida que existe en anticuerpos humanos si se cumplen al menos el primero, y preferentemente ambos, de los siguientes criterios:

1. Una longitud idéntica, determinada por el número de restos, con la clase estructural canónica humana con coincidencia más estrecha.
2. Al menos un 33% de identidad, preferentemente al menos un 50% de identidad con los restos de aminoácidos clave descritos para las clases estructurales canónicas H1 y H2 humanas correspondientes.

(nótese que para los fines del análisis anterior los bucles H1 y H2 se tratan por separado y cada uno se compara con su clase estructural canónica humana de coincidencia más estrecha).

40 Los análisis anteriores se basan en la predicción de la estructura canónica de los bucles H1 y H2 del anticuerpo de interés. Si las estructuras actuales de los bucles H1 y H2 en el anticuerpo de interés se conocen, por ejemplo basándose en cristalografía de rayos X, entonces los bucles H1 y H2 del anticuerpo de interés también se pueden valorar como que tienen una estructura de plegamiento canónica “sustancialmente idéntica” con una estructura de plegamiento canónico conocida que existe en anticuerpos humanos, si la longitud del bucle se diferencia de la clase estructural canónica humana de coincidencia más estrecha (típicamente por 61 o 62 aminoácidos) pero la estructura de los bucles H1 y H2 actuales en el anticuerpo de interés coincide con la estructura del plegamiento canónico humano.

50 Los restos de aminoácido claves que se encuentran en las clases estructurales canónicas humanas para el primer y segundo bucles hipervariables de los dominios VH humanos (H1 y H2) se describen en Chothia et al., J. Mol. Biol. 227:799-817 (1992). En particular, la tabla 3 de la página 802 de Chothia et al. enumera los restos de aminoácido preferidos y los sitios clave para las estructuras canónicas H1 que se encuentran en la línea germinal humana, mientras que en la Tabla 4 de la página 803, que también se incorpora específicamente por referencia, enumera los restos de aminoácidos preferidos en los sitios claves para las estructuras canónicas de CDR H2 que se encuentran en la línea germinal humana.

60 En una realización tanto H1 como H2 del dominio VH del dominio del anticuerpo con alta homología humana presenta una estructura de plegamiento canónico actual o prevista que es sustancialmente idéntica a la estructura de plegamiento canónico que existe en anticuerpos humanos.

65 Los anticuerpos con alta homología humana pueden comprender un dominio VH en el que los bucles hipervariables H1 y H2 forman una combinación de estructuras de plegamiento canónico que es idéntica a una combinación de estructuras canónicas que se sabe que existen en al menos un dominio VH de la línea germinal humana. Se ha observado que solo ciertas combinaciones de estructuras de plegamiento canónico en H1 y H2 existen actualmente en dominios VH codificados por la línea germinal humana. En una realización, los H1 y H2 del dominio VH del anticuerpo con alta homología humana se pueden obtener de un dominio VH de una especie no humana, por

ejemplo una especie de Camelidae, ya que forma una combinación de estructuras de plegamiento canónico prevista o actual que es idéntica a una combinación de estructuras de plegamiento canónico que se sabe que existe en un dominio VH de la línea germinal humana o mutada somáticamente. En realizaciones no limitantes los H1 y H3 del dominio VH del anticuerpo con alta homología humana se pueden obtener a partir de un dominio VH de una especie no humana, por ejemplo una especie de Camelidae, y forman una de las siguientes combinaciones de plegamiento 1-1, 1-2, 1-3, 1-6, 1-4, 2-1, 3-1 y 3-5.

Un anticuerpo con alta homología humana puede contener un dominio VH que presente tanto alta identidad/homología de secuencia con el VH humano, y que contiene bucles hipervariables que presentan una homología estructural con el VH humano.

Puede ser ventajoso que los plegamientos canónicos presentes en H1 y H2 del dominio VH del anticuerpo con alta homología humana, y la combinación de los mismos, estén "conectados" con la secuencia de VH de la línea germinal humana que representa la coincidencia más estrecha con el dominio VH del anticuerpo con alta homología humana en términos de identidad total de secuencia de aminoácidos. A modo de ejemplo, si la coincidencia de secuencia más estrecha es con el dominio VH3 de la línea germinal humana, entonces puede ser ventajoso que H1 y H2 formen una combinación de plegamientos canónicos como la que existe naturalmente en un dominio VH3 humano. Esto puede ser particularmente importante en el caso de anticuerpos con alta homología humana que se deriva de especies no humanas, por ejemplo, los anticuerpos que contienen dominios VH y VL que se derivan de anticuerpos de camélidos convencionales, especialmente anticuerpos que contienen dominios VH y VL de camélidos humanizados.

Por lo tanto, en una realización el dominio VH del anticuerpo c-Met con alta homología humana puede presentar una identidad de secuencia u homología de secuencia del 80% o mayor, del 85% o mayor, del 90% o mayor, del 95% o mayor, del 97% o mayor, o hasta del 99% o incluso del 100% con un dominio VH humano a lo largo de las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 y FR4, y además se obtienen el H1 y H2 en el mismo anticuerpo a partir de un dominio VH no humano (por ejemplo, derivado de una especie de Camelidae), pero que forma una combinación de estructuras de plegamiento canónicas actuales o previstas que es la misma que una combinación de plegamiento canónico que se sabe que existe naturalmente en el mismo dominio VH humano.

En otras realizaciones, L1 y L2 del dominio VL del anticuerpo con alta homología humana se obtienen cada uno de un dominio VL de una especie no humana (por ejemplo, del dominio VL derivada de camélidos), y presenta cada una, una estructura de plegamiento canónico actual o previsto que es sustancialmente idéntica a la estructura de plegamiento canónico que se produce en anticuerpos humanos.

Como con los dominios VH, los bucles hipervariables de los dominios VL de ambos tipos V Lambda y V Kappa pueden adoptar un número limitado de conformaciones o estructuras canónicas, determinadas en parte por la longitud y también por la presencia de restos de aminoácido clave en ciertas posiciones canónicas.

En un anticuerpo de interés que tiene una alta homología humana, los bucles L1, L2 y L3 del dominio VL de una especie no humana, por ejemplo, una especie de Camelidae, se puede valorar como que tiene una estructura de plegamiento canónico "sustancialmente idéntica" a una estructura de plegamiento canónico que se sabe que existe en anticuerpos humanos si se cumplen al menos el primero, y preferentemente en ambos, de los siguientes criterios:

1. Una longitud idéntica, que se determina por el número de restos, respecto a la clase estructural humana de coincidencia más estrecha.

2. Al menos un 33% de identidad, preferentemente al menos un 50% de identidad con los restos de aminoácido clave descritos para las correspondientes clases estructurales canónicas L1 o L2 humanas, del repertorio V Lambda o V Kappa.

(nótese que para los fines de los análisis anteriores los bucles L1 y L2 se tratan por separado y cada uno se compara con su clase estructural canónica humana de coincidencia más estrecha).

El análisis anterior se basa en la predicción de la estructura canónica de los bucles L1, L2 y L3 en el dominio VL del anticuerpo de interés. Si la estructura actual de los bucles L1, L2 y L3 se conoce, por ejemplo basándose en cristalografía de rayos X, entonces los bucles L1, L2 o L3 que se derivan del anticuerpo de interés pueden valorarse también como que tienen una estructura de plegamiento canónica "sustancialmente idéntica" a una estructura de plegamiento canónico que se sabe que existe en anticuerpos humanos si la longitud del bucle se diferencia del de la clase estructural canónica humana de coincidencia más estrecha (típicamente por 61 o 62 aminoácidos) pero la estructura actual de los bucles de Camelidae coincide con el plegamiento canónico humano.

Los restos de aminoácidos clave que se encuentran en las clases estructurales canónicas humanas para las CDR de los dominios V Lambda y V Kappa humanos se describen en Morea et al. *Methods*, 20: 267-279 (2000) y Martin et al., *J. Mol. Biol.*, 263:800-815 (1996). El repertorio estructural del dominio V Kappa humano también se describe en Tomlinson et al. *EMBO J.* 14:4628-4638 (1995), y la del dominio V Lambda en Williams et al. *J. Mol. Biol.*,

264:220-232 (1996).

L1 y L2 del dominio VL de un anticuerpo con alta homología humana pueden formar una combinación de estructuras de plegamiento canónico actual o previsto que sea idéntica a la combinación de estructuras de plegamiento canónicas que se sabe que existen en un dominio VL de la línea germinal humana. En realizaciones no limitantes L1 y L2 del dominio V Lambda de un anticuerpo con alta homología humana (por ejemplo, un anticuerpo que contiene un dominio VL derivado de camélidos o una variante humanizada del mismo) puede formar una de las siguientes combinaciones de plegamiento canónicas: 11-7, 13-7(A, B, C), 14-7(A, B), 12-11, 14-11 y 12-12 (como se define en Williams et al. J. Mol. Biol. 264:220-32 (1996) y como se muestra en http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase_hVL.html). En realizaciones no limitantes los L1 y L2 del dominio V Kappa pueden formar una de las siguientes combinaciones de plegamiento canónico: 2-1, 3-1, 4-1 y 6-1 (como se define en Tomlinson et al. EMBO J. 14:4628-38 (1995) y como se muestra en http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase_hVK.html).

En una realización adicional, los tres L1, L2 y L3 del dominio VL de un anticuerpo con alta homología humana puede presentar una estructura sustancialmente humana. Se prefiere que el dominio VL del anticuerpo con alta homología humana presente alta identidad/homología de secuencia con el VL humano, y también que los bucles hipervariables del dominio VL presenten homología estructural con el VL humano.

En una realización, el dominio VL del anticuerpo c-Met con alta homología humana puede presentar una identidad de secuencia del 80% o mayor, del 85% o mayor, del 90% o mayor, del 97% o mayor, o hasta del 99% o incluso del 100% con un dominio VL humano a lo largo de las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 y FR4, y además el bucle hipervariable L1 y el bucle hipervariable L2 pueden formar una combinación de estructuras de plegamiento canónico actual o prevista que sea la misma que la combinación de plegamiento canónico que se sabe que existe naturalmente en el mismo dominio VL humano.

Por supuesto se concibe que los dominios VH que presentan alta identidad de secuencia/homología de secuencia con el VH humano y también homología estructural con los bucles hipervariables del VH humano se combinarán con los dominios VL que presentan una alta identidad de secuencia/homología de secuencia con el VL humano, y también una homología estructural con bucles hipervariables de VL humano para proporcionar anticuerpos con alta homología humana que contienen parejas de VH/VL (por ejemplo, emparejamientos VH/VL derivados de camélidos) con máxima homología de secuencia y estructural con los emparejamientos VH/VL codificados en seres humanos.

“Antagonista estricto” – Como se define en el presente documento, un “antagonista estricto” de la activación del receptor c-Met mediada por el HGF tiene las siguientes propiedades: (1) es un antagonista de la activación del receptor c-Met mediada por HGF, y (2) no presenta una actividad agonista intrínseca significativa.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “antagonista de la activación del receptor c-Met mediada por HGF” se refiere a una molécula, tal como un anticuerpo c-Met, que es capaz de inhibir la activación/señalización de c-Met dependiente de HGF en un sistema de ensayo apropiado. Los anticuerpos antagonistas eficaces pueden ser capaces de inhibir al menos un 50%, al menos un 60%, o al menos un 70%, o al menos un 75%, o al menos un 80% del efecto máximo de HGF en al menos un sistema de ensayo capaz de detectar la activación o señalización de c-Met dependiente de HGF, que incluyen por ejemplo un ensayo de fosforilación de c-Met dependiente de HGF, o un ensayo de inducción de proliferación celular tumoral por HGF, ensayos de supervivencia celular, etc. Un anticuerpo c-Met que se proporciona en el presente documento puede reconocerse como un antagonista potente de la activación del receptor c-Met mediada por HGF si la actividad antagonista que se obtiene es al menos tan potente como la que se obtiene con el anticuerpo de referencia c224G11 (como se describe en el documento WO 2009/007427), cuyo anticuerpo de referencia es un anticuerpo quimérico murino-humano del isotipo IgG1 que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 43 y el dominio variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 44 y una región constante humana que no tiene la bisagra modificada, es decir, que comprende la región bisagra de tipo silvestre de IgG1 humana.

Como se utiliza en el presente documento “actividad agonista intrínseca” de un anticuerpo c-Met se refiere a la capacidad del anticuerpo para activar el receptor c-Met en ausencia del ligando HGF. La actividad agonista intrínseca se puede ensayar en un sistema de ensayo adecuado, por ejemplo, un ensayo de fosforilación de c-Met en presencia y ausencia de HGF. En una realización, un anticuerpo presenta “actividad agonista intrínseca significativa” si el efecto agonista producido en ausencia de HGF es mayor del 20%, o mayor del 16% del efecto máximo de HGF en el mismo sistema de ensayo. Por el contrario, se considera que un anticuerpo c-Met no presenta actividad agonista intrínseca significativa si el efecto agonista producido en ausencia de HGF es menor del 20%, o menor del 16% o menor del 10%, o menor del 5% del efecto máximo de HGF en el mismo sistema de ensayo. A modo de ejemplo, la actividad antagonista y la actividad agonista intrínseca de un anticuerpo c-Met se puede evaluar llevando a cabo un ensayo de dispersión celular, en presencia o ausencia de HGF. Los anticuerpos “antagonistas estrictos”, es decir, que carecen de actividad agonista intrínseca significativa, producirán típicamente un efecto de dispersión no detectable en ausencia de HGF, pero presentará una fuerte inhibición de la dispersión inducida por HGF en el mismo sistema de ensayo. La actividad agonista intrínseca también se puede evaluar utilizando el ensayo

de fosforilación descrito en el Ejemplo 9 de la presente solicitud. El anticuerpo c-Met presenta preferentemente menos del 20% del efecto máximo de HGF en este sistema de ensayo.

5 También se considera que los anticuerpos proporcionados en el presente documento no presentan actividad agonista intrínseca si el efecto agonista que se produce en ausencia de HGF es igual o menor que el que se obtiene con el anticuerpo de referencia c224G11 (como se describe en el documento WO 2009/007427), cuyo anticuerpo de referencia es un anticuerpo quimérico murino-humano del isotipo IgG1 que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID NO: 43 y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 44 y una región constante humana que no tiene modificada la bisagra, es decir, que comprende la región bisagra de tipo silvestre de la IgG1 humana.

15 Como se ha resumido anteriormente, la invención se refiere a anticuerpos aislados (que pueden ser anticuerpos monoclonales) que tienen alta homología humana que se unen específicamente a un receptor proteico c-Met humano, donde los anticuerpos son antagonistas estrictos de la activación del receptor c-Met mediada por HGF. Las propiedades y características de los anticuerpos c-Met, y fragmentos de anticuerpo, de acuerdo con la invención se describirán ahora con mayor detalle.

20 **Afinidad y unión de c-Met**

Los anticuerpos que tienen alta homología humana que se unen específicamente al receptor proteico c-Met humano típicamente presentarán una afinidad de unión (K_D) para el c-Met humano, y más particularmente el dominio extracelular del c-Met humano, de aproximadamente 10 nM o menos, o 1 nM o menos, o 0,1 nM o menos, o 10 pM o menos, y puede presentar una velocidad de disociación para la unión del c-Met humano de 10^{-3} s^{-1} o menos, o 10^{-4} s^{-1} o menos. La afinidad de unión (K_D) y la velocidad de disociación (k_{off}) se puede medir utilizando técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica, tal como por ejemplo por resonancia de plasmones superficiales (BIAcore), como se describe en los ejemplos adjuntos.

30 Los anticuerpos c-Met descritos en el presente documento presentan una especificidad de unión a c-Met humano, y más específicamente al dominio extracelular de c-Met humano, pero no se excluye la reactividad cruzada con homólogos de c-Met no humanos. La afinidad de unión que presenta con homólogos de c-Met de primates no humanos (por ejemplo, c-Met de macaco Rhesus) es típicamente de 1-10, por ejemplo de 5-10 veces menor que la afinidad de unión por el c-Met humano.

35 **Propiedades antagonistas/agonistas**

Como se describe en otro sitio, los anticuerpos c-Met que se proporcionan en el presente documento son "antagonistas estrictos" de la activación del receptor c-Met humano mediada por HGF, de acuerdo con la definición que se ha dado anteriormente. Los anticuerpos presentan un potente antagonismo de la activación de c-Met mediada por HGF con una mínima actividad agonista. Este equilibrio entre la alta actividad antagonista y la mínima actividad agonista intrínseca es crítica para la utilidad terapéutica de los anticuerpos c-Met, ya que se había demostrado anteriormente (documento WO 2010/069765) que la pérdida de la actividad antagonista *in vitro* que se acompaña por la ganancia de actividad agonista en la forma quimérica del anticuerpo 224G11 monoclonal murino puede dar como resultado una pérdida significativa de la actividad antagonista *in vivo*.

45 Se han descrito muchos ensayos *in vitro* e *in vivo* adecuados para ensayar el antagonismo de la activación de c-Met mediada por HGF y/o la actividad agonista de los anticuerpos c-Met en la técnica y estarían fácilmente disponibles para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, los documentos WO 2010/059654, WO 2009/07427, WO 2010/069765, Pacchicina et al., JBC, manuscrito M110.134031, Septiembre 2010). Los ensayos adecuados incluyen, por ejemplo, el ensayo de dispersión, el ensayo de cicatrización de heridas, el ensayo de proliferación, ensayo de fosforilación de c-Met, ensayo de morfogénesis de ramificación y ensayos basados en inhibición del crecimiento/apoptosis.

55 **Inhibición de la activación de c-Met independiente de HGF**

Los anticuerpos c-Met que se proporcionan en el presente documento pueden tener la capacidad de inhibir la activación del receptor c-Met independiente de HGF. Los ensayos *in vitro* adecuados para ensayar la activación del receptor c-Met independiente de HGF se describen en los ejemplos adjuntos.

60 En realizaciones particulares, los anticuerpos c-Met pueden inhibir la activación del receptor c-Met independiente de HGF, y más específicamente puede inhibir la fosforilación de c-Met independiente de HGF, en la línea celular de carcinoma gástrico humano MKN-45. En realizaciones particulares, el anticuerpo c-Met puede presentar al menos un 40%, o al menos un 50%, o al menos un 60%, o al menos un 70% o al menos un 80% de inhibición de la activación del receptor c-Met independiente de HGF. Más específicamente, el anticuerpo c-Met puede presentar al menos un 40%, o al menos un 50%, o al menos un 60%, o al menos un 70%, o al menos un 80% de inhibición de la autofosforilación de c-Met independiente de HGF, según se mide por el ensayo de fosforilación, por ejemplo, el

ensayo de fosforilación descrito en el presente documento llevado a cabo en la línea celular de carcinoma gástrico humano MKN-45.

5 El anticuerpo c-Met debería preferentemente presentar al menos la misma potencia que el anticuerpo c224G11 de referencia y debería preferentemente presentar una inhibición más potente de la activación (autofosforilación) independiente de HGF que el anticuerpo c224G11 de referencia, particularmente cuando se mide con el ensayo de fosforilación en células MKN-45. Ciertos anticuerpos c-Met que se proporcionan en el presente documento, en particular los que comprenden los dominios de unión al antígeno de 36C4, y las variantes de la línea germinal de los mismos, demuestran ser inhibidores más potentes de la autofosforilación de c-Met independiente de HGF que el anticuerpo c224G11 de referencia, mientras que siguen presentando un antagonismo comparable (o mejor) de la activación de c-Met dependiente de HGF que el anticuerpo c224G11 de referencia y menores niveles de actividad agonista intrínseca que el anticuerpo c224G11 de referencia. Como se ha señalado en otro sitio del presente documento, el anticuerpo c224G11 de referencia (como se describe en el documento WO 2009/007427) es un anticuerpo quimérico murino-humano del isotipo IgG1 que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 43 y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 44 y una región constante humana que no tiene la bisagra modificada, es decir, que comprende la región bisagra de tipo silvestre de la IgG1 humana.

20 Los anticuerpos c-Met proporcionados en el presente documento también presentan sustancialmente una inhibición más potente de la autofosforilación de c-Met independiente de HGF que el anticuerpo de referencia 5D5, que no presenta ninguna inhibición en este sistema de ensayo.

Inhibición de la dimerización de c-Met

25 Los anticuerpos c-Met proporcionados en el presente documento presentan preferentemente la capacidad para inhibir la dimerización de los receptores c-Met, y más particularmente la capacidad de inhibir la homodimerización y/o la heterodimerización de los receptores unidos a la membrana presentes en la superficie celular de células tumorales. La capacidad para inhibir la dimerización de c-Met puede ser útil en el tratamiento de los cánceres asociados a c-Met. La capacidad para inhibir la dimerización de c-Met es relevante para la utilidad de los anticuerpos c-Met, ya que los anticuerpos que inhiben la dimerización de c-Met pueden ser útiles en el tratamiento de cánceres asociados a c-Met independiente de HGF, además de los cánceres con c-Met activado dependiente de HGF. La heterodimerización de c-Met se expone en Trusolino et al., Nature Reviews, Molecular Cell Biology., 2010, 11: 834-848.

35 Los ensayos adecuados para ensayar la capacidad de los anticuerpos c-Met para inhibir la dimerización se han descrito en la técnica y estarían fácilmente disponibles para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, los documentos WO 2009/07427 y WO 2010/069765).

40 En realizaciones particulares, los anticuerpos c-Met pueden presentar la inhibición de la dimerización de c-Met en una línea celular "adicta a Met", tal como por ejemplo, las células EBC-1. En particular, los anticuerpos c-Met pueden presentar al menos un 20%, o al menos un 25%, o al menos un 30%, o al menos un 35%, o al menos un 40%, o al menos un 45%, o al menos un 50% de inhibición de la (homo)dimerización de c-Met en una línea celular adicta a c-Met, tal como las células EBC-1. El fenotipo de "adicción a Met" existe en las líneas celulares que presentan una amplificación cromosómica del oncogén MET, como se describe en Smolen et al, PNAS, vol. 103, pp. 2316-2321, 2006.

Regulación negativa de la expresión de la proteína c-Met de la superficie celular

50 Los anticuerpos c-Met proporcionados en el presente documento, preferentemente no inducen una regulación negativa significativa de la proteína c-Met humana de la superficie celular. La capacidad de un determinado anticuerpo c-Met para inducir la regulación negativa de la proteína c-Met humana de la superficie celular puede evaluarse utilizando citometría de flujo en una línea celular que expresa c-Met, tal como por ejemplo MKN-45. En una realización, se consideran que los anticuerpos c-Met proporcionados en el presente documento no inducen una regulación negativa significativa de la proteína c-Met humana de la superficie celular si inducen menos de un 20%, o menos de un 15%, o menos de un 10%, o menos de un 5% de regulación negativa de proteína c-Met en este sistema de ensayo. También se considera que los anticuerpos c-Met proporcionados en el presente documento no inducen regulación negativa significativa de la proteína c-Met humana de la superficie celular si inducen la misma o menos regulación negativa de la proteína c-Met que el anticuerpo c224G11 de referencia que se describe en el presente documento.

60 Los anticuerpos c-Met que no inducen una regulación negativa significativa de la proteína c-Met de la superficie celular pueden ser particularmente adecuados para las aplicaciones terapéuticas que se benefician de la función efectora del anticuerpo, es decir ADCC, CDC, ADCP, y en particular del *aumento* de la función efectora. Los anticuerpos c-Met que no inducen una regulación negativa significativa de la proteína c-Met de la superficie celular no se internalizan, y además pueden permanecer unidos al c-Met de la superficie celular durante significativamente más tiempo que los anticuerpos c-Met que se internalizan. Una tasa reducida de internalización (o la falta de internalización significativa) es una ventaja distintiva de los anticuerpos c-Met que presentan una función efectora por medio de al

menos uno de entre ADCC, CDC, o ADCP. Por lo tanto, los anticuerpos c-Met descritos en el presente documento que presentan una función efectora (o aumento de la función efectora) y que no inducen una regulación negativa significativa de la proteína c-Met de la superficie celular pueden ser particularmente ventajosos para ciertas aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, tratamiento de cánceres que se beneficia de la función efectora.

5

Epítomos c-Met

Los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a epítomos en el dominio extracelular de c-Met humano y bloquean la unión de HGF al dominio extracelular de c-Met, en varios grados.

10

La capacidad de los anticuerpos c-Met proporcionados en el presente documento para bloquear la unión de HGF a c-Met puede medirse por medio de un ensayo de competición. Típicamente, los anticuerpos c-Met bloquean la unión de HGF a c-Met con una CI_{50} de 0,5 nM o menos.

15

El término “epítopo” se refiere a una disposición específica de aminoácidos localizados en un péptido o proteína a la que se une un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Los epítomos a menudo consisten en un agrupamiento de moléculas de superficie químicamente activos tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, y tiene características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas. Los epítomos pueden ser lineales, es decir, que impliquen la unión a una secuencia única de aminoácidos, o conformacional, es decir, que impliquen la unión a dos o más secuencias de aminoácidos en varias regiones del antígeno que pueden no estar necesariamente contiguas.

20

Los anticuerpos c-Met que se proporcionan en el presente documento se unen a epítomos en el dominio SEMA del c-Met humano. El dominio SEMA está contenido en los restos de aminoácido 1-491 de la proteína c-Met humana madura (que carece de secuencia de señal, como se muestra en la Figura 25) y se ha reconocido en la técnica que contiene un sitio de unión para el ligando de c-Met, el HGF.

25

Los anticuerpos c-Met que se proporcionan en el presente documento se unen a un epítopo en el péptido 98-VDTYYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPNHHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGN TINSSYFPKHLPLHSISVRRLLKTK-199 del c-Met humano (SEQ ID NO: 181). En particular, el anticuerpo denominado 36C4, y las variantes alineadas germinalmente y variantes de afinidad del mismo, se unen a un epítopo en la región peptídica del dominio SEMA. Esta región del dominio SEMA es significativa ya que se sabe que contiene un sitio de unión para el ligando HGF de c-Met. Son particularmente ventajosos los anticuerpos c-Met, por ejemplo, los anticuerpos que comprenden las regiones de unión al antígeno de 36C4 o una de las variantes alineadas germinalmente o de afinidad del mismo, que se une a este epítopo peptídico en el dominio SEMA del c-Met humano y que no induce una regulación negativa significativa de la proteína c-Met de la superficie celular. Dichos anticuerpos pueden presentar además una o más funciones efectoras seleccionadas de entre ADCC, CDC y ADCP, o un aumento de funciones efectoras.

30

35

Anticuerpos c-Met derivados de camélidos

Los anticuerpos de la invención pueden comprender al menos un bucle hipervariable o región determinante de complementariedad que se obtiene de un dominio VH o un dominio VL de una especie de la familia Camelidae, tal como los dominios VH y/o VL, o CDR de la misma, que se obtiene por inmunización activa de camélidos exogámicos, por ejemplos llamas, con un antígeno c-Met humano.

40

Con “bucle hipervariable o región determinante de complementariedad obtenidos de un dominio VH o un dominio VL de una especie de la familia Camelidae” se quiere significar que el bucle hipervariable (HV) o CDR tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de un bucle hipervariable o CDR que está codificada por un gen de inmunoglobulina de camélido. En este contexto, “gen de inmunoglobulina” incluye los genes de la línea germinal, genes de inmunoglobulina que se han sometido a una reordenación, y también los genes mutados somáticamente. Por lo tanto, la secuencia de aminoácido del HV o CDR que se obtiene de un dominio VH o VL de una especie de Camelidae puede ser idéntica a la secuencia de aminoácidos de un HV o CDR presente en un anticuerpo convencional de camélido maduro. La expresión “obtenido de” en este contexto implica una relación estructural en el sentido de que los HV o CDR del anticuerpo c-Met constituye una secuencia de aminoácidos (o variantes menores de la misma) que se codificó originalmente por un gen de inmunoglobulina de camélido. Sin embargo, esto no implica necesariamente una relación particular en términos del proceso de producción utilizado para preparar el anticuerpo c-Met.

50

55

60

Los anticuerpos c-Met de camélidos puede derivarse de cualquier especie de camélido, incluyendo *inter alia*, llama, dromedario, vicuña, guanaco o camello.

65

Los anticuerpos c-Met que comprenden dominios VH y VL derivados de camélidos, o CDR de los mismos, típicamente son polipéptidos que se expresan recombinantemente, y pueden ser polipéptidos quiméricos. La expresión “polipéptido quimérico” se refiere a un polipéptido artificial (de origen no natural) que se crea por la yuxtaposición de dos o más fragmentos de péptidos que de otra manera no existen de manera contigua. Se incluye

en esta definición “especies” de polipéptidos quiméricos que se crean por yuxtaposición de fragmentos de péptido que se codifican por dos o más especies, por ejemplo, camélido y ser humano.

5 Las CDR derivadas de camélidos pueden comprender una de las secuencias CDR que se muestran como SEQ ID NO: 19, 20, 21, 83 o 84 (CDR de cadena pesada) o una de las secuencias de CDR que se muestran como SEQ ID NO: 31-33 o 144-148 (CDR de cadena ligera).

10 En una realización, el dominio VH y/o el dominio VL completos se pueden obtener de una especie de la familia Camelidae. En realizaciones específicas, el dominio VH derivado de camélido puede comprender la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 51 u 88, mientras que el dominio VL derivado de camélido puede comprender la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID NO: 55 o 158-164. El dominio VH derivado de camélido y/o el dominio VL derivado de camélido se pueden entonces someter a modificación proteica, en la que se introducen sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de camélido. Estos cambios de la modificación incluyen preferentemente sustituciones de aminoácidos relativos a la secuencia de camélido. Dichos cambios incluyen la “humanización” o “alineamiento germinalmente” en los que uno o más restos de aminoácidos de un dominio VH o VL codificados en camélidos se sustituyen con restos equivalentes de un dominio homólogo VH o VL codificado en seres humanos.

20 Los dominios VH y VL aislados de camélido que se obtienen por inmunización activa de un camélido (por ejemplo, llama) con un antígeno c-Met humano se pueden utilizar como una base para modificar polipéptidos de unión al antígeno de acuerdo con la invención. Comenzando con dominios VH y VL de camélido intactos, es posible modificar una o más sustituciones, inserciones o eliminaciones que parten de la secuencia de camélido de partida. En ciertas realizaciones, dichas sustituciones, inserciones o eliminaciones pueden estar presentes en las regiones marco conservadas del dominio VH y/o el dominio VL. El fin de dichos cambios en la secuencia de aminoácidos primaria pueden ser para reducir presumiblemente las propiedades desfavorables (por ejemplo, inmunogenicidad en un huésped humano (denominado humanización), sitios de potencial heterogenicidad y/o inestabilidad del producto (glicosilación, desamidación, isomerización, etc.) o para aumentar alguna propiedad favorable distinta de la molécula (por ejemplo, solubilidad, estabilidad, biodisponibilidad, etc.). En otras realizaciones los cambios en la secuencia de aminoácidos primaria se pueden modificar en uno o más bucles hipervariables (o CDR) de un dominio VH y/o VL de camélido que se obtienen por inmunización activa. Dichos cambios se pueden introducir con el fin de aumentar la afinidad y/o especificidad de unión al antígeno, o para reducir propiedades presumiblemente desfavorables, por ejemplo, la inmunogenicidad en un huésped humano (denominado humanización), sitios de potencial heterogenicidad o inestabilidad, glicosilación, desamidación, isomerización, etc., o para aumentar algunas otras propiedades favorables de la molécula, por ejemplo, solubilidad, estabilidad, biodisponibilidad, etc.

35 Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona una variante de anticuerpo c-Met que contiene al menos una sustitución de aminoácidos en al menos una región marco conservada o una región CDR del dominio VH o el dominio VL en comparación con un dominio VH o VL derivado de camélido, ejemplos de los cuales incluyen pero no se limitan a los dominios VH de camélido que comprenden secuencias de aminoácidos que se muestran como SEQ ID NO: 51 o 88, y los dominios de camélido que comprenden las secuencias de aminoácidos que se muestran como SEQ ID NO: 55 o 158-164.

45 En otras realizaciones, se proporcionan moléculas de anticuerpo “quiméricas” que comprenden dominios VH y VL derivados de camélido (o variantes modificadas de los mismos) y uno o más dominios constantes de un anticuerpo no de camélido, por ejemplo dominios constantes codificados por el ser humano (o variantes modificadas de los mismos). En dichas realizaciones, se prefiere que tanto el dominio VH como el dominio VL se obtengan de la misma especie de camélido, por ejemplo ambos VH y VL pueden ser de *Lama glama* o ambos VH y VL pueden ser de *Lama pacos* (antes de la introducción de la variación con la secuencia de aminoácidos modificada). En dichas realizaciones tanto el dominio VH como el dominio VL pueden derivarse de un único animal, particularmente un único animal que se ha inmunizado activamente con un antígeno c-Met humano.

50 Como alternativa a los cambios de la modificación en la secuencia de aminoácidos primaria de los dominios VH y/o VL de Camelidae, se pueden aislar bucles hipervariables o CDR derivados de camélido individuales, o combinaciones de los mismos, de los dominios VH/VL de camélidos y transferirse en una región marco conservada alternativa (es decir, no de camélido), por ejemplo una región marco conservada VH/VL humana, por injerto de CDR. En particular, las realizaciones, no limitantes, de CDR derivadas de camélido se pueden seleccionar de entre CDR que tienen secuencias de aminoácidos que se muestran como SEQ ID NO: 19, 20, 21, 83 o 84 (CDR de cadena pesada) o CDR que tienen secuencias de aminoácidos que se muestran como SEQ ID NO: 31-33 o 144-148 (CDR de cadena ligera).

60 Los anticuerpos c-Met que comprenden dominios VH y VL derivadas de camélidos, o CDR de los mismos, pueden tener varias realizaciones diferentes en las que tanto el dominio VH como el dominio VL están presentes. El término “anticuerpo” en el presente documento se utiliza en su sentido más amplio y engloba, pero no se limita a, anticuerpos monoclonales, (que incluyen los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), siempre que presenten la especificidad inmunológica adecuada contra una proteína c-Met humana. La expresión “anticuerpo monoclonal”

como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, que se dirigen contra un único sitio antigénico. Además, al contrario que con las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos) en el antígeno, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante o epítomo del antígeno.

“Fragmentos de anticuerpo” comprende una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente el dominio de unión al antígeno o variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fab biespecíficos, y Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento de cadena sencilla variable (scFv), anticuerpos de dominio y anticuerpos multispecíficos formados por fragmentos de anticuerpo (véase Holliger y Hudson, *Nature Biotechnol.* 23:1126-36 (2005)).

En realizaciones no limitantes, los anticuerpos c-Met que comprenden dominios VH y VL derivados de camélidos, o CDR de los mismos, puede comprender dominios CH1 y/o dominios CL, cuya secuencia de aminoácidos es completamente o sustancialmente humana. Cuando el polipéptido de unión al antígeno de la invención es un anticuerpo que se pretende utilizar en terapéutica humana, es típico que la región constante completa del anticuerpo, al menos una parte de la misma, tenga una secuencia de aminoácidos completamente o sustancialmente humana. Por lo tanto, una o más o cualquier combinación del dominio CH1, región bisagra, dominio CH2, dominio CH3 y dominio CL (y dominio CH4 si está presente) pueden ser completamente o sustancialmente humanos con respecto a su secuencia de aminoácidos.

Ventajosamente, el dominio CH1, región bisagra, dominio CH2, dominio CH3 y dominio CL (y dominio CH4 si está presente) pueden tener una secuencia de aminoácidos completamente o sustancialmente humana. En el contexto de la región constante de un anticuerpo humanizado o quimérico, o un fragmento de anticuerpo, la expresión “sustancialmente humano” se refiere a una identidad de secuencia de al menos un 90%, o al menos un 95%, o al menos un 97%, o al menos un 99% con una región constante humana. La expresión “secuencia de aminoácidos humana” en este contexto se refiere a una secuencia de aminoácidos que está codificada por un gen de inmunoglobulina humano, que incluye los genes de la línea germinal, reordenados y mutados somáticamente. La invención también contempla polipéptidos que comprenden dominios constantes de una secuencia “humana” que se ha alterado, por una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia humana, exceptuando las realizaciones en las que la presencia de una región “completamente humana” se requiere expresamente.

La presencia de una región bisagra “completamente humana” en los anticuerpos c-Met de la invención puede ser beneficiosa tanto para minimizar la inmunogenicidad como para optimizar la estabilidad del anticuerpo.

Como se expone en otro sitio del presente documento, se contempla que se puedan hacer una o más sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos en la región constante de la cadena pesada y/o ligera, particularmente en la región Fc. Las sustituciones de aminoácidos pueden dar como resultado la sustitución del aminoácido sustituido con un aminoácido diferente de origen natural, o con un aminoácido no natural o modificado. También se permiten otras modificaciones estructurales, tales como por ejemplo cambios en el patrón de glicosilación (por ejemplo, la adición o eliminación de sitios de glicosilación unidos a N u O). Dependiendo del uso que se pretenda del anticuerpo, puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a sus propiedades de unión a receptores Fc, por ejemplo para modular la función efectora. Por ejemplo, se puede introducir un resto(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o un aumento de la destrucción celular mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Véase Caron et al., *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. *Immunol.* 148:2918-2922 (1992). De manera alternativa, un anticuerpo c-Met puede modificarse para que tenga regiones Fc duales y por lo tanto puede tener aumentadas las capacidades de lisis por complemento y ADCC. Véase Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989). La invención contempla también inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterápico, toxina (por ejemplo, un radioconjugado). Las regiones Fc también pueden modificarse para la extensión de la semivida, como describen Chan y Carter, *Nature Reviews: Immunology*, Vol.10, pp 301-316, 2010.

Las variantes de anticuerpo c-Met en los que la región Fc está modificada por modificación proteica, como se describe en el presente documento, también pueden presentar una mejora de la eficacia (por ejemplo, en el tratamiento del cáncer) en comparación con un anticuerpo equivalente (es decir, propiedades de unión al antígeno equivalente) sin la modificación de Fc.

En otra realización más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos.

En otra realización más, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede producir un anticuerpo aglicosilado (es decir, un anticuerpo que carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno c-Met diana. Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden conseguir, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación en la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de las regiones marco conservadas de la región variable, para de esta manera eliminar la glicosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

También se conciben variantes de anticuerpos c-Met que tienen un tipo de glicosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de restos fucosilo o un anticuerpo no fucosilado (como se describe en Natsume et al., *Drug Design Development and Therapy*, Vol. 3, pp. 7-16, 2009) o un anticuerpo que tiene un aumento de estructuras bisectoriales GlcNac. Se ha demostrado que dichos patrones de glicosilación alterados aumentan la actividad ADCC de los anticuerpos, que producen típicamente un aumento de 10 veces de ADCC con respecto a un anticuerpo equivalente que comprende un dominio Fc nativo humano. Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden conseguir, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con una maquinaria enzimática de glicosilación alterada (como se describe en Yamane-Ohnuki y Satoh, *mAbs* 1:3, 230-236, 2009).

Otra realización más, los anticuerpos c-Met pueden carecer de función efectora, debido a que la parte Fc del anticuerpo es de un isotipo que carece naturalmente de función efectora, o presenta una función efectora significativamente menos potente que la IgG1 humana, por ejemplo la IgG2 humana o la IgG4 humana, o debido a que la parte Fc del anticuerpo se ha modificado para reducir o eliminar sustancialmente la función efectora, como se describe en Armour, K. L., et al., *Eur. J. Immunol.*, 1999, 29: 2613-2624.

En otras realizaciones más la parte Fc del anticuerpo c-Met se puede modificar para facilitar la formación preferente de anticuerpos biespecíficos, en la que dos cadenas pesadas de anticuerpo que comprenden diferentes dominios variables se emparejan para formar la parte Fc del anticuerpo biespecífico. Ejemplos de dichas modificaciones incluyen las modificaciones "botón en ojal" descritas en Ridgway JB, Presta LG, Carter P., la modificación "botón en ojal" de los dominios CH3 de anticuerpo para la heterodimerización de cadena pesada. *Protein Eng. Jul 1996; 9(7):617-21* y Merchant AM, Zhu Z, Yuan JQ, Goddard A, Adams CW, Presta LG, Carter P. An efficient route to human bispecific IgG. *Nat Biotechnol. Jul 1998; 16(7):677-81*.

La invención puede, en ciertas realizaciones, englobar anticuerpos quiméricos camélido/humano, y en particular anticuerpos quiméricos en los que los dominios VH y VL son secuencias completamente camélicas (por ejemplo, de llama o alpaca) y el resto del anticuerpo es de secuencia completamente humana. Los anticuerpos c-Met pueden incluir anticuerpos que comprenden variantes "humanizadas" o "alineadas germinalmente" de dominios VH y VL derivados de camélidos, o CDR de los mismos, y anticuerpos quiméricos camélidos/humanos, en las que los dominios VH y VL contienen una o más sustituciones de aminoácidos en las regiones marco conservadas en comparación con los dominios VH y VL que se obtienen por inmunización activa de un camélido con un antígeno c-Met humano. Dicha "humanización" aumenta el % de identidad de secuencia con los dominios VH y VL de la línea germinal humana sustituyendo restos de aminoácidos que no coinciden en un dominio VH o VL de Camelidae de partida con el resto equivalente que se encuentra en el dominio VH o VL codificados por la línea germinal humana.

Los anticuerpos c-Met también pueden ser anticuerpos injertados con una CDR, en los que CDR (o bucles hipervariables) derivadas del anticuerpo de camélido, por ejemplo un anticuerpo c-Met camélido producido por la inmunización activa con una proteína c-Met humana, o codificado de otra manera por un gen camélido, se injertan en una región marco conservada de VH y VL humanos, siendo el resto del anticuerpo también de origen completamente humano. Dichos anticuerpos c-Met injertados con una CDR pueden contener CDR que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran como SEQ ID NO: 1-21, 71-73 u 83-85 (CDR de cadena pesada) o CDR que tienen secuencias de aminoácidos que se muestran como SEQ ID NO: 22-42, 74-76, 86, 87 o 137-148 (CDR de cadena ligera).

Los anticuerpos c-Met humanizados, quiméricos e injertados con CDR como se ha descrito anteriormente, particularmente los anticuerpos que comprenden bucles hipervariables o CDR derivados de la inmunización activa de camélidos con antígeno c-Met humano, pueden producirse fácilmente utilizando técnicas convencionales de modificación y expresión de ADN recombinante, utilizando células huésped procariontas o eucariotas modificadas para producir el polipéptido de interés e incluyendo, pero no limitadamente a, células bacterianas, células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, algunas de ellas como se describen en el presente documento y se ilustran en los ejemplos adjuntos.

Los anticuerpos c-Met derivados de camélidos incluyen variantes en las que los bucles hipervariables o CDR del dominio VH y/o el dominio VL se obtiene de un anticuerpo camélido convencional producido contra el c-Met humano, pero en el que al menos uno de dichos bucles hipervariables o CDR (derivados de camélidos) se ha modificado para incluir uno o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia codificada por camélidos. Dichos cambios incluyen la "humanización" de los bucles hipervariables/CDR. Los HV/CDR derivados de camélidos que se han modificado de esta manera pueden aún presentar una secuencia de aminoácidos que es

“sustancialmente idéntica” a la secuencia de aminoácidos de un HV/CDR codificado por camélidos. En este contexto, “identidad sustancia” puede permitir no más de una, o no más de dos faltas de coincidencia de secuencias de aminoácidos con el HV/CDR codificado por camélidos. Las realizaciones particulares del anticuerpo c-Met pueden contener variantes humanizadas de las secuencias de CDR que se muestran como SEQ ID NO: 19, 20, 21, 83 u 84 (CDR de cadena pesada) y/o variantes humanizadas de las secuencias de CDR que se muestran como SEQ ID NO: 31-33 o 144-148 (CDR de cadena ligera).

Los anticuerpos c-Met derivados de camélidos que se proporcionan en el presente documento pueden ser de cualquier isotipo. Los anticuerpos que se pretende utilizar terapéuticamente en humanos típicamente serán del tipo IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, a menudo del tipo IgG, en cuyo caso pueden pertenecer a cualquiera de las cuatro sub-clases IgG1, IgG2a y b, IgG3 o IgG4. En cada una de estas sub-clases se permite hacer una o más sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos en la parte Fc, o hacer otras modificaciones estructurales, por ejemplo, para aumentar o reducir las funcionalidades dependientes de Fc.

Humanización (alineamiento germinal) de dominios VH y VL derivados de camélidos

Los anticuerpos camélidos convencionales proporcionan un punto de partida ventajoso para la preparación de anticuerpos con utilidad como agentes terapéuticos humanos debido a los siguientes factores expuestos en el documento US 12/497.239:

- 1) Alto % de homología de secuencia entre los dominios VH y VL de camélidos y sus equivalentes humanos;
- 2) Alto grado de homología estructural entre las CDR de los dominios VH y VL de camélidos y sus equivalentes humanos (es decir, estructuras de plegamiento canónico tipo humano y combinaciones de plegamientos canónicos tipo humanos).

La plataforma de camélidos (por ejemplo, de llama) también proporciona una ventaja significativa en términos de diversidad funcional de los anticuerpos c-Met que se pueden obtener.

La utilidad de los anticuerpos c-Met que comprenden dominios VH de camélidos y VL de camélidos para la terapia humana se puede mejorar aún más por la “humanización” o “alineamiento germinal” de dominios VH y VL naturales de camélidos, por ejemplo para que sean inmunogénicos en un huésped humano. El objetivo total de la humanización es producir una molécula en la que los dominios VH y VL presenten una inmunogenicidad mínima cuando se introducen en un sujeto humano, mientras que se mantenga la especificidad y afinidad del sitio de unión al antígeno formado por los dominios VH y VL parentales.

Una estrategia de humanización, denominada “alineamiento germinal”, implica cambios de modificación en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH o VL de camélidos para hacerlos más cercanos a la secuencia de un dominio VH o VL humano.

La determinación de la homología entre un dominio VH (o VL) de camélido y dominios VH (o VL) humanos es una etapa crítica en el proceso de humanización, tanto por la selección de los restos de aminoácidos que se van a cambiar (en un dominio VH o VL determinado) como por la selección de la sustitución apropiada del resto(s) de aminoácido.

Se ha desarrollado una estrategia para la humanización de anticuerpos de camélido convencionales basándose en el alineamiento de un gran número de secuencias nuevas del dominio VH (y VL) de camélidos, típicamente dominios VH (o VL) mutados somáticamente que se sabe que se unen a un antígeno diana, con secuencias VH (o VL) de la línea germinal humana, secuencias VH (y VL) de consenso humanas, así como la información de la secuencia de la línea germinal disponible para *Lama pacos*.

El siguiente resumen repasa los principios que se pueden aplicar para (i) seleccionar restos de aminoácidos “camélidos” para la sustitución en un dominio VH o VL derivado de camélidos o una CDR de los mismos, y (ii) seleccionar la sustitución de restos de aminoácidos “humanos” que se sustituyen en ellos, en la humanización de cualquier dominio VH (o VL) camélido. Esta estrategia se puede utilizar para preparar variantes humanizadas de CDR derivadas de camélido que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran como SEQ ID NO: 19, 20, 21, 83 o 84 (CDR de cadena pesada) o que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran como SEQ ID NO: 31-33 o 144-148 (CDR de cadena ligera), y también para la humanización de dominios VH derivados de camélidos que tienen las secuencias que se muestran como SEQ ID NO: 51 o 88 y de dominios VL derivados de camélidos que tienen las secuencias que se muestran como SEQ ID NO: 55 o 158-164.

Etapa 1. Seleccionar la familia humana (línea germinal) y el miembro de esta familia que presenta la homología/identidad más alta con la secuencia de camélido madura que se va a humanizar. Se resume posteriormente un procedimiento general para identificar la coincidencia más estrecha con la línea germinal humana para cada cualquier dominio VH (o VL) determinado de camélidos.

Etapa 2. Seleccionar el miembro específico de la familia de la línea germinal humana que se utiliza para alinear germinalmente la contraria. Preferentemente esta es la línea germinal de mayor homología u otro miembro de familia de la línea germinal de la misma familia.

5 Etapa 3. Identificar las posiciones que se consideran preferidas para el alineamiento germinal basándose en utilización de la tabla de aminoácidos para la línea germinal de camélidos que está más cercana a la línea germinal humana seleccionada.

10 Etapa 4. Intentar cambiar los aminoácidos de la línea germinal de camélido que se desvía de la línea germinal humana; el alineamiento germinal de restos de FR se prefiere sobre la de restos de CDR.

15 a. Se prefieren las posiciones que se desvían de la línea germinal humana seleccionada utilizando el alinear germinalmente la contraria, para lo cual el aminoácido que se encuentra en la secuencia de camélido no coincide con la línea germinal seleccionada y no se encuentra en otras líneas germinales de la misma subclase (tanto para aminoácidos codificados por V así como por J).

20 b. Las posiciones que se desvían del miembro de la familia de la línea germinal humana seleccionada pero que se utiliza en otras líneas germinales de la misma familia también se pueden dirigir en el proceso de alineamiento germinal.

c. También se pueden dirigir las faltas de coincidencia adicionales (por ejemplo debido a mutaciones somáticas adicionales) hacia la línea germinal humana seleccionada.

25 Se puede utilizar la siguiente estrategia para determinar la coincidencia más estrecha de la línea germinal humana para un determinado dominio VH (o VL) de camélido:

30 Antes de analizar el porcentaje de identidad de secuencia entre la línea germinal VH y VL de camélidos y humanos, se pueden determinar primero los plegamientos canónicos, que permiten la identificación de los segmentos de la familia de la línea germinal humana con una combinación idéntica de plegamientos canónicos para H1 y H2 o L1 y L2 (y L3). Posteriormente el miembro de la familia de la línea germinal humana que tiene el grado más alto de homología de secuencia con la región variable de Camelidae de interés se puede escoger para valorar la homología de secuencia. La determinación de las clases canónicas de Chothia de los bucles hipervariables L1, L2, L3, H1 y H2 se puede llevar a cabo con herramientas bioinformáticas disponibles públicamente en la página de internet www.bio-inf.org.uk/abs/chothia.html. El resultado del programa muestra los requerimientos del resto clave en el archivo de datos. En estos archivos de datos, las posiciones del resto clave se muestran con los aminoácidos permitidos para cada posición. La secuencia de la región variable del anticuerpo se da como una entrada y primero se alinea con una secuencia de anticuerpos de consenso para asignar el esquema de numeración de Kabat. El análisis de los plegamientos canónicos utiliza un grupo de matrices de restos claves derivados por un método automático desarrollado por Martin y Thornton (Martin et al., J. Mol. Biol. 263:800-815 (1996)). Los límites de las regiones marco conservadas individuales se pueden asignar utilizando el esquema de numeración IMGT, que es una adaptación del esquema de numeración de Chothia (Lefranc et al., NAR 27: 209-212 (1999); <http://imgt.cines.fr>).

45 Con el segmento V particular de la línea germinal humana conocido, que utiliza la misma combinación de plegamientos canónicos para H1 y H2 y L2 (y L3), se puede determinar el miembro de la familia de mejor coincidencia en términos de homología de secuencia. El porcentaje de identidad de secuencia entre las secuencias de aminoácidos de la región marco conservada del dominio VH y VL de Camelidae y las correspondientes secuencias codificadas por la línea germinal humana se pueden determinar utilizando herramientas bioinformáticas, pero también se puede utilizar el alineamiento manual de las secuencias. Las secuencias de inmunoglobulina humanas se pueden identificar a partir de varias bases de datos proteicas, tal como VBase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) o la base de datos de Pluckthun/Honegger (<http://www.bioc.uni-zh.ch/antibody/Sequences/Germlines>). Para comparar las secuencias humanas con las regiones V de los dominios VH o VL de Camelidae se puede utilizar un algoritmo de alineamiento de secuencia tal como los disponibles en páginas de internet como www.expasy.ch/tools/#align, pero también se puede llevar a cabo el alineamiento manual, con un limitado grupo de secuencias. Las secuencias de cadena pesada y ligera de la línea germinal humana de las familias con las mismas combinaciones de plegamientos canónicos y con el grado más alto de homología con las regiones marco conservadas 1, 2, y 3 de cada cadena se pueden seleccionar y comparar con la región variable de Camelidae de interés, también se comprueba la FR4 contra las regiones JH y JK o JL de la línea germinal humana.

60 Nótese que en el cálculo del porcentaje total de homología de secuencia, los restos de FR1, FR2 y FR3 se evalúan utilizando la secuencia de coincidencia más estrecha de la familia de la línea germinal humana con la combinación idéntica de los plegamientos canónicos. Solamente se valoran los restos diferentes de la coincidencia más estrecha u otros miembros de la misma familia con la misma combinación de plegamientos canónicos (NB – excluyendo cualquier diferencia codificada por un cebador). Sin embargo, con el fin de la humanización, los restos de las regiones marco conservadas idénticas a los miembros de otras familias de la línea germinal humana, que no tienen la misma combinación de plegamientos canónicos, se pueden considerar para la humanización, a pesar del hecho de que se valoran “negativos” de acuerdo con las condiciones rigurosas descritas anteriormente. Esto se asume

basándose en la estrategia de “mezcla y coincidencia” para la humanización, en la que cada una de FR1, FR2, FR3 y FR4 se comparan por separado con su secuencia de la línea germinal humana de coincidencia más estrecha y la molécula humanizada contiene por lo tanto una combinación de diferentes FR como hicieron Qu y sus colegas (Qu et al., Clin. Cancer Res. 5:3095-3100 (1999)) y Ono y sus colegas (Ono et al., Mol. Immunol. 36:387-395 (1999)).

5 Solamente a modo de ejemplo, se contempla que las variantes humanizadas de los dominios VH que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran como SEQ ID NO: 45-51, 77 u 88 puedan incluir variantes en las que el resto(s) de aminoácidos que existen en una o más de las posiciones enumeradas en la siguiente Tabla se sustituyen con un resto de aminoácidos que existe en la posición equivalente del dominio VH humano, por ejemplo, un dominio VH codificado por la línea germinal humana. Las sustituciones de aminoácidos apropiadas se pueden derivar siguiendo el protocolo general para humanización que se ha descrito anteriormente.

Tabla 3: Listado de restos de posiciones de restos de aminoácidos que se pueden sustituir durante el alineamiento germinal (humanización) de los dominios VH enumerados. Para cada dominio VH nombrado, se numeran los restos de aminoácidos enumerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

VH	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
36C4 SEQ ID 51	2,5,23, 30		40, 48	54*, 55*	67, 68, 71, 81, 84, 85		108
* nótese que la sustitución de los restos 54 y 55 es con el fin de eliminar el sitio de desaminación, no para el alineamiento germinal humano como tal.							

15 Solamente a modo de ejemplo, se contempla que las variantes humanizadas de los dominios VL que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran como SEQ ID NO: 52-58, 78, 89 o 137-148 pueden incluir variantes en las que el resto(s) de aminoácidos que existe en una o más posiciones enumeradas en la siguiente tabla se sustituye con un resto de aminoácido que existe en la posición equivalente en un dominio VL humano, por ejemplo, un dominio VL codificado por la línea germinal humana. Las sustituciones de aminoácidos apropiadas se pueden derivar siguiendo el protocolo general de humanización que se ha descrito anteriormente.

Tabla 4: Lista de posiciones de restos de aminoácidos que se pueden sustituir durante el alineamiento germinal (humanización) de los dominios VL enumerados. Para cada dominio VL nombrado, los restos de aminoácidos enumerados se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

VL	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
36C4 SEQ ID 55	3, 8, 17, 18		39, 47, 49		58, 72, 75, 80		103

Anticuerpos de competición cruzada

30 Los anticuerpos monoclonales o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos que “compiten cruzadamente” con las moléculas desveladas en el presente documento son las que se unen al c-Met humano en sitio(s) que son idénticos a, o se solapan con, el sitio(s) al que se unen los presentes anticuerpos c-Met. Los anticuerpos monoclonales competitivos o los fragmentos de unión de los mismos se pueden identificar, por ejemplo, por medio de un ensayo de competición. Por ejemplo, una muestra de c-Met humano purificado o parcialmente purificado se puede unir a un soporte sólido. Luego se añade un compuesto de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo sospechoso de ser capaz de competir con dicho compuesto de anticuerpo de la invención. Una de las dos moléculas se marca. Si el compuesto marcado y el compuesto no marcado se unen por separado en distintos sitios sobre el c-Met, el compuesto marcado se unirá al mismo nivel tanto si está presente el compuesto sospechoso de competición como si no. Sin embargo, si los sitios de interacción son idénticos o se solapan, el compuesto sin marcar competirá, y la cantidad de compuesto marcado unido al antígeno disminuirá. Si el compuesto sin marcar está presente en exceso, el compuesto marcado se unirá muy poco, o nada. Para los fines de la presente invención, los anticuerpos monoclonales competitivos o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos son los que disminuyen la unión de los presentes compuestos de anticuerpo al c-Met aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 95%, o aproximadamente un 99%. Los detalles de los procedimientos para llevar a cabo dichos ensayos de competición son bien conocidos en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en Harlow y Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, páginas 567-569, ISBN 0-87969-314-2. Dichos ensayos pueden hacerse cuantitativos utilizando anticuerpos purificados. Se establece una curva de referencia titulando un anticuerpo contra sí mismo, es decir, se utiliza el mismo anticuerpo como el marcado y el competidor. La capacidad de un anticuerpo monoclonal competitivo o fragmento de unión al antígeno del mismo para inhibir la unión de la molécula marcada a la placa se titula. Los resultados se representan, y se comparan las concentraciones necesarias para conseguir el grado deseado de unión.

Polinucleótidos que codifican anticuerpos c-Met

La invención también proporciona moléculas de polinucleótidos que codifican los anticuerpos c-Met de la invención, también los vectores de expresión que contienen las secuencias de nucleótido que codifican los anticuerpos c-Met de la invención unidas operativamente a secuencias reguladoras que permiten la expresión del polipéptido de unión al antígeno en células huésped o en un sistema de expresión libre de células y en células huésped o un sistema de expresión libre de células que contiene el vector de expresión.

En realizaciones particulares, el polinucleótido que codifica el anticuerpo c-Met de la invención puede comprender una o más secuencias de polinucleótido que se muestran como SEQ ID NO: 59 o 65, cuyas secuencias codifican los dominios VH o VL de los anticuerpos c-Met, o una secuencia variante que codifica un dominio VH o VL funcional de un anticuerpo c-Met, en el que dicha secuencia variante presenta al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia cuando se alinea óptimamente con una de las SEQ ID NO: 59 o 65. En este contexto, el % de identidad de secuencia entre dos secuencias de polinucleótido se puede determinar comparando estas dos secuencias alineadas de una manera óptima y en la que la secuencia de polinucleótido que se va a comparar puede comprender adiciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia con un alineamiento óptimo entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas para las cuales el resto de nucleótido es idéntico entre las dos secuencias, dividiendo este número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado obtenido por 100 con el fin de obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias. Por ejemplo, es posible utilizar el programa BLAST, "secuencias BLAST2" (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) disponible en el sitio de internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, siendo los parámetros que se utilizan los que se dan por defecto (en particular para los parámetros "penalización de hueco abierto": 5, y "penalización de extensión de huecos": 2; siendo la matriz escogida, por ejemplo, la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa), el porcentaje de identidad entre las dos secuencias que se van a comparar se calcula directamente por el programa.

Las moléculas de polinucleótido que codifican los anticuerpos c-Met de la invención incluyen, por ejemplo, moléculas de ADN recombinante. Las expresiones "ácido nucleico", "polinucleótido" o una "molécula de polinucleótido" como se utiliza en el presente documento de manera intercambiable se refiere a cualquier molécula de ADN o ARN, de cadena sencilla o doble y, si es de cadena sencilla, la molécula de su secuencia complementaria. En la exposición de moléculas de ácido nucleico, una secuencia o estructura de una molécula de ácido nucleico en particular se puede describir en el presente documento de acuerdo con la convención normal de proporcionar la secuencia en la dirección 5' a 3'. En algunas realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos o polinucleótidos están "aislados". Este término, cuando se aplica a una molécula de ácido nucleico, se refiere a una molécula de ácido nucleico que está separada de secuencias con las que es inmediatamente contigua en el genoma de origen natural del organismo del que se origina. Por ejemplo, "un ácido nucleico aislado" puede comprender una molécula de ADN insertada en un vector, tal como un vector plásmido o vírico, o integrada en el ADN genómico de una célula procarionta o eucariota o un organismo no humano. Cuando se aplica al ARN, la expresión "polinucleótido aislado" se refiere primariamente a una molécula de ARN que se ha purificado/separado de otros ácidos nucleicos con los que estaba asociado en su estado natural (es decir, en células o tejidos). Un polinucleótido aislado (sea ADN o ARN) puede representar además una molécula producida directamente por medios biológicos o sintéticos y separada de otros componentes durante su producción.

Para la producción recombinante del anticuerpo c-Met de acuerdo con la invención, se puede preparar un polinucleótido recombinante (utilizando técnicas de biología molecular convencionales) codificante y se inserta en un vector replicable para la expresión en una célula huésped escogida, o un sistema de expresión libre de células. Las células huésped adecuadas pueden ser procariontas, levaduras o células eucariotas superiores, específicamente células de mamífero. Ejemplos de líneas celulares de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el cultivo en medio de cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)); células renales de hámster recién nacido (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster Chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de mieloma de ratón SP2/0-AG14 (ATCC CRL 1581; ATCC CRL 8287) o NS0 (colecciones de cultivo HPA n° 85110503); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL70), células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello de útero humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060563, ATCC CCL 51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y la línea de hepatoma humano (Hep G2), así como la línea celular PERC-6 de DSM. Los vectores de expresión adecuados para su uso en cada una de estas células huésped se conocen en general en la técnica.

Se debería señalar que la expresión "célula huésped" en general se refiere a una línea celular cultivada. Todos los seres humanos en los que se ha introducido un vector de expresión que codifica un polipéptido de unión al antígeno de acuerdo con la invención se excluyen explícitamente de la definición de una "célula huésped".

Producción de anticuerpos

En un importante aspecto, la invención también proporciona un método para producir un anticuerpo c-Met de la invención que comprende cultivar una célula huésped (o un sistema de expresión libre de células) que contiene un polinucleótido (por ejemplo, un vector de expresión) que codifica el anticuerpo c-Met en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo c-Met y la recuperación del anticuerpo c-Met que se expresa. Este proceso de expresión recombinante se puede utilizar para la producción a gran escala de los anticuerpos c-Met de acuerdo con la invención, incluyendo los anticuerpos monoclonales que se pretenden para el uso terapéutico en humanos. Los vectores adecuados, líneas celulares y procesos de producción para la fabricación a gran escala de anticuerpos recombinantes adecuados para su uso terapéutico *in vivo* están disponibles en general en la técnica y serán bien conocidos por el experto en la técnica.

Utilidad terapéutica de los anticuerpos c-Met

Los anticuerpos c-Met que se proporcionan en el presente documento se pueden utilizar en el tratamiento de cánceres tanto dependientes de HGF como independientes de HGF.

La activación inapropiada de c-Met puede inducirse por lesiones genéticas específicas, regulación positiva transcripcional o mecanismos autocrinos o paracrinos dependientes de ligando (Comoglio et al, Nature Reviews Drug Discovery, 7:504-516,2008). Los cánceres dependientes de HGF e independientes de HGF que se pueden tratar con los anticuerpos c-Met incluyen, pero no se limitan a, carcinomas gástricos, carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, carcinomas tiroideos, de ovarios, pancreáticos, de próstata, de células renales, hepatocelular, de mama y colorrectal, glioblastomas, rhabdomiomas y osteosarcomas.

El término “tratar” o “tratamiento” significa el enlentecimiento, interrupción, detención, control, parada o reducción de la gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad, pero no implica necesariamente una eliminación total de todos los síntomas, afecciones o trastornos relacionados con la enfermedad.

Para su uso como agentes terapéuticos para seres humanos, los anticuerpos c-Met que se describen en el presente documento se pueden administrar a un sujeto humano que necesita el tratamiento en una “cantidad eficaz”. La expresión “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad o dosis de un anticuerpo c-Met, en una administración de dosis única o múltiple a un paciente humano, proporciona una eficacia terapéutica en el tratamiento de la enfermedad. Las cantidades terapéuticamente eficaces del anticuerpo c-Met pueden comprender una cantidad en el intervalo de desde aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg por dosis única. Una cantidad terapéuticamente eficaz para cualquier paciente individual puede determinarla el personal sanitario controlando el efecto del anticuerpo c-Met sobre un biomarcador, tal como el c-Met de la superficie celular en tejidos tumorales, o un síntoma tal como la regresión tumoral, etc. La cantidad de anticuerpo que se administra en un determinado punto de tiempo puede variarse de manera que se administren cantidades óptimas del anticuerpo c-Met tanto si se emplea solo o en combinación con cualquier otro agente terapéutico, durante el curso del tratamiento.

También se contempla administrar los anticuerpos c-Met descritos en el presente documento, o composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos, en combinación con otro tratamiento para el cáncer, como una terapia de combinación.

Composiciones farmacéuticas

El ámbito de la invención incluye composiciones farmacéuticas, que contienen una o una combinación de anticuerpos c-Met de la invención, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se formulan con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos c-Met.

Las técnicas para formular anticuerpos monoclonales para el uso terapéutico en seres humanos son bien conocidas en la técnica y se revisan, por ejemplo, en Wang et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 96, pp. 1-26, 2007.

Breve descripción de los dibujos

La invención se entenderá mejor en referencia a los siguientes ejemplos experimentales y las Figuras adjuntas en las que:

Figura 1. Respuesta inmunitaria específica de MKN-45 en suero pre-inmune (día 0) y post-inmune (día 45) de llamas inmunizadas con células MKN-45, según se mide por citometría de flujo.

Figura 2. Respuesta inmunitaria al c-Met recombinante en suero pre-inmune (día 0) y post-inmune (día 45) de llamas inmunizadas con células MKN-45, según se mide con ELISA.

Figura 3. Ensayo de competición que muestra los extractos periplásmicos que contienen Fab que compiten con el HGF biotinilado (25 ng/ml) para la unión con c-Met capturado por medio de la parte Fc del extremo C.

5 Figura 4. ELISA que ilustra la unión al anticuerpo 40B8 del dominio IPT1-2 de c-Met (A) y la unión a 36C4 del dominio SEMA de c-Met (B).

10 Figura 5. Los resultados de un ensayo de dispersión utilizando células HPAF que demuestran la inhibición de la dispersión inducida por HGF por el anticuerpo 38H10 de una manera dependiente de la dosis (panel superior). No se observaron efectos agonistas en comparación con el medio con solo el control.

15 Figura 6. Un ensayo de competición basado en ELISA que ilustra el grado de competición entre los anticuerpos y el HGF por la unión con c-Met a diferentes concentraciones de anticuerpo. El porcentaje de competición se calculó en comparación con los anticuerpos de control.

20 Figura 7. Ensayo de proliferación utilizando células BxPC3. El 224G11 quimérico es el c224G11. (A) Proliferación inducida por anticuerpos como un porcentaje del efecto máximo a 75 ng/ml de HGF. (B) Efecto de los anticuerpos sobre la proliferación inducida por HGF en comparación con el máximo efecto a 75 ng/ml de HGF.

25 Figura 8. Agonismo según se mide en un ensayo de fosforilación utilizando células NSCLC A549. El porcentaje de fosforilación de c-Met inducida por los anticuerpos se expresa como un porcentaje de fosforilación inducida por 100 ng/ml de HGF. Se incluyeron 224G11 murino (m224G11) y 224G11 quimérico (c224G11) como controles positivos, y se incluyó el anticuerpo U16 como control negativo.

30 Figura 9. Antagonismo según se mide en un ensayo de fosforilación utilizando células A549. La inhibición de la fosforilación de c-Met inducida por HGF por los anticuerpos se indica como un porcentaje en comparación con el máximo efecto de 100 ng/ml de HGF solo en células A549. El 224G11 quimérico (c224G11) se incluyó como control positivo y el anticuerpo U16 como control negativo.

35 Figura 10. Bloqueo de la activación independiente de HGF medido en un ensayo de fosforilación utilizando células MKN-45. La inhibición de la autofosforilación en células MKN-45 por los anticuerpos se comparó con el control negativo U16.1, donde la inhibición por U16.1 se fijó como el 0%.

40 Figura 11. ADCC inducida por anticuerpos en células MKN-45 utilizando el kit de proteasa Dead-Cell (CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay). El porcentaje de lisis se expresa como la lisis específica en comparación con el control de isotipo negativo.

45 Figura 12. ADCC inducida por 36C4 Potelligent™ en células NCI-H441 expresada como un porcentaje de lisis de las células según se mide con el ensayo de liberación de ⁵¹Cr.

50 Figura 13. Efecto *in vivo* del aumento de ADCC por 36C4 en xenoinjertos de MKN-45 con inyecciones de mAb dos veces a la semana.

55 Figura 14A-B. Resonancia de plasmones superficiales de 36C4 y 48A2 para la unión a epítomos no solapados. La unión se observó solo con el complejo Met:48A2 (A) y no con el complejo Met:36C4 solo (B).

60 Figura 15. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de c-Met humano y de *Lama glama*.

65 Figura 16A-B. Mapeo de dominio de mAb utilizando c-Met ECD quimérico. La unión de 36C4 al c-Met humano (TS) y el IPT1-4 humano/llama indica la unión de la región PSI-SEMA (A). La unión del mAb 13E6 al c-Met humano y al IPT1-4 de llama/humano (B).

Figura 17. Inhibición de la autofosforilación utilizando combinaciones de mAb c-Met en células MKN-45.

Figura 18. Resultados de un ensayo de fosforilación que utiliza combinaciones de mAb c-Met en células NSCLC A549 que muestran los efectos agonistas (A) y los efectos antagonistas (B). U16 es el isotipo de control y c224G11 es el control positivo.

Figura 19. Experimento de xenoinjerto U87 MG que ensaya los efectos de la administración de 30 mg/kg de 36C4 sobre el crecimiento tumoral frente al efecto de la administración de 30 mg/kg de c224G11.

Figura 20. Ensayo de fosforilación que utiliza mAb 36C4 alineados germinalmente en células A549 que muestra el agonismo (A) y el antagonismo (B). U16 es el isotipo de control y c224G11 el control positivo.

Figura 21. Estabilidad en PBS de las variantes 36C4 alineadas germinalmente a varias temperaturas. Los ensayos de funcionalidad se llevaron a cabo utilizando la resonancia de plasmones superficiales en mAb 36C4 alineados germinalmente tras la incubación en PBS a 4 °C, TA y 37 °C durante hasta 56 días.

Figura 22. Termotolerancia de 36C4 alineado germinalmente (A) y 48A2 (B). La funcionalidad se investigó utilizando resonancia de plasmones superficiales tras la incubación a diferentes temperaturas durante 1 h.

Figura 23. Ilustración esquemática de la estructura de las construcciones de c-Met quiméricas de llama-humanas preparadas por: (A) mapeo peptídico de mAb (por ejemplo 36C4) de unión al dominio SEMA de c-Met. El sombreado gris claro indica la secuencia de c-Met de llama (LS); el sombreado en gris oscuro indica la secuencia de c-Met humano (hS). Las posiciones relativas de la secuencia de señal, dominio SEMA, dominio PSI de c-Met. El sombreado gris claro indica la secuencia de c-Met de llama; el sombreado gris oscuro indica la secuencia de c-Met humano. Se indican las posiciones relativas de la secuencia de señal, dominio SEMA, dominio PSI y dominios IPT 1, 2, 3, y 4.

Figura 24. Un ensayo para la regulación negativa de la proteína c-Met en la superficie de células MKN-45 después del tratamiento con varios mAb c-Met a concentraciones de 1 µg/ml o 10 µg/ml. Los resultados se expresan como un porcentaje total de regulación negativa de c-Met.

Figura 25. Secuencia de aminoácidos de la parte extracelular del c-Met humano, que ilustra las posiciones del dominio SEMA y los dominios IPT.

Ejemplos

La invención se entenderá mejor en referencia a los siguientes ejemplos experimentales no limitantes.

Ejemplo 1: Inmunización de llamas

La inmunización de las llamas y la recolección de los linfocitos de sangre periférica (PBL), así como la posterior extracción de ARN y la amplificación de los fragmentos de anticuerpo, se llevaron a cabo como habían descrito De Haard y sus colegas (De Haard H, et al., JBC. 274:18218-30, 1999). Se inmunizaron ocho llamas con la línea celular gástrica humana MKN-45 que sobre-expresaba c-Met (DMSZ, ACC409) (se confirmó la sobre-expresión de c-Met por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-HGFR conjugado con PE (R&D systems, nº de cat. FAB3582P)). Otras dos llamas se inmunizaron con la línea celular NCI-H441. Las llamas se inmunizaron por inyección intramuscular en el cuello una vez por semana durante un periodo de seis semanas. Se inyectaron aproximadamente 10^7 células en los músculos del cuello y se inyectó adyuvante incompleto de Freund en una segunda región localizada a pocos centímetros del sitio de inyección de las células.

Se recolectaron muestras de sangre de 10 ml pre-y post-inmunización para investigar la respuesta inmunitaria. Tres o cuatro días después de la última inmunización, se recolectaron 400 ml de sangre y se extrajo el ARN total del preparado de PBL utilizando un gradiente Ficoll-Paque y el método descrito por Chomczynski P et al. (Anal. Biochem. 162: 156-159, 1987). El rendimiento medio de ARN era de 450 µg. El ARN extraído se utilizó para síntesis aleatoria de ADNc y para la amplificación por PCR de las regiones V de las cadenas pesada y ligera (V λ y V κ) con el fin de construir las bibliotecas de fagémidos que contienen Fab como ha descrito De Haard H, et al. (Biol. Chem. 274, 1999). Las bibliotecas resultantes mostraban buenos niveles de diversidad ($1-7 \times 10^8$).

La respuesta inmunitaria a las células MKN-45 o células NCI-H441 se investigaron utilizando citometría de flujo. Se añadieron 100 µl/pocillo de los sueros diluidos en las células (2×10^5 células/pocillo) y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Tras lavar con PBS y un 1% de BS, se añadieron 0,1 µg/100 µl/pocillo de anticuerpo de cabra anti-llama conjugado con FITC (BETHYL, nº A160-100F) y se incubó durante 30 min a 4 °C. Tras lavar con PBS y un 1% de BSA se leyeron los resultados en un FACS Calibur y se representó la fluorescencia media frente a las diluciones de los sueros (Figura 1).

La respuesta inmunitaria específica contra c-Met se determinó utilizando un ELISA con c-Met recombinante inmovilizado (R&D systems, 358-MT/CF) utilizando los sueros pre- y post-inmunes (Día 0 y Día 45, respectivamente). La IgG1 de llama unida al c-Met inmovilizado se detectó utilizando una IgG1 de ratón anti-llama (Daley LP, et al. Clin. Diagn. Lab Immunol. 12: 380-386, 2005) y anticuerpo de burro anti-ratón conjugado con HRP (Jackson). La Figura 2 muestra la respuesta inmunitaria de 4 de 10 llamas inmunizadas. Una respuesta inmunitaria similar se observó en las otras 4 llamas inmunizadas con células MKN-45, pero no en las llamas inmunizadas con las células NCI-H441.

Ejemplo 2: Selecciones y exploraciones de los Fab específicos de c-Met

Los Fab que se expresan en fagos se produjeron de acuerdo con protocolos convencionales y se seleccionaron adicionalmente en c-Met dimérico recombinante inmovilizado (R&D systems, 358-MT/CF) o el domino extracelular recombinante de c-Met. Se llevó a cabo la elución total del fago de unión a c-Met con tripsina de acuerdo con protocolos de fago de presentación convencionales.

Se llevaron a cabo de dos a cuatro rondas de selección para enriquecer los Fab específicos de c-Met expresados por el fago. Las colonias individuales se aislaron y se produjeron las fracciones periplásmicas (peris) por inducción

con IPTG a partir de todas las bibliotecas de acuerdo con protocolos convencionales.

5 La exploración de Fab específicos de c-Met por competición con HGF maduro por la unión a c-Met inmovilizado se llevó a cabo utilizando un ensayo de competición basado en ELISA. Se inmovilizaron 2 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-Fcγ humano (Jackson) en una placa maxisorb y, tras bloquearla con un 1% de caseína en PBS durante 2 h, se añadieron 100 ng/ml de c-Met recombinante dimérico y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Tras el lavado, se añadieron 50 µl de peris que contenía Fab y se permitió que se unieran al c-Met capturado, antes se añadir 25 ng/ml de HGF maduro biotinilado en el extremo N (R&D systems, 294-HGN/CF). Se llevó a cabo la biotinilación del extremo N de acuerdo con el protocolo proporcionado por Thermo Scientific con un exceso de 5 veces de NHS-CL biotina en un tampón fosfato de 50 mM (pH 6,5) a 4 °C durante 24 h. El HGF maduro biotinilado se incubó a temperatura ambiente durante 1 h antes de lavarlo y se añadió estreptavidina conjugada con rábano rusticano (estrep-HRP) y se incubó durante una hora adicional. Se añadió TMB y la placa se leyó a 620 nm. Se incluyó un extracto periplásmico no relevante y un exceso de 50 veces de HGF frío (no biotinilado) como control positivo en todas las placas. Un ejemplo de peris que contienen Fab que compiten con HGF se da en la Figura 3.

10 15 Los clones de competición con HGF se secuenciaron en las regiones VH y VL y se dividieron en familias de VH basándose en la secuencia de la CDR3 de VH. Estas familias VH se ensayaron adicionalmente con resonancia de plasmones superficiales (SPR) en cuanto a la disociación (k_{off}) y reconocimiento de SEMA-PSI o del dominio extracelular de c-Met (Decoy). Entre 1000-2000 RU de c-Met dimérico, SEMA-PSI o c-Met Decoy se inmovilizaron en un chip VIA con acoplamiento de amina en tampón de acetato sódico (pH 4,5). Las peris que contenían Fab se añadieron con un caudal de 30 µl/min y se consideraba que los Fab estaban unidos si se observaba un aumento de la RU. La k_{off} se midió durante 2 min para cada muestra. La Tabla 8 resume el dominio de reconocimiento y la k_{off} para las diferentes familias VH.

20 25 Varias familias VH reconocían el dominio SEMA-PSI, mientras que otras reconocían solo el c-Met Decoy. Los Fab tenían k_{off} en el intervalo de $10^{-3}s^{-1}$ - $10^{-4}s^{-1}$, teniendo el mejor (12G4) una k_{off} de $1,3 \times 10^{-4}s^{-1}$.

30 Los dominios VH y VL de los clones antagonistas se fusionaron con los dominios constantes de IgG1 humana y con dominios Cκ o Cλ humanos y anticuerpos monoclonales producidos como bivalentes con el sistema descrito en la solicitud de patente WO 2009/145606 con rendimientos de expresión de 15-30 µg/ml tras purificación con Proteína A.

Tabla 5: Secuencias CDR de anticuerpos antagonistas y variantes alineadas germinalmente (según la numeración de Kabat)

VH	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	SEQ ID NO
mAb	CDR1		CDR2		CDR3		SEQ ID NO
12G4	DYAMT	1	TISWINDINTYYAESMKD	2	RRDNYGTSGEYDY	3	3
13E6	DYVMN	4	AINWNGGSTYYAESMKG	5	DTWVSGNGY	6	6
20A11	DYAMS	7	AISWNGSSTYYAESMKG	8	DLIGSHDY	9	9
20F1	GNYYAWS	10	VIADGGSTYYSPSLKS	11	GFGWYSGSRNDY	12	12
38H10	MNSID	13	RIDPEDGGTKYAKQFQG	14	VDDYYLGYDY	15	15
40B8	NYVID	16	RIDPENGTRYAQKFKQG	17	LEDYELAYDY	18	18
36C4	TNYYYS	19	VIADGGSTYYSPSLKS	20	DVRVIATGWATANALDA	21	21
34H7	SYAMS	71	GIYKGGPKYANSYKVG	72	SGYGSSLGDFGS	73	73
48A2	MNSID	13	RIDPEDGGTKYAKQFQG	14	VDDYYLGYDY	15	15
55A12-54E	TNYYYS	19	VIADGGSTYYSPSLKS	83	DVRVIATGWATANALDA	21	21
53E2 - 54E	TNYYYS	19	VIADGGSTYYSPSLKS	83	DVRVIATGWATANALDA	21	21
53E3	TNYYYS	19	VIADGGSTYYSPSLKS	83	DVRVIATGWATANALDA	21	21
53A11	TNYYYS	19	VIADGGSTYYSPSLKS	84	DVRVIATGWATANALDA	21	21
56F3	MNSID	13	RIDPEEGGTYAKQFQG	85	VDDYYLGY	15	15
56D8	MNSID	13	RIDPEEGGTYAKQFQG	85	VDDYYLGY	15	15
56B1	MNSID	13	RIDPEEGGTYAKQFQG	85	VDDYYLGY	15	15
56E9	MNSID	13	RIDPEEGGTYAKQFQG	85	VDDYYLGY	15	15
56E5	MNSID	13	RIDPEEGGTYAKQFQG	85	VDDYYLGY	15	15
56E1	MNSID	13	RIDPEEGGTYAKQFQG	85	VDDYYLGY	15	15
56G5	MNSID	13	RIDPEEGGTYAKQFQG	85	VDDYYLGY	15	15
Vk (V kappa)							
mAb	CDR1		CDR2		CDR3		SEQ ID NO
38H10	KSSQSVLWRSNQNKNYLA	22	WASIRES	23	QQGYSFPYT	24	24
40B8	KSSQSVLLSSNQNKNYLA	25	WASTRES	26	QQGYSFFPLT	27	27

Vk (V kappa)						
mAb	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
48A2	KSSQSVLFSSNQKNYLA	86	WASIRES	23	QQGYSFYPYS	87
56F3	KSSQSVLFSSNQKNYLA	86	WASIRES	23	QQGYSFYPYS	87
56D8	KSSQSVLFSSNQKNYLA	86	WASIRES	23	QQGYSFYPYS	87
56B1	KSSQSVLFSSNQKNYLA	86	WASIRES	23	QQGYSFYPYS	87
56E9	KSSQSVLFSSNQKNYLA	86	WASIRES	23	QQGYSFYPYS	87
56E5	KSSQSVLFSSNQKNYLA	86	WASIRES	23	QQGYSFYPYS	87
56E1	KSSQSVLFSSNQKNYLA	86	WASIRES	23	QQGYSFYPYS	87
56G5	KSSQSVLFSSNQKNYLA	86	WASIRES	23	QQGYSFYPYS	87
48A1	KSSQSVLWRSNQKNYLA	22	WASIRES	23	QQGYSFYPYT	24
48A11	KSSQSVLYNPNGKSYLA	137	WASTRES	26	QQGYSFYPYS	87
48B8	KSSQSVLYTSNHKNYLA	138	WASTRES	26	QQGWSFPYYS	139
48D2	KSSQSVLYNSNGKNYLA	140	WASTRES	26	QQGWSFPYT	141
48B6	KSSQSVLYGSGNQKNYLA	142	WASTRES	26	QQGWSFPYT	141
48C8	KSSQSVLYNSNGKNYLA	140	WASTRES	26	QQGWSFPYT	141
48E5	KSSQSVLYNSNGKNYLA	140	WASTRES	26	QQGWSFPYT	141
48D7	KSSQSVLFSSNQKNYLA	86	WASTRES	26	QQGYSFYPYS	87
48E2	KSSQSVLWSSNQKNYLA	143	WASTRES	26	QQGYSFYPYS	87
VA (V lambda)						
mAb	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
20F1	TGTNSDVGYGNYVS	28	DVNRAS	29	ASYRSANNAV	30
36C4	AGTSSDVGYGNYVS	31	AVSYRAS	32	ASYRSSNNAAV	33
12G4	AGTSSDIGNYNYVS	34	EYVKRPS	35	ASYRSSNNVW	36
13E6	AGTSSDIGDYNYVS	37	DVNRAS	38	ASYRSRNDYA	39
20A11	AGTSSDVGYGNYVS	40	AVSTRAS	41	ASYRSSNNYA	42

VA (V lambda)						
mAb	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
34H7	TGSSNIGGGYLS	74	SNINRAS	75	SSWDDSVSGPV	76
55A12-54E	AGTSSDVGYGNYVS	31	AVSYRAS	32	ASYRSSNNAAV	33
53E2 - 54E	AGTSSDVGYGNYVS	31	AVSYRAS	32	ASYRSSNNAAV	33
53E3	AGTSSDVGYGNYVS	31	AVSYRAS	32	ASYRSSNNAAV	33
53A11	AGTSSDVGYGNYVS	31	AVSYRAS	32	ASYRSSNNAAV	33
49A1	AGTSSDVGYGNYVS	31	AVSYRAS	32	ASYRSSNNAAV	33
49D2	AGTSTDVGYGNYVS	144	AVSYRAS	32	ASYRSSNNAAV	33
49G3	AGTSTDVGYGNYVS	144	AVSYRAS	32	ASYRSSNNAAV	33
49D3	AGTSTDVGYGNYVS	144	AVSYRAS	32	ASYRSSNKNNAV	145
49A11	AGTSSDVGYGNYVS	31	AVSYRAS	32	ASYRITNRHSV	146
49C4	AGTSTDVGYGNYVS	144	AVSYRAS	32	ASYRRSTNVGV	147
49E11	AGTSTDVGYGNYVS	144	AVSYRAS	32	ASYRTSNNNAV	148

Tabla 6: Secuencias de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y ligera de Fab antagonistas seleccionados y variantes de afinidad

Secuencias del dominio variable de cadena pesada
>36C4_VH (SEQ ID NO:51) QVQLVESGPGGLVKPSQTLSTCAVSGGSITTNYYYWSWIRQSPGKGLEWMGVIAYDGSTD YSPSLKSRTSISRDTSKNQFSLQLSSVTPEDTAVYYCARDVRVIATGWATANALDAWGQG TLVTVSS
>36C4Q_VH (SEQ ID NO:88) QVQLVESGPGGLVKPSQTLSTCAVSGGSITTNYYYWSWIRQSPGKGLEWMGVIAYDGSTD YSPSLKSRTSISRDTSKNQFSLQLSSVTPEDTAVYYCARDVRVIATGWATANALDAWGQG TQVTVSS
Secuencias del dominio variable de cadena ligera
>36C4_VL (SEQ ID NO:55) QSVLTQPPSVSGSPGKTVTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQQLPGTAPKLLIFAVSYRASGI PDRFSGSKSGNTAFLTISGLQSEDEADYYCASYRSSNNAAVFGGGTHLTVL
>48D7_VK (SEQ ID NO:156) DIVMTQTPASVTASAGEKVTINCKSSQSVLFSSNQKNYLAWYQQRVGQSPRLLIYWAS TRESGVPDRFSGSGSTTDFTLTISNFQPEDAAVYYCQQGYSPYFSGSGTRLEIR
>48E2_VK (SEQ ID NO:157) DVVMTQSPSSVTASAGEKVTINCKSSQSVLWSSNQKNYLAWYQQRVGQSPRLLIYWAS TRESGVPDRFSGSGSTTDFTLTISNFQPEDAAVYYCQQGYSPYFSGSGTRLEIR
>49A1_VL (SEQ ID NO:158) QSVLTQPPSVSGSPGKTVTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQQLPGTAPKLLIFAVSYRASGIP DRFSGSKSGNTAFLTISGLQSEDEADYYCASYRSSNNAAVFGGGTHLTVL
>49D2_VL (SEQ ID NO:159) QSVLTQPPSVSGTLGKTLTISCAGTSTDVGYGNYVSWYQQLPGTAPKLLIFAVSYRASGIP DRFSGSKSGNTAFLTISGLQSEDEADYYCASYRSSNNAAVFGGGTHLTVL
>49G3_VL (SEQ ID NO:160) QSALTQPPSVSGTLGKTLTISCAGTSTDVGYGNYVSWYQQLPGTAPKLLIFAVSYRASGIP DRFSGSKSGNTAFLTISGLQSEDEADYYCASYRSSNNAAVFGGGTHLTVL
>49D3_VL (SEQ ID NO:161) LPVLTQPPSVSGTLGKTLTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQQLPGTAPKLLIYAVSYRASGIP DRFSGSKSGNTASLSISGLQSEDEADYYCASYRSSNNAVFGGGTHLTVL
>49A11_VL (SEQ ID NO:162) QSALTQPPSVSGSPGKTVTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQKLPGTAPKLLIYAVSYRASGIP DRFSGSRSGNTASLTISGLQSEDEADYYCASYRITNRHSVFGGGTHLTVL
>49C4_VL (SEQ ID NO:163)

Secuencias del dominio variable de cadena ligera
QSALTQPPSVSGTLGKTVTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQKLPGTAPKLLIYAVTYRASGIP DRFSGSKSGNTASLTISGLQSEDEADYYCASYRRSTNVGVFGGGTHLTVL
>49E11_VL (SEQ ID NO:164) QSALTQPPSVSGTLGKTVTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQKLPGTAPKLLIYAVTYRASGIP DRFSGSKSGNTASLTISGLQSEDEADYYCASYRRSTNVGVFGGGTHLTVL

Tabla 7: Secuencias de nucleótido que codifican los dominios variables de cadena pesada y ligera de Fab antagonistas seleccionados

Secuencias de dominio variable de cadena pesada
>36C4_VH (SEQ ID NO:59) CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCGGGCCAGGCCTGGTGAAGCCCTCGCAGACACTCTCCCTC ACCTGCGCTGTCTCTGGTGGCTCCATCACAACCAACTATTACTACTGGAGCTGGATTTCGC CAGTCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATGGGAGTCATAGCTTATGATGGCAGCACTGAC TACAGCCCATCCCTCAAGAGCCGCACTTCCATCTCCAGGGACACGTCCAAGAACCAGTTC TCCCTGCAGCTGAGCTCTGTGACCCCTGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCCAGAGAT GTAAGGGTAATCGCTACGGGTTGGGCTACTGCCAATGCTTTGGACGCATGGGGCCAGGGG ACCCTGGTCACTGTCTCCTCAGC
>36C4Q_VH (SEQ ID NO:90) CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCGGGCCAGGCCTGGTGAAGCCCTCGCAGACACTCTCCCTC ACCTGCGCTGTCTCTGGTGGCTCCATCACAACCAACTATTACTACTGGAGCTGGATTTCGC CAGTCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATGGGAGTCATAGCTTATGATGGCAGCACTGAC TACAGCCCATCCCTCAAGAGCCGCACTTCCATCTCCAGGGACACGTCCAAGAACCAGTTC TCCCTGCAGCTGAGCTCTGTGACCCCTGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCCAGAGAT GTAAGGGTAATCGCTACGGGTTGGGCTACTGCCAATGCTTTGGACGCATGGGGCCAGGGG ACCCAGGTCACCGTGTCTCA
Secuencias de dominio variable de cadena ligera
>36C4_VL (SEQ ID NO:65) CAGTCTGTGTTGACGCAGCCTCCCTCCGTGTCTGGGTCTCCAGGAAAGACGGTCACCATC TCCTGTGCAGGAACCAGCAGTGATGTTGGGTATGGAACTATGTCTCCTGGTACCAGCAG CTCCCAGGCACGGCCCCAACTCCTGATCTTTGCAGTCAGCTATCGAGCCTCAGGGATC CCTGATCGTCTCTGGCTCCAAGTCAGGCAACACGGCCTTTTGGACCATCTCTGGGCTC CAGTCCGAGGACGAGGCTGATTACTGTGCCTCATATAGAAGCAGCAACAATGCTGCT GTGTTCCGGCGGAGGGACCCATCTGACCGTCCTG

5

Ejemplo 3: Mapeo de epítomos

10 Se inmovilizaron diferentes ectodominios de c-Met (Decoy, SEMA, SEMA-PSI, SEMA-PSI-IPT1-2 e IPT3-4 (C. Basilico, et al., J Biol. Chem. 283:21267-2127, 2008) (1 µg/ml) en una placa maxisorb en PBS durante una noche a 4 °C. Los anticuerpos (mAb) se añadieron en diluciones de tres veces comenzando con 1 µg/ml y se permitió que se unieran durante 1 h a temperatura ambiente. La unión se reveló con Proteína A conjugada con HRP y TMB y se leyó a 450 nm tras parar la reacción con H₂SO₄.

Basándose en los resultados de unión, los mAb se podrían mapear en diferentes dominios de c-Met, excepto para varios mAb que solo se unen a c-Met Decoy y no a cualquiera de los otros dominios ensayados (Tabla 8). Algunos anticuerpos que se unían solo a c-Met Decoy pueden unirse a la región IPT 2-3 o a un epítipo conformacional no visto en los fragmentos de proteína c-Met recombinante. Un ejemplo del anticuerpo 40B8 que se une al dominio IPT1-2 se muestra en la Figura 4A y el 36C4 que se unía al dominio SEMA en la Figura 4B.

Tabla 8. Dominio de reconocimiento de c-Met para mAb antagonistas y velocidades de disociación de los Fab correspondientes

mAb	Dominio de reconocimiento	k_{off} ($10^{-4}s^{-1}$)
12G4	IPT1-2	1,3
13E6	Decoy	6,5
20F1	SEMA	69
20A11	Decoy	9
38H10	IPT1-2	12
36C4	SEMA	6,4
40B8	IPT1-2	13
34H7	SEMA	16

10 Ejemplo 4: Ensayo de dispersión

Se colocaron en placas células de cáncer pancreático humano (HPAF) privadas de suero en placas de 96 pocillos, a 7000 células/pocillo. El día 2, se añadieron los anticuerpos por triplicado a concentraciones de 30, 10, 3 y 1 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron con las células durante 30 minutos, antes se habían añadido 1,25 ng/ml de HGF/pocillo. Las células HPAF se incubaron también con los anticuerpos en ausencia de HGF. El día 3, las células se fijaron y tiñeron con cristal violeta. La valoración de la cantidad de dispersión se hizo tres veces independientemente y por dos personas diferentes.

Los resultados demostraban una inhibición dependiente de la dosis de la dispersión inducida por HGF por los mAb, con fuerte bloqueo por ocho anticuerpos de los 13 ensayados, de los cuales cinco (12G4, 20A11, 38H10, 36C4 y 40B8) presentaban un bloqueo completo de la dispersión a 30 $\mu\text{g/ml}$. Los ocho mAb antagonistas (12G4, 13E6, 20F1, 20A11, 38H10, 34H7, 36C4 y 40B8) también estaban libres de efectos agonistas a 30 $\mu\text{g/ml}$ en ausencia de HGF. La Figura 5 muestra un ejemplo de los resultados de dispersión de 38H10 en presencia y ausencia de HGF en comparación con el medio de control y el control de HGF.

25 Ejemplo 5: Reactividad cruzada con c-Met de ratón y Rhesus

Se llevó a cabo la reactividad cruzada contra c-Met ECD de Rhesus (*Maccaca mulatta*, documento US20090191580_5) y c-Met de ratón (R&D systems nº de cat. 527- ME) en un ELISA de unión. El ECD de Rhesus se inmovilizó en PBS (1 $\mu\text{g/ml}$) en una placa maxisorb de 96 pocillos y se incubaron a 4 °C durante una noche. Tras el bloqueo con un 1% de caseína en PBS, se añadieron los anticuerpos en diluciones comenzando con 10 $\mu\text{g/ml}$ y se les permitió unirse durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó y se añadió un anticuerpo de cabra anti-Fcy humano (Jackson) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Tras el lavado, se añadió TMB y la placa se leyó a 620 nm.

Como el c-Met de ratón también contenía una parte Fc, se inmovilizaron los mAb (2 $\mu\text{g/ml}$) en una placa maxisorb de 96 pocillos y se incubaron a 4 °C durante una noche y, tras el bloqueo, se añadieron 100 ng/ml del c-Met de ratón y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Tras el lavado, se añadió TMB y se leyó la placa a 620 nm. Se utilizó un anticuerpo de cabra anti-c-Met de ratón biotinilado revelado con estrept-HRP como control positivo para el c-Met de ratón.

No se observó unión significativa (>10 veces) con el c-Met de ratón para ninguno de los mAb.

Los mAb ensayados mostraban reactividad cruzada contra c-Met de Rhesus ECD con una unión casi idéntica en comparación con el c-Met ECD de ser humano (Decoy) (Tabla 9).

Tabla 9. CE50 (nM) de la unión de mAb a c-Met de Rhesus o humano (Decoy)

mAb	Rhesus	Humano
38H10	0,17	0,19
40B8	0,13	0,14
36C4	0,14	0,13
20A11	3,4	4,3
13E6	0,19	0,19

mAb	Rhesus	Humano
12G4	0,34	0,42

Ejemplo 6: Competición con HGF por la unión a c-Met

Se llevó a cabo la competición con HGF biotinilado en el extremo N por la unión a c-Met inmovilizado utilizando un ensayo de competición basado en ELISA. Se inmovilizaron cinco $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos anti-His de ratón (Serotech) en una placa maxisorb y, tras el bloqueo con un 1% de caseína en PBS durante 2 h, se añadieron 100 ng/ml de c-Met recombinante dimérico y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Tras el lavado, se añadieron diluciones de anticuerpos y se permitió que se unieran al c-Met capturado durante 30 min, antes de añadir 24 ng/ml de HGF biotinilado en el extremo N (R&D systems, 294-HGN/CF). El HGF biotinilado se incubó a temperatura ambiente durante 1 h antes de lavarlo. Se añadió estreptavidina conjugada con rábano rusticano (estrep-HRP) y se incubó durante una hora adicional. Se añadió TMB y la placa se leyó a 620 nm. Se incluyó un isotipo de control (hlgG1 λ) como control así como un anticuerpo 5D5 murino. La competición se expresó como el porcentaje de competición en comparación con los controles (solo estrep-HRP o hlgG1 λ) y se representó frente a la concentración de anticuerpos. Se calculó una CI_{50} utilizando GraphPad Prism (Tabla 10). Los anticuerpos 13E6 y 20A11 solo desplazaban el HGF parcialmente (aproximadamente un 50%), que puede estar relacionado con el epítipo que estos dos mAb reconocen en el c-Met. La Figura 6 muestra un ejemplo de anticuerpos anti-c-Met que compiten con el HGF por la unión con c-Met.

Tabla 10: CI_{50} de mAb que compiten con HGF por la unión con c-Met

mAbs	CI_{50} (nM)
12G4	0,26
13E6	parcial
20F1	0,36

Ejemplo 7: Propiedades agonistas y antagonistas de los mAb medidos en el ensayo de proliferación utilizando células BxPC3 pancreáticas dependientes de HGF

Las células BxPC3 pancreáticas humanas (ATCC n° de cat. CRL-1687) responden a HGF y se utilizaron para el ensayo de proliferación para investigar los ocho mAb candidatos adicionalmente. En resumen, se sembraron 15.000 células en presencia de suero y privadas de suero durante una noche después de la fijación (4-6 horas tras la siembra). Los mAb se añadieron en dosis desde 20 ng/ml a 40 $\mu\text{g/ml}$ en presencia o ausencia de 75 ng/ml de HGF con el fin de ensayar el antagonismo y agonismo respectivamente. Tras tres días de incubación, se añadió azul alamar a las células y se incubaron a 37 °C durante 4 horas antes de leer la fluorescencia con una excitación de 550 nm y una emisión de 590 nm, dando como resultado una lectura del rendimiento de la proliferación celular. El ensayo se repitió tres veces. Se muestra un ejemplo de un experimento que se llevó a cabo independientemente para agonismo (Figura 7A) y uno para antagonismo (Figura 7B) para los mAb candidatos y mAb de referencia que incluye el 224G11 quimérico (c224G11, Pierre Fabre). La proliferación se expresa como un porcentaje de la proliferación obtenida con 75 ng/ml de HGF. Tres de los mAb (38H10, 40B8 y 36C4) muestran menos del 20% de proliferación inducida, estando el 38H10 en el mismo intervalo que el c224G11 de referencia.

Ejemplo 8: Redistribución de VL para mejorar la afinidad

Se utilizó la redistribución de la cadena VL para mejorar la afinidad de los dos mAb, 38H10 y 48A2. En este método, la cadena pesada del clon parental (VHCH1 de 36C4 o 38H10) se reintrodujo en la biblioteca de fagémidos de cadena ligera (véase el Ejemplo 1). La cadena pesada se extrajo de un vector de expresión, que carecía del gen 3 derivado de bacteriófago necesario para la presentación, para evitar la contaminación adicional de la cadena ligera parental en el procedimiento de selección. La cadena pesada se clonó en la biblioteca de fagémidos de cadena ligera y el ADN ligado se electroporó en células de *E. coli* TG1 para crear la biblioteca redistribuida de cadena ligera. El tamaño de las bibliotecas estaba por encima de 10^8 clones.

Se llevaron a cabo selecciones de afinidad, combinadas con lavados de velocidad de disociación, para seleccionar los Fab de cadena de redistribuida con una afinidad mejorada para c-Met. Se escogió un procedimiento en el que se incubaron diferentes cantidades de fagos que expresaban Fab con diferentes concentraciones de Fc-Met en solución (véase la Tabla 11). Añadiendo el c-Met en exceso sobre el fago, pero en una concentración menor que la constante de afinidad deseada, se favorecía la unión del fago con mayor afinidad. Los complejos Fc-Met: fago se capturaron entonces en una placa de microtitulación revestida con un mAb anti-Fc. La placa se lavó con solución decoy de cMein a 37 °C para evitar la re-unión de fagos disociados al Fc-Met capturado. Cada ronda, el tiempo de lavado aumentaba (véase Tabla 11) para seleccionar los fagos con mejor velocidad de disociación lavando las variantes de afinidad más baja. Los fagos se eluyeron con tripsina y se utilizaron para la infección de células de *E. coli* TG1. En total, se hicieron 5 rondas de selección. Además, la cantidad de entrada de fagos se redujo en las rondas posteriores para reducir el fondo por una parte y por otra parte para disminuir la concentración de mAb

aumentando de esta manera la rigurosidad de la selección.

5 Se llevaron a cabo las exploraciones de al menos 30 clones en las rondas de selección III, IV y V. Los clones se cultivaron en placas de pocillos profundos (1 ml de expresiones) y se prepararon las fracciones periplásmicas. Estos extractos periplásmicos se ensayaron primero por competición con HGF en un ELISA (véase el Ejemplo 2). Para el 38H10 la frecuencia de clones competitivos que daban bajas señales en el ELISA aumentaba en las rondas de selección posteriores, con un claro enriquecimiento de los competidores en las diferentes rondas.

10 Los clones se ensayaron entonces en cuanto a sus constantes de disociación por resonancia de plasmones superficiales. Aproximadamente 3000 RU de Fc-Met se inmovilizaron directamente en un chip CM5 para obtener un perfil de unión claro de los extractos periplásmicos. Los clones con una velocidad de disociación mejorada se enviaron para la secuenciación.

15 Las cadenas ligeras emparejadas originalmente (tanto V Kappa de 38H10 y V Lambda de 36C4) se obtuvieron tras la redistribución de cadenas ligeras, pero se encontró una velocidad de disociación mejorada por encima de la del Fab parental solo para la variante 48A2 de 38H10 (10 veces según la resonancia de plasmones superficiales). Para el 36C4 no se obtuvo mejora en la afinidad por lo que el mAb parental se mantuvo para trabajos posteriores.

Tabla 11: Variación de parámetros en cada ronda de selección para la redistribución de VL

	RI	RII	RIII	RIV	RV
Concentraciones de Fc-Met	24 nM 2,4 nM 0,24 nM	2,4 nM 0,24 nM 0,024 nM	240 pM 24 pM 2,4 pM	24 pM 2,4 pM 0,24 pM	24 pM 2,4 pM 0,24 pM
Vol. de Fagos	10 µl	1 µl	0,1 µl	0,1 µl/0,01 µl	0,1 µl/0,01 µl
Tiempo de lavado	0 h	2 h	O/N	O/3N	O/6N
Condiciones	-	37 °C. 12 nM Decoy Met en un 1% de caseína	37 °C. 1,2 nM Decoy Met en un 1% de caseína	37 °C. 0,12 nM Decoy Met en un 1% de caseína	37 °C. 0,12 nM Decoy Met en un 1% de caseína

20 Varios de Fab con VL redistribuido compartían el domino variable de cadena pesada de 38H10 (SEQ ID NO: 49). Las cadenas ligeras redistribuidas se enumeran posteriormente (las secuencias de aminoácidos y nucleótidos se enumeran en las Tablas 6 y 7) junto con las velocidades de disociación de los Fab correspondientes (cada Fab incluye 38H10 como cadena pesada) (Tabla 19)

25

Tabla 19

VL de Fab redistribuidas	k_{off} (10⁻⁴s⁻¹)
48A1	8,1
48A11	2,5
48B8	3,3
48D2	1,3
48B6	1,2
48A2	2,3
48C8	3,3
48E2	2,9
48E5	1,9
48D7	2,5
38H10	5,0

30 Varias VL de Fab redistribuidas compartían el domino variable de cadena pesada de 36C4Q (SEQ ID NO: 88). Las cadenas ligeras redistribuidas se enumeran posteriormente (las secuencias de aminoácidos y nucleótidos se enumeran en las Tablas 6 y 7) junto con las velocidades de disociación para los correspondientes Fab (cada Fab incluye al 36C4Q como cadena pesada) (Tabla 20).

Tabla 20

VL de Fab redistribuidas	k _{off} (10 ⁻⁴ s ⁻¹)
49A1	1,7
49D2	1,7
49G3	1,9
49D3	8,2
49A11	4,8
49C4	1,8
49E11	6,3
36C4Q	1,7

Ejemplo 9: Propiedades agonistas y antagonistas de mAb medidas en el ensayo de fosforilación utilizando células NSCLC A549 dependientes de HGF

5 Con el fin de investigar adicionalmente los mAb se llevó a cabo un ensayo de fosforilación utilizando las células NSCLC A549 dependientes de HGF (ATCC nº CCL-185). Las células se incubaron tanto en ausencia de HGF con el fin de evaluar la actividad agonista de cada anticuerpo así como en presencia de HGF con el fin de evaluar la potencia antagonista de cada anticuerpo. En resumen se colocaron en placas 40.000 células y se privaron de suero durante una noche después de la fijación a la placa (4-6 h tras la siembra). Las células se trataron entonces durante 10 15 minutos a 37 °C con los mAb. Para el ensayo de antagonismo se añadieron 100 ng/ml de HGF y se incubaron durante otros 15 minutos a 37 °C. También se ensayó el HGF solo (100 ng/ml) para proporcionar los valores de referencia para el experimento. Las células se lavaron con PBS frío y se lisaron con un tampón de lisis suave que contenía PMSF (señalización de célula nº 9803 que incluía 1 mM de PMSF, Sigma Aldrich) durante 15 minutos en 15 hielo. Se añadieron 50 µl del lisado por pocillo en una placa de 96 pocillos pre-revestida con anticuerpo de cabra anti-c-Met y se bloqueó con un 1% de caseína-PBS. Se permitió que el c-Met del lisado se uniera durante una noche a 4 °C. Se reveló el fosfo-c-Met con un anticuerpo de conejo anti-pY1234/1235 (señalización celular) y un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con HRP (Jackson Laboratories). Se añadió TMB y se paró la reacción con 1 M de H₂SO₄ y se leyó a 450 nm.

20 Los anticuerpos se ensayaron por duplicado a diferentes concentraciones, y se incluyeron en cada ejecución los mAb de control U16 (control negativo, un mAb irrelevante), 224G11 quimérico (c224G11, Pierre Fabre) y 224G11 murino (mPF, Pierre Fabre) junto con HGF solo y solo células como controles positivo y negativo. La Figura 9A-B muestra los bajos efectos agonistas de los tres mAb en comparación con los controles. En comparación con la referencia c224G11, los anticuerpos 38H10, 48A2 y 36C4 (no mostrados) daban niveles más bajos de c-Met fosforilado. La Figura 9 muestra la potencia de los mAb 48A2, 36C4 y 40B8 en el bloqueo de la fosforilación inducida por HGF en comparación con el c224G11 de referencia, teniendo el 36C4 la mejor potencia de bloqueo. El porcentaje de fosforilación se expresa como el porcentaje de la fosforilación máxima inducida por 100 ng/ml de HGF.

30 Los ensayos de fosforilación utilizando células BxPC3 se hicieron de la misma manera que en las células A549 y los resultados se correlacionaban muy bien con los obtenidos en las células A549 (datos no mostrados).

Ejemplo 10: Efecto inhibidor de anticuerpos anti-Met sobre la autofosforilación de cMet en células MKN-45.

35 Para examinar la capacidad de los mAb para inhibir la fosforilación en células activadas constitutivamente los inventores utilizaron células MKN-45 gástricas (DMSZ nº de cat. ACC409). Estas células tienen una amplificación genética de c-Met que da como resultado la sobre-expresión de c-Met y por tanto de fosforilación constitutiva, es decir independiente de HGF.

40 En resumen, se sembraron 5000 células en presencia de suero y se incubaron durante 24 h con diferentes concentraciones de los mAb a 37 °C. Se llevó a cabo un ELISA para la cuantificación de c-Met fosforilado como se describe en el Ejemplo 8.

45 En la Figura 10 se puede ver el efecto del bloqueo de los mAb sobre la fosforilación en células MKN-45 (% de inhibición). La respuesta se normalizó contra el control negativo mAb U16.1 (0% de inhibición). Se puede concluir que el anticuerpo SIMPLE™ 36C4 es el inhibidor más potente de la fosforilación independiente de HGF en células MKN-45. El c224G11 no era tan potente como el 36C4 y 48A2. El 40B8 solo bloqueaba alrededor del 40% de la concentración más alta y los niveles disminuían rápidamente.

50

Ejemplo 11: ADCC inducida por anticuerpos en células MKN-45.

Se sembraron 200.000 células MKN-45 el día antes de la adición del anticuerpo. Las diluciones de anticuerpos se añadieron a las células y se pre-incubaron durante 60 minutos antes de añadirse las células efectoras (PBMC derivadas de sangre completa de un donante, incubadas durante la noche anterior a la adición de células diana) con una relación E:T (células citolíticas naturales (NK):línea celular diana) de 5:1. La subpoblación de NK en las PBMC se determinó por citometría de flujo para cada donante como la relación de anti-CD16 respecto a anti-CD56. Tras 4 h de incubación las placas se leyeron utilizando el kit proteasa Dead-Cell (CytoTox-Glo™ Ensayo de Citotoxicidad de Promega (Nº de CAT. G9291)) para dar el porcentaje de células lisadas.

La Figura 11 muestra la lisis específica inducida por tres mAb, 48A2, 40B8 y 36C4, ensayados en cuanto a la respuesta a la dosis en comparación con c224G11. Las CE50 de los mAb ensayados están en el mismo intervalo que c224G11 (4,3, 4,6, 5,0, para 48A2, 40B8 y 36C4 y 2,8 ng/ml para c224G11).

Ejemplo 12: ADCC inducida por 36C4 Potelligent™ en células NCI-H441

Se produjo 36C4 defucosilado en células CHO Potelligent™ (Biowa) y se purificó con Proteína A. Se purificaron aparte las células mononucleares humanas de sangre periférica (PBMC) de 3 donantes a partir de sangre entera heparinizada por separación ficoll convencional y se utilizaron como células efectoras. Las células se suspendieron a 2×10^6 /ml en medio que contenía 200 U/ml de IL-2 humana y se incubaron durante una noche a 37 °C. Al día siguiente, se recolectaron las células adherentes y no adherentes y se lavaron una vez con medio de cultivo.

Se utilizaron relaciones de diana respecto al efector de 1:50. Las células se suspendieron a 5×10^6 células/ml y se añadieron 100 µl por pocillo.

Se incubaron 10^6 células diana NCI-H441 con 100 µCi ^{51}Cr en 0,5 ml FCS durante 60 minutos en un baño de agua a 37 °C. Las células se lavaron, se resuspendieron en 1 ml de FCS y se incubaron durante 30 minutos en un baño de agua a 37 °C. Luego se lavaron las células dos veces con el medio y se llevó a un volumen final de 2×10^6 células/ml y se añadieron 50 µl por pocillo.

El ensayo se llevó a cabo por triplicado. Se incubaron 50 µl de las células marcadas, con 100 µl de células efectoras y 50 µl del anticuerpo. Una fila de la placa de 96 pocillos contenía solo células diana con el fin de controlar la liberación espontánea de ^{51}Cr . En otra placa de 96 pocillos, una fila de pocillos contenía solo células diana tratadas con un 1% de Triton-X (con el fin de lisar completamente las células) dando un resultado de lectura de máxima liberación de ^{51}Cr . Tras una incubación de 4 horas a 37 °C, se recolectaron 50 µl de sobrenadante, se transfirieron a una Lumaplate-96, se secaron y se contaron en un contador beta.

El porcentaje de lisis se determinó por la ecuación: % lisis = (liberación de CPM en la muestra- liberación de CPM espontánea) / (máxima liberación de CPM – liberación espontánea de CPM) x 100. La Figura 12 muestra el porcentaje de lisis de las células NCI-H441 por el 36C4 Potelligent (con ADCC aumentada por defucosilación) frente al 36C4 fucosilado normal. El 36C4 defucosilado (36C4 Potelligent) induce una lisis excelente de células NCI-H441. El porcentaje de lisis inducida por c224G11 era mucho menor. Claramente la defucosilación de 36C4 aumentaba su capacidad para inducir ADCC en células NCI-H441.

Ejemplo 13: Efecto *in vitro* del 36C4 con ADCC aumentada en células NCI-H441

Los mAb no fucosilados por tecnología Potelligent™ no tenían un efecto significativo *in vivo* en ratones. Sin embargo, se ha demostrado que las mutaciones de Fc (S239D, I332E) tenían un efecto *in vivo*, aumentando el efecto de ADCC de los mAb aumentando la afinidad por el FcγRIII de ratón, CD16 (Lazar GA et al, PNAS, 103. 2006).

Se insertaron las mutaciones S239D, I332E en la IgG1 36C4 utilizando mutagénesis dirigida al sitio con cebadores específicos, generando el 36C4E. El 36C4E se produjo de la misma manera que el 36C4 parental utilizando células HEK293E y purificándolo utilizando Proteína A. No había diferencia en los niveles de producción o el nivel de desplazamiento de HGF en un ensayo de competición basado en ELISA tras las mutaciones en comparación con el 36C4 parental. El efecto ADCC se investigó en el ensayo de liberación de ^{51}Cr sobre células NCI-H441 (como se describe en el Ejemplo 12). No había efecto del 36C4 y el 36C4 Potelligent presentaba un porcentaje de lisis ligeramente menor que el 36C4 con Fc mutante con ADCC aumentada. La CE50 para 36C4-POT frente a 36C4 era de 0,04 µg/ml frente a 0,26 µg/ml.

Ejemplo 14: Efecto *in vivo* de 36C4 con ADCC aumentada en xenoinjertos de MKN-45

Se inyectó a ratones CD-1 desnudos de 6-8 semanas de edad por vía subcutánea 3 millones de células MKN-45. Los tumores eran medibles a los 8 días tras las inyecciones y se comenzó el tratamiento el día 9 con inyecciones intraperitoneales dos veces por semana con diferentes cantidades del anticuerpo de control. Se inyectaron grupos de seis ratones con 36C4E (30, 10, 3 y 1 mg/kg) y se midió el volumen de los tumores (en el momento en que se

llevaron a cabo las inyecciones). Se incluyó un isotipo de control IgG1 (Synagis®) como control así como c224G11, ambos a la concentración más alta 30 mg/kg.

El día 23 tras la inyección de las células (15 días después del comienzo del tratamiento) se podía observar un efecto dependiente de la dosis en el volumen tumoral en los ratones tratados con el 36C4E. El c224G11 no tenía efecto sobre el crecimiento tumoral en comparación con el isotipo de control (Figura 13)

Ejemplo 15: Proteínas de fusión c-Met quiméricas humanas-de *Lama glama*

Se construyeron proteínas de fusión quiméricas de c-Met ECD humanas-de *Lama glama* intercambiando el dominio IPT del c-Met humano y de *Lama glama* con el fin de mapear el dominio de reconocimiento de los mAb. La construcción se hizo utilizando metodologías de ADN recombinante convencionales y PCR. Los c-Met de *Lama glama* y humano se amplificaron a partir de ARN convertido en ADNc a partir de los linfocitos de sangre periférica (PBL) de dos donantes de cada especie. El c-Met ECD de llama y humano (aa 25-932) se clonaron en un vector de expresión en eucariotas con un marcador his para la expresión como proteínas solubles por las células HEK293. El IPT1-4 (aa 568-932) de la llama se intercambió con el IPT1-4 humano en el c-Met humano y a la inversa el IPT1-4 humano se intercambió con el IPT1-4 de llama en el c-Met de llama utilizando corte y empalme y PCR de extensión solapada. Las cuatro construcciones, c-Met de llama, IPT llama/humano, c-Met humano, IPT humano/llama se expresaron en células HEK293 y se purificaron en columnas IMAC. La Figura 15 muestra el alineamiento (un 88% de identidad) del c-Met humano (GenBank X54559) con el c-Met de *Lama glama* amplificado a partir de los PBL de dos donantes.

Ejemplo 16: Mapeo del dominio de mAb que utilizan el c-Met ECD quimérico

Se inmovilizaron 200 ng de las diferentes proteínas c-Met recombinantes quiméricas en placas maxisorb durante una noche a 4 °C. Tras lavar con PBS las placas se bloquearon con un 1% de caseína durante 2 h a TA, antes de añadirse los mAb y se permitió que se unieran al c-Met durante 1 h a TA. Tras el lavado, se añadió un anticuerpo de cabra anti-humano conjugado con HRP (diluido 1/5000, Jackson Labs) y se incubó durante 1 h a TA antes de un lavado adicional y la adición de TMB. Se leyó la densidad óptica a 620 nm y los valores se representaron en un gráfico frente a la concentración de mAb.

La Figura 16A muestra la unión del 36C4 al c-Met humano (TS) y a IPT1-4 humano/llama indicando de esta manera la unión a la región SEMA-PSI. La Figura 16B muestra la unión del mAb 13E6 al c-Met humano y al IPT1-4 llama/humano. No se observó unión al c-Met de llama en ninguno de los mAb. También se ensayó el 48A2 pero principalmente mostraba unión a la construcción con el SEMA-PSI humano y algo de unión a la construcción con el IPT humano, indicando que había unión a una región solapada en los dominios PSI-IPT.

Ejemplo 17: Unión de 36C4 y 48A2 a los epítomos no solapados en c-Met utilizando resonancia de plasmones superficiales

Para investigar si los dos mAb 36C4 y 48A2 se unía a los epítomos no solapados, se acoplaron 3000 RU de 36C4 o 48A2 en un chip CM5. Se inyectaron 60 µl de Decoy Met monomérico a 40 µg/ml para formar un complejo en el chip. Se inyectaron 60 µl de 36C4 a 10 µg/ml (Figura 16A). Como se muestra en la Figura 16A, se observaba unión solo al complejo Met:48A2. De manera similar se llevó a cabo la unión del mAb 48A2 al complejo Met:36C4 y el complejo Met:48A2 utilizando 3000 RU de 36C4 o 48A2 acoplados a un chip CM5. Se inyectaron 60 µl de Decoy Met a 40 µg/ml para llevar a cabo un complejo en el chip. Luego se inyectaron 60 µl de 48A2 a 10 µg/ml. Solo se observó la unión al complejo Met:36C4 como se muestra en la Figura 16B. Estos resultados indican el reconocimiento de los epítomos no solapados de los mAb 36C4 y 48A2.

Ejemplo 18: Aumento del efecto inhibitor de la autofosforilación de c-Met utilizando una combinación de anticuerpos anti-c-Met

Los dos mAb 36C4 y 48A2 que reconocían epítomos no solapados en c-Met como se muestra por Biacore (Figura 16), se combinaron en una relación 1:1 en un ensayo de fosforilación independiente de HGF utilizando células MKN-45 como se describe en el Ejemplo 10. La mezcla de anticuerpos se comparó con 36C4 y 48A2 en un intervalo de concentraciones en cuanto a la capacidad para bloquear la autofosforilación de c-Met (nótese que las concentraciones totales de anticuerpos en la mezcla era igual a la concentración total de anticuerpos para los anticuerpos individuales: es decir, para la dosis de 0,2 nM la mezcla era de 0,1 nM de cada uno de 36C4 y 48A2, mientras que para los mAb puros contendrían 0,2 nM de 36C4 o 48A2). La combinación presentaba una inhibición significativamente mejor de la autofosforilación de c-Met en comparación con los mAb individuales. A 0,78 nM de mAb, la mezcla presenta un 75% de inhibición de la fosforilación en comparación con un 42% y un 32% para el 36C4 y 48A2 solos (Figura 17). La combinación de 36C4 y 48A2 también era más potente que los anticuerpos individuales en el bloqueo de la autofosforilación de las células NSCLC EBC-1 (datos no mostrados).

Ejemplo 19: La combinación de mAb no de solapamiento muestra niveles más bajos de agonismo y mejor potencia de bloqueo en un ensayo de fosforilación utilizando células NSCLC A549

Se ejecutó un ensayo de fosforilación utilizando células NSCLC A549 como en el Ejemplo 9 para investigar los mAb 36C4 y 48A2 en combinación (1:1) o individualmente en cuanto a su actividad agonista y actividad antagonista (en ausencia o presencia de HGF respectivamente). El nivel de agonismo era menor en la combinación (36C4 y 48A2) que para cada uno de las mAb solos (Figura 18A) y el efecto de bloqueo de fosforilación inducida por HGF aumentaba significativamente con la combinación (36C4 y 48A2) en comparación con cada mAb solo (Figura 18B).

Ejemplo 20: Inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto U87-MG

Para investigar el efecto inhibitor del mAb 36C4 sobre el crecimiento tumoral *in vivo*, se inyectaron por vía subcutánea 3×10^6 células U87-MG con HGF autocrino (ATCC HTB-14) en el flanco trasero derecho de ratones nu/nu CD1 desnudos. Cuando el tumor alcanzaba $70-120 \text{ mm}^3$ (día 19), se estratificaron los ratones y comenzó el tratamiento con 30 mg/kg de 36C4, c224G11 o el anticuerpo de isotipo de control por vía intraperitoneal (i.p.) dos veces por semana. El tratamiento continuó hasta el día 35 tras la inyección de las células tumorales, en que terminó el experimento. El tamaño del tumor se midió periódicamente durante el experimento cuando se administraban los mAb y los resultados se presentan en la Figura 19. 20 mg/kg de 36C4 inhibía el crecimiento del tumor U87-MG así como el mAb de comparación c224G11.

Ejemplo 21: Alineamiento germinal de 36C4 y 48A2

Las secuencias VH y VL de 36C4 y 48A2 se compararon con BLAST frente a las secuencias VH y VL de la línea germinal humana y el 36C4 estaba relacionado estrechamente con las secuencias de la línea germinal del IGHV4-30*4*01 (identidad de 66/76 con la región marco conservada) e IGLV2-18*02 (identidad de 61/69 con la región marco conservada) El 48A2 estaba relacionado más estrechamente con las secuencias de la línea germinal de IGHV1-46*01 (identidad con la región marco conservada de 66/76) e IGKV4-1*01 (identidad con la región marco conservada de 53/70).

El proceso de alineamiento germinal se llevó a cabo como se describe en el documento WO 2010/001251 y por Baca et al. (J. Biol. Chem. (1997) 272: 10678-10684) y Tsurushita et al. (J. Immunol. Methods (2004) 295: 9- 19). Era una estrategia de biblioteca/fago de presentación, en la que se incorporaban los restos FR que se desviaban de los restos humanos y de llama. La biblioteca de VH36C4 o 48A2 y VL36C4 y 48A2 se creó por ensamblaje genético basado en PCR utilizando oligonucleótidos de solapamiento con mutaciones específicas en ciertas posiciones (identificadas en las Tablas 3 y 4). Las mutaciones se degeneraron con el fin de codificar los aminoácidos humanos así como los de llama, esto iba a evitar completamente la pérdida de unión en el caso del resto de tipo silvestre crítico para la afinidad de unión. Los genes ensamblados se clonaron en un vector fagémido con el CH y CL humanos y se transformaron *E. coli* TG1 generando bibliotecas de un tamaño total de 10^9 clones.

Se utilizaron fagos de presentación, aplicando condiciones rigurosas de selección (3-5 rondas de selección con disminución de la cantidad de antígeno y fago y aumentando la longitud de lavados competitivos con exceso de c-Met), para seleccionar los Fab funcionales (como se ha descrito en el Ejemplo 8). Los clones individuales se seleccionaron por la velocidad de disociación y los mejores resultados se secuenciaron para determinar la identidad de secuencia con el humano. Los clones con > 94% de identidad humana se produjeron por expresión transitoria al transfectarse en células HEK293E y si las producciones eran > 15 µg/ml, se caracterizaron posteriormente.

Tabla 12: Secuencias de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y ligera de las variantes alineadas germinalmente de 36C4

>55A12-54E_VH (SEQ ID NO:92) QVQLVESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISTNYYYWSWIRQSPGKGLEWIGVIAYEGSTDYSPSLKSRV TISRDTSKNQFSLKLSVTAEDTAVYYCARDVRVIATGWATANALDAWGQGLTVTVSS
>55A12-54E_VL (SEQ ID NO:93) QSALTQPPSVSGSPGQSVTISCAGTSSDVGYNVSWYQQPPGTAPKLLIFAVSYRASGVPDRFSGSKS GNTASLTISGLQAEDDYCASRSSNNAAVFGGGTKLTVL
>53E2-54E_VH (SEQ ID NO:94) QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVSGGSISTNYYYWSWIRQHPGKGLEWIGVIAYEGSTDYSPSLKSRV TISVDTSKNQFSLQLSSVTPEDTAVYYCARDVRVIATGWATANALDAWGQGLTVTVSS

<p>>53E2-54E_VL (SEQ ID NO:95)</p> <p>QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQQHPGTAPKLMIFAVSYRASGIPDRFSGSKS</p> <p>GNTAFLTISGLQAEDEADYYCASYRSSNNAAVFGGGTKLTVL</p>
<p>>53E3_VH (SEQ ID NO:96)</p> <p>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSITNNYYYWSWIRQSPGKGLEWIGVIAYEGSTDYSPSLKSRV</p> <p>TISRDTSKNQFSLQLSSVTAEDTAVYYCARDVRVIATGWATANALDAWGQGTLTVSS</p>
<p>>53E3_VL (SEQ ID NO:97)</p> <p>QSVLTQPPSVSGSPGQTVTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQQPLPGTAPKLMIFAVSYRASGIPDRFSGSKS</p> <p>GNTASLTISGLQSEDEADYYCASYRSSNNAAVFGGGTKLTVL</p>
<p>>53A11_VH (SEQ ID NO:98)</p> <p>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSITNNYYYWSWIRQSPGKGLEWIGVIAYDASTDYSPSLKSRV</p> <p>TISRDTSKNQFSLQLSSVTAEDTAVYYCARDVRVIATGWATANALDAWGQGTLTVSS</p>
<p>>53A11_VL (SEQ ID NO:99)</p> <p>QSVLTQPPSVSGSPGQTVTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQQPPGTAPKLMIFAVSYRASGIPDRFSGSKS</p> <p>GNTAFLTISGLQSEDEADYYCASYRSSNNAAVFGGGTKLTVL</p>

Tabla 13: Secuencias de nucleótido que codifican los dominios variables de cadena pesada y ligera de las variantes alineadas germinalmente de 36C4

<p>>55A12-54E_VH (SEQ ID NO:100)</p> <p>CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCGGGCCAGGCCTGGTGAAGCCCTCGCAGACACTCTCCCTCACCTG</p> <p>CACAGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCACCAACTATTACTACTGGAGCTGGATTCGCCAGTCGCCAGG</p> <p>GAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAGTCATAGCTTATGAAGGCAGCACTGACTACAGCCCATCCCTCA</p> <p>AGAGCCGCGTGACCATCTCCAGGGACACGTCCAAAAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTCTGTGACCGCGGA</p> <p>GGACACGGCCGTGATTACTGTGCCAGAGATGTAAGGGTAATCGCTACGGGTTGGGCTACTGCCAATGCTTTG</p> <p>GACGCATGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTGTCTCA</p>
<p>>55A12-54E_VL (SEQ ID NO:101)</p> <p>CAGTCTGCGTTGACGCAGCCTCCTTCCGTGTCTGGGTCTCCAGGACAAAGCGTCACCATCTCCTGT</p> <p>GCAGGAACCAGCAGTGATGTTGGGTATGGAACTATGTCTCCTGGTACCAGCAGCCGCCAGGCAC</p> <p>GGCCCCAAACTCCTGATCTTTGCAGTCAGCTATCGAGCCTCAGGGTTCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGT</p> <p>CAGGCAACACGGCCTCTTTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTACTGTGCCTCATA</p> <p>TAGAAGCAGCAACAATGCTGCTGTGTTCCGGCGAGGGACCAAACTGACCGTCCTA</p>

ES 2 594 493 T3

>53E2-54E_VH (SEQ ID NO:102)

CAGGTGCAGCTCCAGGAGTCGGGCCAGGCCTGGTGAAGCCCTCGCAGACACTCTCCCTCACCTG
CGCAGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCACCAACTATTACTACTGGAGCTGGATTCGCCAGCATCCAGG
GAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAGTCATAGCTTATGAAGGCAGCACTGACTACAGCCCATCCCTCA
AGAGCCGCGTGACCATCTCCGTGGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAACTGAGCTCTGTGA
CCCCGGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGAGATGTAAGGGTAATCGCTACGGGTTGGGCTACTGCCAA
TGCTTTGGACGCATGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA

>53E2-54E_VL (SEQ ID NO:103)

CAGTCTGCGTTGACGCAGCCTCGTTCCGTGTCTGGGTCTCCAGGACAAAGCGTCACCATCTCCTGTGCAGGAA
CCAGCAGTGATGTTGGGTATGGAACTATGTCTCCTGGTACCAGCAGCATCCAGGCACGGCCCCAAACTCAT
GATCTTTGCAGTCAGCTATCGAGCCTCAGGGATTCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCAGGCAACACGGCCT
TTTTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGTGCCTCATATAGAAGCAGCAACAA
TGCTGCTGTGTTCCGGGAGGGACCAAAGTACCCTGTCCTA

>53E3_VH (SEQ ID NO:104)

CAGGTGCAGCTCCAGGAGTCGGGCCAGGCCTGGTGAAGCCCTCGCAGACACTCTCCCTCACCTGCACAGTCT
CTGGTGGCTCCATCACCACCAACTATTACTACTGGAGCTGGATTCGCCAGTCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG
GATTGGAGTCATAGCTTATGAAGGCAGCACTGACTACAGCCATCCCTCAAGAGCCGCGTGACCATCTCCAGG
GACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAACTGAGCTCTGTGACCGCGGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG
CCAGAGATGTAAGGGTAATCGCTACGGGTTGGGC
TACTGCCAATGCTTTGGACGCATGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA

>53E3_VL (SEQ ID NO:105)

CAGTCTGTGTTGACGCAGCCTCCTCCGTGTCTGGGTCTCCAGGACAAACCGTCACCATCTCCTGT
GCAGGAACCAGCAGTGATGTTGGGTATGGAACTATGTCTCCTGGTACCAGCAGCTGCCAGGCAC
GGCCCCAAACTCATGATCTTTGCAGTCAGCTATCGAGCCTCAGGGATTCTGATCGCTTCTCTGG
CTCCAAGTCAGGCAACACGGCCTCTTTGACCATCTCTGGGCTCCAGTCTGAGGACGAGGCTGATTA
TTACTGTGCCTCATATAGAAGCAGCAACAATGCTGCTGTGTTCCGGGAGGGACCAAAGTACCAGG
TCCTA

>53A11_VH (SEQ ID NO:106)

CAGGTGCAGCTCCAGGAGTCGGGCCAGGCCTGGTGAAGCCCTCGCAGACACTCTCCCTCACCTG
CACAGTCTCTGGTGGCTCCATCACCACCAACTATTACTACTGGAGCTGGATTCGCCAGTCGCCAGG
GAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAGTCATAGCTTATGATGCGAGCACTGATTACAGCCCATCCCTCA
AGAGCCGCGTGACCATCTCCAGGGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAACTGAGCTCTGTG
ACCGCGGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGAGATGTAAGGGTAATCGCTACGGGTTGGGC
TACTGCCAATGCTTTGGACGCATGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA

```

>53A11_VL (SEQ ID NO:107)
CAGTCTGTGTTGACGCAGCCTCCTCCGTGTCTGGGTCTCCAGGACAAACCGTCACCATCTCCTGT
GCAGGAACCAGCAGTGATGTTGGGTATGGAACTATGTCTCCTGGTACCAGCAGCCGCCAGGCAC
GGCCCCAAACTCATGATCTTTGCAGTCAGCTATCGAGCCTCAGGGATTCTGATCGCTTCTCTGG
CTCCAAGTCAGGCAACACGGCCTTTTTGACCATCTCTGGGCTCCAGTCTGAGGACGAGGCTGATTA
TTACTGTGCCTCATATAGAAGCAGCAACAATGCTGCTGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAACCTGACCG
TCCTA

```

Ejemplo 22: El alineamiento germinal de 36C4 no da lugar a pérdida de potencia

5 Para el 36C4, se caracterizaron más a fondo cuatro clones alineados germinalmente (55A12-54E, 53E2-54E, 53E3, 53A11) en cuanto a sus propiedades agonistas y antagonistas en el ensayo de fosforilación en A549 como se ha descrito en el Ejemplo 9. Como se muestra en la Figura 20A, no aumentaban las propiedades agonistas en los mAb 55A12-54E y 53E2-54E alineados germinalmente en comparación con el 36C4 parental. Las variantes 53E3 y 53A11 alineadas germinalmente presentaban los mismos resultados. El efecto antagonista de los mAb alineados germinalmente no se alteraba significativamente como se muestra en la Figura 20B, ejemplificada por 55A12-54E y 53E2-54E.

Ejemplo 23: Estabilidad en PBS de los mAb 36C4 alineados germinalmente

15 Se investigó la estabilidad de 3 mg/ml de IgG en PBS + un 0,02% de Tween-80 los días 0-1-7-14-28-56 tras el almacenamiento a 4 °C, TA y 37 °C. Todas las muestras se ensayaron por resonancia de plasmones superficiales en cuanto a su potencia de unión al c-Met acoplado (15.000-17.000 RU) y se determinó la pendiente entre 100-130 segundos a un caudal de 30 µl/min. El porcentaje de mAb funcionales se calculó basándose en la referencia (mAb alineados germinalmente almacenados a -20 °C). La Figura 21 muestra que no había una pérdida significativa de funcionalidad tras 56 días de incubación a diferentes temperaturas y no parecía que hubiera una diferencia significativa entre los cuatro mAb alineados germinalmente.

Ejemplo 24: Termotolerancia de los mAb 36C4 y 48A2 alineados germinalmente

25 Se investigó la termotolerancia de los mAb 36C4 y 48A2 por incubación a diferentes temperaturas durante 1 h antes de que se ejecutaran las muestras (0,5 µg/ml) en el chip CM-5 acoplado con 15.000-17.000 RU de Decoy C-Met y se determinó la pendiente entre 100-130 segundos a un caudal de 30 µl/min. El porcentaje de mAb funcionales se calculó basándose en la referencia (incubada a 4 °C) que se fijó en el 100%. Como se muestra en la Figura 22A, las temperaturas de fusión (CE50) de los mAb alineados germinalmente eran de 67,2 °C para 36C4, 67,1 °C para 55A12-54E, 66,1 °C para 53E2-54E, 68,2 °C para 53E3 y 65,5 °C para 53A11. En cuanto al 48A2, el mAb 56F3 alineado germinalmente, tenía una mejora significativa de la temperatura de fusión de 65,4 a 71,1 °C (Figura 22B).

Ejemplo 25: Determinación de los sitios de unión al péptido c-Met de los mAb 36C4 y 48A2 utilizando c-Met quimérico humano-de llama

35 Para definir adicionalmente los tramos de aminoácidos (aa) de c-Met a los que se unían los mAb 36C4 y 48A2, se prepararon construcciones de c-Met quiméricas que contenían aproximadamente 20-300 intercambios de aa de c-Met humano al de llama utilizando amplificaciones por PCR y ligaduras en el c-Met humano contenido en el vector con un marcador Flag y un marcador estrept. La Figura 23A muestra las construcciones de c-Met quimérico utilizados para el mapeo peptídico de la unión de 36C4 al dominio SEMA, mientras que la Figura 23B muestra las construcciones de c-Met quimérico para el mapeo peptídico de 48A2 que se une al dominio PSI-IPT1.

45 Las quimeras de c-Met llama-humanas se produjeron en células HEK293E y se purificaron utilizando estrept-tactina sepharose HP (2-3 h a 11 °C) antes de lavar las proteínas no unidas. Las proteínas unidas se eluyeron con 2,5 mM de destiobiotina pH 8,2 y se recolectaron fracciones de 1,5 ml. La concentración de proteína se determinó por Nanodrop. La proteína se controló en cuanto a la calidad por SDS-PAGE.

Se realizó un ELISA para investigar la unión de los mAb a las diferentes quimeras. Se inmovilizaron 2 µg/ml de 36C4 o 48A2 y, tras el bloqueo, se añadieron las quimeras de c-Met y se revelaron con 1/10.000 de estreptavidina-HRP (ELISA de la Tabla 16).

50 También se utilizó la resonancia de plasmones superficiales (SPR) para investigar la unión de los mAb a las diferentes quimeras de c-Met llama-humanas. Se acoplaron 3000 RU de 36C4, 48A2 y HGF en un chip CM-5 en 10 mM de NaAc (pH 4,5). Se ejecutaron 60 µl de una solución de 10 µg/ml de las diferentes quimeras de c-Met sobre el chip con un caudal de 30 µl/min y se evaluó la asociación durante 2 min. El chip se regeneró con 20 mM de NaOH y 1 M de NaCl.

La Tabla 16 muestra las quimeras con el c-Met humano y los aminoácidos (comenzando con el aa E en la proteína madura del c-Met humano) que se intercambiaron con los péptidos c-Met de llama y los resultados de la unión utilizando resonancia de plasmones y ELISA. Los resultados eran consistentes y se demuestra que la unión de 36C4 se detiene en el aa 199, indicando un sitio de reconocimiento en los aa 98-199 del c-Met humano. Esta es la parte del dominio SEMA que contiene el sitio de unión a la cadena β de HGF, como se muestra en la estructura cristalina publicada por Stamos et al, (EMBO J, 2004).

El mAb 48A2 se unía a los aa 523-633 del c-Met humano, que cubre tanto la parte de los dominios PSI y el IPT1 indicando el reconocimiento de un epítipo conformacional en ambos dominios.

Se utilizó la transferencia de Western con el c-Met ejecutada en condiciones rigurosas para investigar si 36C4 y el 48A2 se unían a los epítopos lineales o conformacionales. No se observó unión para 36C4 ni 48A2 indicando el reconocimiento de un epítipo conformacional (datos no mostrados), que se confirmó con las proteínas c-Met quiméricas.

Tabla 16: Quimeras c-Met de llama-humanas y resultados de la unión de 36C4 y 48A2 medidos por SPR y ELISA

Quimera	SPR			ELISA (CE ₅₀ ng/ml)	
	HGF	36C4	48A2	36C4	48A2
LS1 (aa 1-98)	+	+	+	68	31
LS2 (aa 1-199)	+	-	+	-	34
LS3 (aa 1-287)	+	-	+	-	50
LS4 (aa 1-348)	+	-	+	-	70
LS5 (aa 1-448)	+	-	+	-	50
LP6 (aa 497-909)	+	+	-	50	-
LP7* (aa 523-909)	+	+	-	55	-
L18 (aa 540-909)	+	+	+/-	47	>40
L19 (aa 572-909)	+	+	+/-	47	>40
L110 (aa 608-909)	+	+	+/-	47	>40
L111 (aa 634-909)	+	+	+	45	42
LMet	-	-	-	-	-
HMet	+	+	+	60	45

*T737I

Secuencia de péptido c-Met humano reconocido por mAb 36C4 (aa 98-199) SEQ ID NO: 181

VDTYYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVV
SALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHPLHSISVRRLKETK

Secuencia del péptido c-Met humano reconocido por el mAb 48A2 (aa 523-633) SEQ ID NO: 136

RSEECLSGTWTQQICLPAIYKVFPN SAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKT
RVLLGNESCITLTLSESTMNTLCKCTVGPAMNKHFNMSIISNGHGTTQYSTFSYVD
P

Ejemplo 26: Regulación negativa del c-Met total por los mAb en células MKN-45

La cantidad de c-Met total presente en la superficie de las células MKN-45 tras la incubación con los mAb se midió utilizando citometría de flujo.

Se sembraron 25.000 células MKN-45 en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h a 37 °C, con un 5% de CO₂. Las células se privaron de suero durante 8 h antes de la adición de los mAb y HGF a 10 o 1 μ g/ml diluidos en medio libre de suero y por triplicado. Se incluyeron el anticuerpo 5D5 murino y el HGF como controles para la regulación negativa del c-Met total. El control negativo es un mAb IgG1 irrelevante producido de la misma manera que el 36C4 y el 48A2.

Las células se lavaron con PBS y se añadieron 50 μ l/pocillo de solución de disociación celular libre de enzimas y se incubaron durante 15 min a 37 °C. Las células se recolectaron en una placa de FACS y se añadieron 100 μ l de tampón de unión (PBS + un 1% de BSA) antes de la centrifugación a 2000 rpm durante 3 min. Las células se mantuvieron a 4 °C desde este punto en adelante. Las células se incubaron entonces durante 1 h con agitado a 4 °C, seguido por el lavado dos veces con el tampón de unión. Se añadió un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con APC (Jackson Lab) a una concentración de 1/500 y se incubaron las células durante 1 h con agitado. Las células se lavaron entonces con tampón de unión y se leyeron en el Calibur FACS. Se recolectaron 2000 eventos y la regulación negativa se expresó como un porcentaje de la regulación negativa en el medio de control.

Los mAb 36C4 y 48A2 no inducen una regulación negativa significativa de c-Met en la superficie de las células MKN-45 en comparación con la de 5D5 o HGF (véase la Figura 24), ambos de los cuales inducían una regulación negativa de c-Met tras la incubación durante una noche.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> arGEN-X B.V.

<120> ANTICUERPOS ANTI-C-MET

10

<130> NLW/P114515WO00

<160> 206

15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia CDR

25

<400> 1

Asp Tyr Ala Met Thr
1 5

30

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Secuencia CDR

<400> 2

Thr Ile Ser Trp Asn Asp Ile Asn Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Met Lys
1 5 10 15

Asp

40

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Secuencia CDR

<400> 3

50

Arg Arg Asp Asn Tyr Tyr Gly Thr Ser Gly Glu Tyr Asp Tyr
1 5 10

55

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 594 493 T3

<220>
<223> Secuencia CDR

<400> 4
5

Asp Tyr Val Met Asn
1 5

<210> 5
<211> 17
10 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia CDR
15

<400> 5

Ala Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Met Lys
1 5 10 15

Gly

20 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Secuencia CDR

<400> 6

Asp Thr Val Val Ser Gly Asn Gly Tyr
1 5

30 <210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Secuencia CDR

<400> 7
40

Asp Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 8
<211> 17
45 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia CDR
50

<400> 8

ES 2 594 493 T3

Ala Ile Ser Trp Asn Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Met Lys
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 9

Asp Leu Ile Gly Ser His Asp Tyr
 1 5

15 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 10

Gly Asn Tyr Tyr Ala Trp Ser
 1 5

25 <210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 11

Val Ile Ala Tyr Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

35 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 12

Gly Pro Gly Trp Tyr Ser Gly Ser Arg Asn Asp Tyr

1 5 10

50 <210> 13
 <211> 5

ES 2 594 493 T3

```

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
  <223> Secuencia CDR

  <400> 13

                                Met Asn Ser Ile Asp
                                1           5

10 <210> 14
    <211> 17
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

15 <220>
    <223> Secuencia CDR

    <400> 14

20      Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
          1           5           10           15

      Gly

25 <210> 15
    <211> 10
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> Secuencia CDR

30 <400> 15

                                Val Asp Asp Tyr Tyr Leu Gly Tyr Asp Tyr
                                1           5           10

35 <210> 16
    <211> 5
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

40 <220>
    <223> Secuencia CDR

    <400> 16

                                Asn Tyr Val Ile Asp
                                1           5

45 <210> 17
    <211> 17
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> Secuencia CDR

50 <400> 17

```

ES 2 594 493 T3

Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Gly Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 18

Leu Glu Asp Tyr Glu Leu Ala Tyr Asp Tyr
 1 5 10

15 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 19

Thr Asn Tyr Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

25 <210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia CDR

35 <400> 20

Val Ile Ala Tyr Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

40 <210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 21

Asp Val Arg Val Ile Ala Thr Gly Trp Ala Thr Ala Asn Ala Leu Asp
 1 5 10 15

Ala

ES 2 594 493 T3

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia CDR

10 <400> 22

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Trp Arg Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 23
<211> 7
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia CDR

20 <400> 23

Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser
1 5

<210> 24
<211> 9
25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia CDR

30 <400> 24

Gln Gln Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 25
<211> 17
35 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia CDR

40 <400> 25

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 26
<211> 7
50 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 594 493 T3

<223> Secuencia CDR

<400> 26

5 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia CDR

15 <400> 27

Gln Gln Gly Val Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 28

20 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia CDR

25 <400> 28

Thr Gly Thr Asn Ser Asp Val Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 29

30 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia CDR

<400> 29

Asp Val Asn Arg Arg Ala Ser
1 5

40 <210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Secuencia CDR

<400> 30

50

Ala Ser Tyr Arg Ser Ala Asn Asn Ala Val
1 5 10

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

55

ES 2 594 493 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia CDR

5

<400> 31

Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Ser
1 5 10

10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia CDR

<400> 32

Ala Val Ser Tyr Arg Ala Ser
1 5

20

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia CDR

30

<400> 33

Ala Ser Tyr Arg Ser Ser Asn Asn Ala Ala Val
1 5 10

35

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Secuencia CDR

<400> 34

Ala Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Asn Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

45

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Secuencia CDR

<400> 35

55

Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

ES 2 594 493 T3

5 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

10 <400> 36

Ala Ser Tyr Arg Ser Ser Asn Asn Val Val
1 5 10

15 <210> 37
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 37

Ala Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Asp Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

25 <210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 38

Asp Val Asn Lys Arg Ala Ser
1 5

35 <210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

40 <400> 39

Ala Ser Tyr Arg Ser Arg Asn Asp Tyr Ala
1 5 10

45 <210> 40
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 40

ES 2 594 493 T3

Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Ser
1 5 10

5 <210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia CDR
<400> 41

Ala Val Ser Thr Arg Ala Ser
1 5

15 <210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia CDR
<400> 42

Ala Ser Tyr Arg Ser Ser Asn Asn Tyr Ala
1 5 10

25 <210> 43
<211> 118
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

30 <400> 43

ES 2 594 493 T3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 44
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 44

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30

Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

ES 2 594 493 T3

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
100 105 110

<210> 45
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia CDR

<400> 45

Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Met Ala Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Trp Asn Asp Ile Asn Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Met
50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Glu Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Arg Arg Asp Asn Tyr Tyr Gly Thr Ser Gly Glu Tyr Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia CDR

<400> 46

ES 2 594 493 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ser Ala Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Met
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Tyr Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Lys Asp Thr Val Val Ser Gly Asn Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 47
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 47

5

10

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Trp Asn Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Met
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ES 2 594 493 T3

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Leu Ile Gly Ser His Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 48
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia CDR
<400> 48

Glu Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Met Thr Gly Asn
20 25 30

Tyr Tyr Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Met Gly Val Ile Ala Tyr Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Thr Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val Ser Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Pro Gly Trp Tyr Ser Gly Ser Arg Asn Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 49
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia CDR
<400> 49

ES 2 594 493 T3

Glu Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Val Glu Leu Arg Asn Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Met Asn
 20 25 30

Ser Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Val Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Val Asp Asp Tyr Tyr Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 50
 <211> 119
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR
 10 <400> 50

Glu Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Leu Arg Asn Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Val Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Gly Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

ES 2 594 493 T3

Val Glu Leu Ser Asn Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Glu Asp Tyr Glu Leu Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 51
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 51

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Thr Asn
 20 25 30

Tyr Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Met Gly Val Ile Ala Tyr Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Ser Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Thr Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Val Arg Val Ile Ala Thr Gly Trp Ala Thr Ala Asn
 100 105 110

Ala Leu Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 52
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 52

ES 2 594 493 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Thr Ala Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Trp Arg
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Leu Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Phe Gln Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 53
 <211> 113
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

10 <400> 53

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Thr Ala Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Leu Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

ES 2 594 493 T3

Ile Ser Ser Phe Gln Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Gly Val Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu
100 105 110

Lys

5 <210> 54
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia CDR

<400> 54

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Asn Ser Asp Val Gly Tyr Gly
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Met Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Val Asn Arg Arg Ala Ser Gly Ile Ala Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Gly Asp Tyr His Cys Ala Ser Tyr Arg Ser Ala
85 90 95

Asn Asn Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Phe Val Leu
100 105 110

15 <210> 55
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia CDR

<400> 55

25 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

ES 2 594 493 T3

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Phe Ala Val Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Phe Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Ser Ser
85 90 95

Asn Asn Ala Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 56
<211> 110
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia CDR

<400> 56

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Asn Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Ser Ser
85 90 95

Asn Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

15 <210> 57

ES 2 594 493 T3

<211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 57

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Leu Gly Lys
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Asp Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Val Asn Lys Arg Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Ser Arg
 85 90 95

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

10

<210> 58
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia CDR

20 <400> 58

ES 2 594 493 T3

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

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

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Val Ser Thr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Ser Ser
 85 90 95

Asn Asn Tyr Ala Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

5 <210> 59
 <211> 383
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 59

cagggtgcagc tcgtggagtc gggcccaggc ctggtgaagc cctcgcagac actctccctc 60
 acctgcgctg tctctggtgg ctccatcaca accaactatt actactggag ctggattcgc 120
 cagtccccag ggaaggggct ggagtggatg ggagtcatag cttatgatgg cagcactgac 180
 tacagcccat ccctcaagag ccgcacttcc atctccaggg acacgtccaa gaaccagttc 240
 tcctgcagc tgagctctgt gaccctgag gacacggccg tgtattactg tgccagagat 300
 gtaagggtaa tcgctacggg ttgggctact gccaatgctt tggacgcatg gggccagggg 360
 accctggtca ctgtctctc agc 383

15 <210> 60
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 60

ES 2 594 493 T3

gaggtccagc tgggtgcagcc aggggttgaa ctgagaaacc ctggggcatc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata cattttcacc atgaactcaa tagactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaaga attgaccctg aagatgggtg cacaaagtat 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccttc actgcagaca cgtccaccag cacagcctac 240
 gtggagctga acagtctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagtagat 300
 gactattacc tagggtatga ctactggggc caggggaccc aggtcaccgt ctctca 357

5 <210> 61
 <211> 358
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 61

gaggtccagc tgggtgcagcc aggggctgag ctgagaaacc ctggggcatc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc aactacgtca tagactgggt acgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaaga attgaccctg aaaacgggtg cacgaggtat 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccttc actgcagaca cgtccaccag cacagcctac 240
 gtggagttga gcaatctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagactggaa 300
 gactacgaat tggcttatga ctactggggc caggggaccc aggtcaccgt ctcttcag 358

15 <210> 62
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 62

caggtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacttttgat gattatgcca tgagctgggt ccgacaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagctgga atggtagtag cacatactat 180
 gcagaatcca tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgaa atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaaagatcta 300
 ataggatccc atgactactg gggccagggg acccaggtca ccgtgtcctc a 351

25
 30 <210> 63
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 594 493 T3

<223> Secuencia CDR

<400> 63

	cagttgcagc tgggtggagtc tgggggaggc atggcgcagc ctgggggggtc tctgaaactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt cactttcgat gattatgcc a tgacctgggt cgcacaggct	120
	ccaggggaagg ggctggagtg gctctcaact attagctgga atgacattaa cacatactat	180
	gcagaatcca tgaaggaccg attcaccatc tccagagaca acgcccaagaa cacgctgtat	240
	ctgcaaatga acagtctcga atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaaacgtagg	300
	gataattact acgggacttc cggggagtat gactactggg gccaggggac ccaggtcacc	360
5	gtctctca	369

<210> 64

<211> 354

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia CDR

15 <400> 64

	cagggtgcagc tgcaggagtc ggggggagac ttgggtgcagc cgggggggtc tctgagactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt cacttttgat gattatgtca tgaactgggt cgcacaggct	120
	ccaggggaagg ggctggagtg gatctcagct attaactgga atggtggtag cacatactat	180
	gcagaatcca tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgcccaagaa cacgctgtat	240
	ctgcaaatgt acagtctgca atctgacgac acggccgtgt attactgtgt aaaagatacg	300
	gtagtgtctg gtaatggcta ctggggccag gggaccagg tcaccgtgct ctca	354

<210> 65

20 <211> 333

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia CDR

<400> 65

	cagtctgtgt tgacgcagcc tcctccgtg tctgggtctc caggaaagac ggtcaccatc	60
	tcctgtgcag gaaccagcag tgatgttggg tatggaaact atgtctcctg gtaccagcag	120
	ctcccaggca cggcccccaa actcctgac tttgcagtca gctatcgagc ctccaggatc	180
	cctgatcgt tctctggctc caagtcaggc aacacggcct ttttgaccat ctctgggctc	240
	cagtccgagg acgaggctga ttattactgt gcctcatata gaagcagcaa caatgctgct	300
	gtgttcggcg gagggacca tctgaccgtc ctg	333

30

ES 2 594 493 T3

<210> 66
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia CDR

10

<400> 66

gaaattgtga tgacgcagtc tcccagctcc gtgactgcgt ctgcaggaga gaaggtcacc 60
 atcaattgta agtccagcca gagtgtgtta tggcgctcca accagaaaa ctacttagct 120
 tgggtaccagc agagacttgg acagtctcct aggctgctca tcagctgggc atccatccga 180
 gaatcggggg ttctgatcg attcagcggc agtgggtcca caacagattt cactcttacc 240
 atcagcagct tccagcctga agacgcggca gtgtattact gccaacaggg ttatagtttt 300
 ccatatacat tcggcagtgg gaccaggctg gaaatcaaa 339

<210> 67
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia CDR

20

<400> 67

cagtctgccc tgactcagcc tccctccgtg tccggaactc tgggaaagac ggtcaccatc 60
 tcttgcgctg gaaccagcag tgacattggg aactataact atgtctcctg gtatcaacag 120
 ctcccaggaa cagcccccaa actcctgata tatgagggtca ataaacgacc ctcagggatc 180
 cctgatcgct tctctggctc caagtcaggc aacacggcct ccctgagcat ctctgggctc 240
 cagtctgagg acgaggctga ttattactgt gcctcatata gaagcagcaa caatgtttgtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctc 330

25

<210> 68
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 68

ES 2 594 493 T3

cagtctgtgt tgacgcagcc tccctccgtg tccggaactc tgggaaagac ggtcaccatc 60
 tcctgcgctg gaaccagcag tgacattggg gactataact atgtctcctg gtatcaacag 120
 ctcccaggaa cggcccccaa actcctgata tatgacgtca ataaacgagc ctcagggatc 180
 cctgatcgct tctctggctc caagtcagggc aacacggcct cctgagcat ctctgggctc 240
 cagtctgagg acgaggctga ttattactgt gcctcatata gaagcaggaa cgattatgcc 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctc 330

5 <210> 69
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 69

caggctgtgc tgactcagcc tccctccgtg tccggaactc tgggaaagac gctcaccatc 60
 tcctgcgctg gaaccagcag tgatgttggg tacggaaact atgtctcctg gtaccaacag 120
 ctcccaggca cggcccccaa actcctgata tatgcagtca gcactcgagc ctcagggatc 180
 cctgatcgct tctctggctc caagtcagggc aacacggcct cctgacat ctctgggctc 240
 cagtctgagg acgaggctga ttattactgt gcctcatata gaagcagcaa caattatgag 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctc 330

15 <210> 70
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 70

gatattgtga tgaccagac tcccagctcc gtgactgctg ctgcaggaga gaaggtcacc 60
 atcaattgta agtccagcca gagtgtgta ttgagctcca accagaaaa ctacttagct 120
 tgggtaccagc agagacttgg acagtctcct aggtgctca totactgggc atccaccgca 180
 gaatcggggg ttctgatcg attcagcggc agtgggtcca caacagattt cactcttacc 240
 atcagcagct tccagcctga agacgcggca gtgtattact gccagcaggg tgtaagtttt 300
 ccacttacgt tcggccaggg gaccaaggtg gaactcaaa 339

25 <210> 71
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 594 493 T3

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 76

10 Ser Ser Trp Asp Asp Ser Val Ser Gly Pro Val
 1 5 10

<210> 77
 <211> 120
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR
 20 <400> 77

Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Glu Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Tyr Lys Gly Gly Gly Pro Lys Tyr Ala Asn Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Leu Gly Asp Phe Gly Ser Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

25 <210> 78
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 78

ES 2 594 493 T3

Gln Ala Gly Leu Thr Gln Leu Ser Ser Met Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Thr Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Gly Gly
 20 25 30
 Tyr Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Ser Asn Ile Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ile Ser Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Asp Ser
 85 90 95
 Val Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Ser Leu Thr Val Leu
 100 105 110

5 <210> 79
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 79

gagttgcagc tgggtggagtc tgggggagcc ttggtgcagc ctgggggggtc tctgagactc 60
 tcctgtgtag agtctggatt caccttcagt agttatgcca tgagctgggt cgcaccaggct 120
 ccaggaaagg ggctcgagtg ggtctcaggt atttataaag gtgggtggtcc aaaatatgca 180
 aactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac gctgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtttatt actgtgcaaa atcgggggtac 300
 ggtagtagcc ttggggactt tggttcctgg gccagggga cccagggtcac cgtctcctcg 360

15 <210> 80
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR

25 <400> 80

ES 2 594 493 T3

gaggtgcagg tgcaggagtc gggcccaggc ctggtgaagc cctcgcagac gctctccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatgaca ggcaactatt atgcttggag ctggatccgc 120
 cagccccag ggaaggggct ggagtggatg ggagtcatag cttatgatgg cagcacttac 180
 tacagcccat ccctcaagag ccgcacttct atctccaggg acacgtccaa gaaccagttc 240
 tccttgcagt tgagctctgt gagccctgag gacacggccg tgtattactg tgccagaggc 300
 ccagggtggt atagtggtag caggaatgac tactgggggc aggggaccca ggtcacctgc 360
 tcctca 366

5 <210> 81
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 81

gcacaggcag ggctgactca gctgtcctcc atgtctggat ccccgggcca gacggtcacc 60
 atcacctgca caggaagcag cagcaacatc gggggtggtt attatttgag ctggtaccaa 120
 catctgccag gaacggcccc caaactcctg atctacagta acatcaatag ggcctcgggg 180
 gtcccggacc gcttctctgg ctccacgtcg ggcattctcg cctccctgac taccactggg 240
 ctccaggctg aggacgaggc tgactattac tgttcacatc gggatgacag cgtcagtggt 300
 cctgtgttcg ggggagggac cagtctgacc gtcttc 336

15 <210> 82
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR

25 <400> 82

cagtctgcc tgactcagcc tcctccgtg tctgggtctc caggaaagac ggtcaccatc 60
 tcctgtacag gaaccaacag tgatgttggg tacggaaact atgtctcctg gtaccagcag 120
 ctcccaggaa tggcccccaa actcctgata tatgacgtca atagacgggc ctccagggatc 180
 gctgatcgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct cctgaccat ttctgggctc 240
 cagtctgagg acgaggggtga ttatcattgt gcctcatata gaagtgccaa caatgctgtg 300
 ttcggcggag ggacccatct gttcgtcctg 330

30 <210> 83
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 594 493 T3

<220>
<223> Secuencia CDR

<400> 83

5

Val Ile Ala Tyr Glu Gly Ser Thr Asp Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 84
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Secuencia CDR

15

<400> 84

Val Ile Ala Tyr Asp Ala Ser Thr Asp Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

20

<210> 85
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Secuencia CDR

<400> 85

Arg Ile Asp Pro Glu Glu Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

30

Gly

<210> 86
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Secuencia CDR

40

<400> 86

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Secuencia CDR
<400> 87

50

ES 2 594 493 T3

Gln Gln Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr Ser
 1 5

5 <210> 88
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia CDR
 10 <400> 88

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Thr Asn
 20 25 30

Tyr Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Met Gly Val Ile Ala Tyr Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Ser Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Thr Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Val Arg Val Ile Ala Thr Gly Trp Ala Thr Ala Asn
 100 105 110

Ala Leu Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

15 <210> 89
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 89

ES 2 594 493 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Thr Ser Val Thr Ala Ser Ala Gly
1 5 10 15

Asp Lys Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Leu Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Asn Phe Gln Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr Ser Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile
100 105 110

Arg

5 <210> 90
<211> 381
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia CDR

<400> 90

```
cagggtgcagc tcgtggagtc gggcccaggc ctggtgaagc cctcgcagac actctccctc 60
acctgogctg tctctgggtg ctccatcaca accaactatt actactggag ctggattcgc 120
cagtccccag ggaaggggct ggagtggatg ggagtcatag cttatgatgg cagcactgac 180
tacagcccat ccctcaagag ccgcacttcc atctccaggg acacgtccaa gaaccagttc 240
tcctcgcagc tgagctctgt gaccctgag gacacggccg tgtattactg tgccagagat 300
gtaagggtaa tcgctacggg ttgggtact gccaatgctt tggacgcatg gggccagggg 360
accaggtca ccgtgtcctc a 381
```

15 <210> 91
<211> 339
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia CDR

ES 2 594 493 T3

<400> 91

```

gatattgtga tgaccagac tcccacctcc gtgactgcat ctgcaggaga caaggtcacc      60
atcaattgta agtccagcca gagtgtgta ttcagctcca accagaaaaa ctacttagct      120
tggtaccagc agagacttgg acagtctcct aggctgctca tctactgggc ttccatccga      180
gaatcggggg ttcctgatcg attcagoggc agtgggtccg caacagattt cacgctaacc      240
atcagcaact tccagcctga agacgcggca gtatattact gccagcaggg ttatagtttt      300
ccatatagtt tcggcagtgg gaccaggctg gaaatcaga                               339
    
```

5 <210> 92
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 92

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1                               5                               10                               15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Asn
                20                               25                               30

Tyr Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
                35                               40                               45

Trp Ile Gly Val Ile Ala Tyr Glu Gly Ser Thr Asp Tyr Ser Pro Ser
                50                               55                               60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65                               70                               75                               80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                               90                               95

Cys Ala Arg Asp Val Arg Val Ile Ala Thr Gly Trp Ala Thr Ala Asn
                100                               105                               110

Ala Leu Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                115                               120                               125
    
```

15
 <210> 93
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR

ES 2 594 493 T3

<400> 93

```

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1           5           10           15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly
          20           25           30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
          35           40           45

Leu Ile Phe Ala Val Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
          50           55           60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65           70           75           80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Ser Ser
          85           90           95

Asn Asn Ala Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105          110

```

5 <210> 94
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 94

ES 2 594 493 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Asn
 20 25 30

Tyr Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Val Ile Ala Tyr Glu Gly Ser Thr Asp Tyr Ser Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Val Arg Val Ile Ala Thr Gly Trp Ala Thr Ala Asn
 100 105 110

Ala Leu Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 95
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 95

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly
 20 25 30

ES 2 594 493 T3

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Phe Ala Val Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Phe Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Ser Ser
 85 90 95

Asn Asn Ala Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 96
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 96

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Thr Asn
 20 25 30

Tyr Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Val Ile Ala Tyr Glu Gly Ser Thr Asp Tyr Ser Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Val Arg Val Ile Ala Thr Gly Trp Ala Thr Ala Asn
 100 105 110

Ala Leu Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 97

ES 2 594 493 T3

<211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 97

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Phe Ala Val Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Ser Ser
 85 90 95

Asn Asn Ala Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

10

<210> 98
 <211> 127
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

20 <400> 98

ES 2 594 493 T3

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly
 20 25 30
 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Met Ile Phe Ala Val Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Phe Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Ser Ser
 85 90 95
 Asn Asn Ala Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

5 <210> 100
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 100

caggtgcagc tcgtggagtc gggcccaggc ctggtgaagc cctcgcagac actctccctc 60
 acctgcacag tctctggtgg ctccatcagc accaactatt actactggag ctggatctgc 120
 cagtcgccag ggaaggggct ggagtggatt ggagtcatag cttatgaagg cagcactgac 180
 tacagcccat ccctcaagag cgcggtgacc atctccaggg acacgtccaa aaaccagttc 240
 tccctgaaac tgagctctgt gaccgoggag gacacggccg tgtattactg tgccagagat 300
 gtaagggtaa tcgctacggg ttgggctact gccaatgctt tggacgcatg gggccagggg 360
 accctggtca cegtgtcctc a 381

15 <210> 101
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 101

ES 2 594 493 T3

cagtctgcgt tgacgcagcc tccttccgtg tctgggtctc caggacaaag cgtcaccatc 60
 tcctgtgcag gaaccagcag tgatgttggg tatggaaact atgtctcctg gtaccagcag 120
 ccgccaggca cggcccccaa actcctgata tttgcagtca gctatcgagc ctcaggggtt 180
 cctgatcgct tctctggctc caagtcaggc aacacggcct ctttgaccat ctctgggctc 240
 caggctgagg acgaggctga ttattactgt gcctcatata gaagcagcaa caatgctgct 300
 gtgttcggcg gagggaccaa actgaccgtc cta 333

5 <210> 102
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 102

caggtgcagc tccaggagtc gggcccaggc ctggtgaagc cctcgcagac actctccctc 60
 acctgcgcag tctctgggtg ctccatcagc accaactatt actactggag ctggattcgc 120
 cagcatccag ggaaggggct ggagtggatt ggagtcatag cttatgaagg cagcactgac 180
 tacagcccat ccctcaagag ccgcgtgacc atctccgtgg acacgtccaa gaaccagttc 240
 tccttgcaac tgagctctgt gaccccgag gacacggccg tgtattactg tgccagagat 300
 gtaagggtaa tcgctacggg ttgggtact gccaatgctt tggacgcatg gggccagggg 360
 accctggtca ccgtgtcctc a 381

15 <210> 103
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 103

cagtctgcgt tgacgcagcc tcgttccgtg tctgggtctc caggacaaag cgtcaccatc 60
 tcctgtgcag gaaccagcag tgatgttggg tatggaaact atgtctcctg gtaccagcag 120
 catccaggca cggcccccaa actcatgata tttgcagtca gctatcgagc ctcagggatt 180
 cctgatcgct tctctggctc caagtcaggc aacacggcct ttttgaccat ctctgggctc 240
 caggctgagg acgaggctga ttattactgt gcctcatata gaagcagcaa caatgctgct 300
 gtgttcggcg gagggaccaa actgaccgtc cta 333

25 <210> 104
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 594 493 T3

<220>
<223> Secuencia CDR

<400> 104

5

```

caggtgcagc tccaggagtc gggcccaggc ctggtgaagc cctgcgagac actctcctc      60
acctgcacag tctctggtgg ctccatcacc accaactatt actactggag ctggattcgc      120
cagtctccag ggaaggggct ggagtggtt ggagtcatag cttatgaagg cagcactgac      180
tacagcccat ccctcaagag ccgcgtgacc atctccaggg acacgtccaa gaaccagttc      240
tccttgcaac tgagctctgt gaccgaggag gacacggccg tgtattactg tgccagagat      300
gtaagggtaa tcgctacggg ttgggtact gccaatgctt tggacgcatg gggccagggg      360
accctggtca ccgtgtctc a                                          381
    
```

<210> 105
<211> 333
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Secuencia CDR

15

<400> 105

```

cagtctgtgt tgacgcagcc tcctccgtg tctgggtctc caggacaaac cgtcaccatc      60
tcctgtgcag gaaccagcag tgatgttggg tatggaaact atgtctctg gtaccagcag      120
ctgccaggca cggcccccaa actcatgac tttgcagtca gctatcgagc ctcagggatt      180
cctgatogct tctctggctc caagtcaggc aacacggcct ctttgaccat ctctgggctc      240
cagtctgagg acgaggctga ttattactgt gcctcatata gaagcagcaa caatgctgct      300
gtgttcggcg gagggaccaa actgaccgtc cta                                          333
    
```

<210> 106
<211> 381
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Secuencia CDR

<400> 106

ES 2 594 493 T3

caggtgcagc tccaggagtc gggcccaggc ctggtgaagc cctcgcagac actctccctc 60
 acctgcacag tctctggtgg ctccatcacc accaactatt actactggag ctggattcgc 120
 cagtcgccag ggaaggggct ggagtggatt ggagtcatag cttatgatgc gagcactgat 180
 tacagcccat ccctcaagag ccgcgtgacc atctccaggg acacgtccaa gaaccagttc 240
 tccttgcaac tgagctctgt gaccgcggag gacacggccg tgtattactg tgccagagat 300
 gtaagggtaa tcgctacggg ttgggtact gccaatgctt tggacgcatg gggccagggg 360
 accctggtca ccgtgtcctc a 381

5 <210> 107
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 107

cagtctgtgt tgaocgagcc tccttccgtg tctgggtctc caggacaaac cgtcaccatc 60
 tcctgtgcag gaaccagcag tgatgttggg tatggaaact atgtctcctg gtaccagcag 120
 ccgccaggca cggcccccaa actcatgatc tttgcagtca gctatcgagc ctcagggatt 180
 cctgatcgct tctctggctc caagtcaggc aacacggcct ttttgaccat ctctgggctc 240
 cagtctgagg acgaggctga ttattactgt gcctcatata gaagcagcaa caatgctgct 300
 gtgttcggcg gagggaccaa actgaccgtc cta 333

15 <210> 108
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 108

ES 2 594 493 T3

Glu Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Met Asn
 20 25 30
 Ser Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Glu Glu Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Asp Asp Tyr Tyr Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 109
- <211> 113
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia CDR
- <400> 109

ES 2 594 493 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Met Asn
 20 25 30

Ser Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Glu Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Val Asp Asp Tyr Tyr Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 111
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia CDR

10

<400> 111

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Thr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

ES 2 594 493 T3

Glu Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
 100 105 110

Arg

- <210> 112
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia CDR
- <400> 112

5

10

Glu Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Met Asn
 20 25 30

Ser Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Glu Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Val Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

ES 2 594 493 T3

Ala Arg Val Asp Asp Tyr Tyr Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

- 5 <210> 113
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia CDR
- <400> 113

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Glu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
 100 105 110

Arg

- 15 <210> 114
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Secuencia CDR
- <400> 114

Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

25

ES 2 594 493 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Met Asn
 20 25 30

Ser Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Glu Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Val Asp Asp Tyr Tyr Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 115
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia CDR

10

<400> 115

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Thr Ser Val Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
 100 105 110

Arg

5 <210> 116
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia CDR
 10 <400> 116

Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Met Asn
 20 25 30

Ser Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Glu Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Val Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Val Asp Asp Tyr Tyr Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

15 <210> 117
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 117

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

25

ES 2 594 493 T3

Glu Lys Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 118
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 118

Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Leu Arg Asn Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Met Asn
 20 25 30

Ser Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Glu Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

ES 2 594 493 T3

Ala Arg Val Asp Asp Tyr Tyr Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 119
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 119

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Thr Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

15 <210> 120
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 120

25 Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

ES 2 594 493 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Met Asn
 20 25 30

Ser Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Glu Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Val Asp Asp Tyr Tyr Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 121
- <211> 113
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia CDR
- <400> 121

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Thr Ser Leu Ala Pro Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

ES 2 594 493 T3

Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr Ser Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

5 <210> 122
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 122

gaggtccagc tggcgcagcc aggggcggaa gtgaaaaaac ctggggcatc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata catcttcacc atgaactcaa tagactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaaga attgaccctg aagaggggtg cacaaagtat 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg actgcagaca cgtccaccag cacagcctac 240
 atggagctga gcagtctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagtagat 300
 gactattacc ttgggtatga ctactggggc caggggaccc aggtcaccgt ctctca 357

15 <210> 123
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 123

gatattgtga tgaccagag ccccgattcc ttggcagcgt ctttaggaga acgtgtgacc 60
 atcaattgta agtccagcca gagtgtgta ttcagctcca accagaaaa ctacttagct 120
 tggcaccagc agagaccggg acagtctcct aagctgctca tctactgggc ttccatccga 180
 gaatcggggg ttctgatcg attcagcggc agtgggtccg gcacagattt cacgctaacc 240
 atcagctctc ttcaggctga agacgtggca gtatattact gccagcaggg ttatagtttt 300
 ccatatagtt tcggcagtgg gaccaggctc gagatcaaa 339

25

30 <210> 124
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

35 <400> 124

ES 2 594 493 T3

caggtccagc tgggtgcagtc tggggcggaa gtgaaaaaac ctggggcatc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc atgaactcaa tagactgggt gcgagaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaaga attgaccctg aagagggtgg cacaaagtat 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccttc actcgagaca cgtccaccag cacagcctac 240
 atggagctga gcagtctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagtagat 300
 gactattacc ttgggtatga ctactggggc caggggaccc aggtcacctg ctctca 357

5 <210> 125
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 125

gatattgtga tgaccagag ccccgattcc ttgacagcgt ctttaggaga acgtgtgacc 60
 atcaattgta agtccagcca gagtgtgtta ttcagctcca accagaaaa ctacttagct 120
 tggtagcagc agaaaccggg acagtctcct aagctgetca tctactgggc ttccatccga 180
 gaatcggggg ttctgatcg attcagcggc agtgggtccg gcacagattt cagcctaacc 240
 atcagctctc ttcagcctga agacgtggca gtatattact gccagcaggg ttatagtttt 300
 ccatatagtt tcggccaggg caccaggctc gagatcaga 339

15 <210> 126
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 126

gaggtccagc tgggtgcagcc aggggcggaa gtgaaaaaac ctggggcatc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc atgaactcaa tagactgggt gcgagaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaaga attgaccctg aagagggtgg cacaaagtat 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccttc actcgagaca cgtccaccag cacagcctac 240
 gtggagctga gcagtctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagtagat 300
 gactattacc ttgggtatga ctactggggc caggggaccc tggtcaccgt ctctca 357

25
 30 <210> 127
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 594 493 T3

<220>

<223> Secuencia CDR

<400> 127

5

```

gatattgtga tgaccagag ccccgattcc ttggcagtgt ctgaaggaga acgtgtgacc      60
atcaattgta agtccagcca gagtgtgta ttcagctcca accagaaaaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccggg acagtctcct aggctgctca tctactgggc ttccatccga      180
gaatcggggg ttcctgatcg attcagcggc agtgggtccg ccacagattt cacgctaacc      240
atcagctctc ttcagctga agacgtggca gtatattact gccagcaggg ttatagtttt      300
ccatatagtt tcggccaggg gaccaggctc gagatcaga      339
    
```

<210> 128

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia CDR

<400> 128

15

```

caggtccagc tgggtgcagc aggggtggaa gtgaaaaaac ctggggcatc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc atgaactcaa tagactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaaga attgacctg aagaggggtg cacaaagtat      180
gcacagaagt tccagggcag agtcacctc actgcagaca cgtccaccag cacagcctac      240
atggagctga gcagtctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagtagat      300
gactattacc ttgggtatga ctactggggc caggggaccc aggtcaccgt ctctca      357
    
```

20

<210> 129

<211> 339

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia CDR

<400> 129

```

gatattgtga tgaccagag ccccacctcc gtggcagtgt ctttaggaga acgtgagacc      60
atcaattgta agtccagcca gagtgtgta ttcagctcca accagaaaaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccggg acagcctcct aggctgctca tctactgggc ttccatccga      180
gaatcggggg ttcctgatcg attcagcggc agtgggtccg gcacagattt cacgctaacc      240
atcagctctc ttcagcctga agacgtggca gtatattact gccagcaggg ttatagtttt      300
ccatatagtt tcggccaggg gaccaggctc gagatcaga      339
    
```

30

<210> 130

ES 2 594 493 T3

<211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 130

cagggtccagc tgggtgcagcc agggggcggaa gtgaaaaaac ctggggcatc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ottctggata caccttcacc atgaactcaa tagactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaaga attgaccctg aagaggggtg cacaaagtat 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccttc actgcagaca cgtccaccag cacagcctac 240
 gtggagctga acagtctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagtagat 300
 10 gactattacc ttgggtatga ctactggggc caggggaccc aggtcacctg ctctca 357

<210> 131
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia CDR

20 <400> 131

gatattgtga tgaccagag ccccgattcc ttggcagtgt ctttaggaga aaaggtgacc 60
 atcaattgta agtccagcca gagtgtgtta ttcagctcca accagaaaa ctacttagct 120
 tggtagcagc agagaccggg acagcctcct aagctgctca tctactgggc ttccatccga 180
 gaatcggggg ttctgatcg attcagcggc agtgggtcog ccacagattt cacgctaacc 240
 atcagctctc ttcagcctga agacgtggca gtatattact gccagcaggg ttatagtttt 300
 ccatatagtt tcggccaggg gaccaggctc gagatcaaa 339

<210> 132
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia CDR

30 <400> 132

ES 2 594 493 T3

gaggtccagc tgggtgcagcc aggggocggaa ctgagaaacc ctggggcatc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc atgaactcaa tagactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaaga attgaccctg aagaggggtg cacaaagtat 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg actcgagaca cgtccaccag cacagcctac 240
 atggagctga gcagtctgag atctgaggac acggccctgt attactgtgc gagagtagat 300
 gactattacc ttgggtatga ctactggggc caggggaccc aggtcaccgt ctctca 357

5 <210> 133
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 133

gatattgtga tgaccagac ccccgattcc ttggcagtgt ctgcaggaga acgtgtgacc 60
 atcaattgta agtccagcca gagtgtgta ttcagctcca accagaaaa ctacttagct 120
 tggtagcagc agaaaccggg acagtctcct aagctgetca tctactgggc ttccatccga 180
 gaatcggggg ttctgatcg attcagcggc agtgggtccg gcacagattt tacgctaacc 240
 atcagctctc ttcagcctga agacgtgaca gtatattact gccagcaggg ttatagtttt 300
 ccatatagtt tcggccaggg gaccaggctc gagatcaaa 339

15 <210> 134
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 134

caggtccagc tgggtgcagcc aggggocggaa gtgaaaaaac ctggggcatc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata catcttcacc atgaactcaa tagactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaaga attgaccctg aagaggggtg cacaaagtat 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg actgcagaca cgtccaccag cacagcctac 240
 atggagctga acagtctgag atctgaggac acggccctgt attactgtgc gagagtagat 300
 gactattacc ttgggtatga ctactggggc caggggaccc tggtcaccgt ctctca 357

25 <210> 135
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 594 493 T3

<223> Secuencia CDR

<400> 135

```

gatattgtga tgaccagac cccacctcc ttggaccgt ctgcaggaga acgtgcgacc      60
atcaattgta agtcagcca gagtgtgta ttcagctcca accagaaaaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccggg acagcctcct aagctgctca tctactgggc ttccatccga      180
gaatoggggg ttctgatcg attcagggc agtgggtccg ccacagattt cacgctaacc      240
atcagctctc ttcagcctga agacgtggca gtatattact gccagcaggg ttatagtttt      300
ccatatagtt tcggcagtgg gaccaggctc gagatcaaa      339
5

```

<210> 136

<211> 111

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia CDR

15 <400> 136

```

Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile Cys Leu
1           5           10
Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu Gly Gly
20          25          30
Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg Asn Asn
35          40          45
Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser Cys
50          55          60
Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys Thr Val
65          70          75
Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile Ser Asn
85          90          95
Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro
100         105         110

```

<210> 137

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia CDR

<400> 137

ES 2 594 493 T3

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn Pro Asn Gln Lys Ser Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

5 <210> 138
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia CDR

<400> 138

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Thr Ser Asn His Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

15 <210> 139
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia CDR

<400> 139

Gln Gln Gly Trp Ser Phe Pro Tyr Ser
1 5

25

30 <210> 140
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia CDR

35 <400> 140

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

40 <210> 141
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Secuencia CDR

<400> 141

ES 2 594 493 T3

Gln Gln Gly Trp Ser Phe Pro Tyr Thr
1 5

5 <210> 142
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia CDR
<400> 142

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Gly Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

15 <210> 143
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia CDR
<400> 143

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Trp Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

25 <210> 144
<211> 14
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia CDR
35 <400> 144

Ala Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Ser
1 5 10

40 <210> 145
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Secuencia CDR
<400> 145

Ala Ser Tyr Arg Ser Ser Asn Lys Asn Ala Val
1 5 10

50

ES 2 594 493 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Thr Ala Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Trp Arg
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Leu Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Phe Gln Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

- <210> 150
- 5 <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia CDR
- <400> 150

ES 2 594 493 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Thr Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Ala Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn
 20 25 30

Pro Asn Gln Lys Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Asp Phe Ala Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Phe Gln Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr Ser Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile
 100 105 110

Arg

- <210> 151
- <211> 113
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> Secuencia CDR

<400> 151

ES 2 594 493 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Thr Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Thr
 20 25 30

Ser Asn His Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Leu Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Phe Gln Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Gly Trp Ser Phe Pro Tyr Ser Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

- <210> 152
- <211> 113
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia CDR
- <400> 152

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Thr Ala Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Leu Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

ES 2 594 493 T3

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Phe Gln Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Gly Trp Ser Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

- 5 <210> 153
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia CDR
- <400> 153

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Thr Ala Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Gly
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Leu Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Phe Gln Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Gly Trp Ser Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

- 15 <210> 154
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Secuencia CDR

ES 2 594 493 T3

<400> 154

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Thr Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Leu Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Phe Gln Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Gly Trp Ser Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

5 <210> 155
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia CDR

<400> 155

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Thr Ala Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Leu Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

15

ES 2 594 493 T3

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Phe Gln Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Gly Trp Ser Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

5 <210> 156
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia CDR

<400> 156

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Thr Ala Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Val Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Asn Phe Gln Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr Ser Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile
100 105 110

Arg

15 <210> 157
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia CDR

ES 2 594 493 T3

<400> 157

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Thr Ala Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Trp Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Val Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Asn Phe Gln Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr Ser Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile
100 105 110

Arg

5 <210> 158
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia CDR

<400> 158

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Phe Ala Val Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
50 55 60

15

ES 2 594 493 T3

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Phe Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Ser Ser
85 90 95

Asn Asn Ala Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 159
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia CDR

<400> 159

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Leu Gly Lys
1 5 10 15

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

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Phe Ala Val Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Phe Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Ser Ser
85 90 95

Asn Asn Ala Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 160
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia CDR

<400> 160

ES 2 594 493 T3

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Leu Gly Lys
 1 5 10 15

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

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Val Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Ser Ser
 85 90 95

Asn Lys Asn Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 162
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 162

5

10

ES 2 594 493 T3

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Lys Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Val Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Arg Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Ile Thr
 85 90 95

Asn Arg His Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 163
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 163

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Lys Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Val Thr Tyr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe

5

10

ES 2 594 493 T3

50

55

60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Arg Ser
85 90 95

Thr Asn Val Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 164
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia CDR

<400> 164

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Lys Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Val Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr His Cys Ala Ser Tyr Arg Thr Ser
85 90 95

Asn Asn Val Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 165
<211> 339
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia CDR

<400> 165

ES 2 594 493 T3

gaaattgtga tgacgcagtc tcccagctcc gtgactgCGT ctgcaggaga gaaggtcacc 60
 atcaattgta agtccagcca gagtGTgTta tggCGctcca accagaaaa ctacttagct 120
 tggTaccagc agagacttgg acagtctcct aggctgctca tcagctgggc atccatccga 180
 gaatCGggggg ttctgatcg attcagCGgc agtgggtcca caacagattt cactcttacc 240
 atcagcagct tccagcctga agacCGggca gtgtattact gccaacaggg ttatagtttt 300
 ccatatacat tCGgcagtgg gaccaggctg gaaatcaaa 339

5 <210> 166
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 166

gatattgtga tgaccagac tcttagctcc gtgactgCGg ctgtaggaga gaaggtCGct 60
 atcaactgta agtccagcca gagCGtGtta tataacocca accagaaaag ctacttagct 120
 tggTaccaac agagacctgg acaatctcct aggctgctca tctactgggc atccaccga 180
 gaatCGggggg ttctgatcg cttcagCGgc agtgggtcca caacagattt CGctcttacc 240
 atcagcagct tccagcctga agacCGggca gtgtattact gccagcaggg ttatagtttt 300
 ccatatagtt tCGgcagtgg gaccaggctg gaaatcaga 339

15 <210> 167
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 167

gatgttgtga tgactcagtc tcccagctcc gtgactgcat ctgtaggaga gaaggtcact 60
 atcaactgta agtccagcca gagtGTgTta tacacctcca accacaaaaa ctacttagct 120
 tggTaccagc agagacttgg acagtctcct aggctgctca tctactgggc atccaccga 180
 gaatCGggggg ttctgatcg attcagCGgc agtgggtcca caacagattt cactctgacc 240
 atcagcagct tccagcctga agacCGggca gtgtattact gccagcaggg atggagtttt 300
 ccatatagtt tCGgcagtgg gaccaggctg gaaatcaaa 339

25
 30 <210> 168
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 594 493 T3

<220>

<223> Secuencia CDR

<400> 168

5

gatattgtga tgaccagac tcccagctcc gtgactgogt ctgcaggaga gaaggtcacc 60
atcaattgta agtccagcca gagtgtatta tacaactcca accagaaaa ctacttagct 120
tggtaccagc agagacttgg acagtctcct aggtgctca tctactgggc atccaccga 180
gaatcggggg ttctgatcg attcagcggc agtgggtcca caacagattt cactctgacc 240
atcagcagct tccagcctga agacgcgga gtgtattact gccagcaggg atggagtttt 300
ccatatactt tcggcagtgg gaccaggctg gaaatcaaa 339

<210> 169

<211> 339

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia CDR

15

<400> 169

gatatccagt tgaccagtc tcccagctcc gtgacagcgt ctgcaggaga gaaggtcacc 60
atcaattgta agtccagcca gagtgtgta tacggctcca accagaaaa ctacttagct 120
tggtaccagc agagacttgg acagtctcct aggtgctca tctactgggc atccaccga 180
gaatcggggg ttctgatcg attcagcggc agtgggtcca caacagattt cactctgacc 240
atcagcagct tccagcctga agacgcgga gtgtattact gccagcaggg atggagtttt 300
ccatatactt tcggcagtgg gaccaggctg gaaatcaaa 339

20

<210> 170

<211> 339

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia CDR

<400> 170

gacatccagt tgaccagtc tcccagctcc gtgactgtgt ctgtaggaga gaaggtcacc 60
atcaattgta agtccagcca gagtgtatta tacaactcca accagaaaa ctacttagct 120
tggtaccagc agagacttgg acagtctcct aggtgctca tctactgggc atccaccga 180
gaatcggggg ttctgatcg attcagcggc agtgggtcca caacagattt cactctgacc 240
atcagcagct tccagcctga agacgcgga gtgtattact gccagcaggg atggagtttt 300
ccatatactt tcggcagtgg gaccaggctg gaaatcaaa 339

30

<210> 171

ES 2 594 493 T3

<211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 171

gacatccaga	tgaccagtc	tcccagctcc	gtgactgcgt	ctgcaggaga	gaaggtcacc	60
atcaattgta	agtccagcca	gagtgtatta	tacaactoca	accagaaaa	ctacttagct	120
tggtagcagc	agagacttgg	acagtctcct	aggctgctca	tctactgggc	atccaccoga	180
gaatcggggg	ttcctgatcg	attcagcggc	agtgggtcca	caacagattt	caactctgacc	240
atcagcagct	tccagcctga	agacgaggca	gtgtattact	gccagcaggg	atggagtttt	300
ccatatactt	tcggcagtgg	gaccaggctg	gaaatcaaa			339

10

<210> 172
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia CDR

20

<400> 172

gatattgtga	tgaccagac	tcccgctcc	gtgactgcgt	ctgcaggaga	gaaggtcacc	60
atcaattgta	agtccagcca	gagtgtgta	ttcagctcca	accagaaaa	ctacttagct	120
tggtagcagc	agagagtgg	acagtctcct	aggctgctca	tctactgggc	atccaccoga	180
gaatcggggg	ttcctgatcg	attcagcggc	agtgggtcca	caacagattt	caactcttacc	240
atcagcaact	tccagcctga	agacgaggca	gtgtattact	gccagcaggg	ttatagtttt	300
ccatatagtt	tcggcagtgg	gactaggctg	gaaatcaga			339

25

<210> 173
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 173

ES 2 594 493 T3

gatgttgtga tgactcagtc tcccagctcc gtgactgogt ctgcaggaga gaaggtcacc 60
 atcaattgta agtccagtc gagtgtgta tggagctcca accagaaaa ctacttagct 120
 tggtagcagc agagagttgg acagtctcct aggetgctca tctactgggc atccaccga 180
 gaatcggggg ttctgatcg attcagcggc agtgggtcca caacagattt cactcttacc 240
 atcagcaact tccagcctga agacgcggca gtgtattact gccagcaggg ttatagtttt 300
 ccatatagtt tccgcagtgg gaccaggctg gaaatcaga 339

5 <210> 174
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 174

cagtctgtgt tgacgcagcc tccctccgtg tctgggtctc caggaaagac ggtcaccatc 60
 tctgtgagc gaaccagcag tgatgttggg tatggaaact atgtctcctg gtaccagcag 120
 ctcccaggca cggcccccaa actcctgac tttgcagtca gctatcgagc ctccaggatc 180
 cctgatcgct tctctggctc caagtcaggg aacacggcct ttttgacct ctctgggctc 240
 cagtcagagg acgaggctga ttattactgt gctcatata gaagcagcaa caatgctgct 300
 gtgttcggcg gagggacca tctgaccgct ctg 333

15 <210> 175
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 175

gcacagtctg tgotgacgca gctcctctcc gtgtccggaa ctctgggcaa gacgctcacc 60
 atctcctgag ctggaaccag cactgatgtt ggatacggaa actatgtctc ctggtaccaa 120
 cagctcccag gcacggcccc caaactcctg atctttgcag tcagctatcg agcctcaggg 180
 atccctgac gcttctctgg ctccaagtca ggcaacacgg cctttttgac catctctggg 240
 ctccagtcag aggacgaggg tgattattac tgtgcctcat atagaagcag caacaatgct 300
 gctgtgttgg ggggaggac ccatctgacc gtctctg 336

30 <210> 176
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 594 493 T3

<223> Secuencia CDR

<400> 176

```

cagtctgccc tgactcagcc tccctccgtg tccggaactc tgggcaagac gtcaccatc      60
tctgtgcgctg gaaccagcac tgatggtgga tacggaaact atgtctcctg gtaccaacag      120
ctcccaggca cggcccccaa actcctgata tatgcagtca gctatcgagc ctcagggatc      180
cctgatcgct tctctggctc caagtcaggc aacacggcct tttgaccat ctctgggctc      240
cagtccgagg acgaggctga ttattactgt gcctcatata gaagcagcaa caatgctgct      300
gtgttcggcg gagggacca tctgaccgtc ctg                                     333

```

5

<210> 177

<211> 333

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia CDR

<400> 177

15

```

ctgcctgtgc tgactcagcc tccctccgtg tccggaactc tgggaaagac gtcaccatc      60
tctgtgcgctg gaaccagcag tgatggtgga tacggaaact atgtctcctg gtaccaacag      120
ctcccaggca cggcccccaa actcctgata tatgcagtca gctatcgagc ctcagggatc      180
cctgatcgct tctctggctc caagtcaggc aacacggcct cctgagcat ctctgggctc      240
cagtctgagg acgaggctga ttattactgt gcctcatata gaagcagcaa caaaaatgct      300
gtgttcggcg gagggacca tctgaccgtc ctg                                     333

```

20

<210> 178

<211> 333

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia CDR

25

<400> 178

```

cagtctgccc tgactcagcc tccctccgtg tctgggtctc caggaaagac ggtcaccatc      60
tctgtgcgag gaaccagcag tgatggtgga tacggaaact atgtctcctg gtaccaaag      120
ctcccaggca cagcccccaa actcctgata tatgcagtca gctatcgagc ctcagggatc      180
cctgatcgct tctctggctc ccggtcaggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc      240
cagtctgagg acgaggctga ttattactgt gcctcatata gaatcaccaa caggcacagc      300
gtgttcggcg gagggacca tctgaccgtc ctg                                     333

```

30

<210> 179

<211> 333

ES 2 594 493 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia CDR

<400> 179

cagtctgccc tgactcagcc tccctccgtg tctggaactc tgggaaagac ggtcaccatc 60

tcttgcgctg gaaccagcag tgatggtggg tatggaaact atgtctcctg gtacccaaaag 120

ctcccaggca cagcccccaa actcctgatac tatgcagtca cctatcgagc ctccaggatc 180

cctgatcgct tctctggctc caagtcgggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240

cagtctgagg acgaggctga ttattactgt gcctcatata gaagaagtac taatgtgggg 300

gtgttcggcg gagggacca tctgaccgtc ctg 333

10 <210> 180
<211> 333
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Secuencia CDR

<400> 180

caggctgtgc tgactcagcc tccctccgtg tccggaactc tgggaaagac ggtcaccatc 60

tcttgcgctg gaaccagcag tgatggtgga tacggaaact atgtctcctg gtacccaaaag 120

ctcccaggca cagcccccaa actcctgatac tatgcagtca gctatcgagc ctccaggatc 180

cctgatcgct tctctggctc caagtcaggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240

cagtctgagg acgaggctga ttatcactgt gcctcatata gaaccagcaa caatgtggct 300

gtgttcggcg gagggacca gctgaccgtc ctg 333

25 <210> 181
<211> 102
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 181

ES 2 594 493 T3

Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn
 1 5 10 15
 Arg Gly Thr Cys Gln Arg His Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp
 20 25 30
 Ile Gln Ser Glu Val His Cys Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro
 35 40 45
 Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu
 50 55 60
 Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile
 65 70 75 80
 Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg
 85 90 95
 Arg Leu Lys Glu Thr Lys
 100

5 <210> 182
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 182

10 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 1 5 10

15 <210> 183
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 183

20 Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5

25 <210> 184
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 184

30 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 1 5

<210> 185
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 594 493 T3

<400> 185

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr
 1 5 10

5 <210> 186
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 186

Cys Pro Arg Cys Pro
 1 5

15 <210> 187
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 187

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 1 5 10 15

25 <210> 188
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 188

30 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 1 5

35 <210> 189
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 189

Cys Pro Ser Cys Pro
 1 5

40 <210> 190
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 190

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 1 5

50 <210> 191
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 594 493 T3

<400> 191

Glu Arg Lys
1

5 <210> 192
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 192

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Pro Cys Pro
1 5 10

15 <210> 193
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 193

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
1 5

25 <210> 194
<211> 102
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 194

Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn
1 5 10 15

Arg Gly Thr Cys Gln Arg His Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp
20 25 30

Ile Gln Ser Glu Val His Cys Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro
35 40 45

Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu
50 55 60

Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile
65 70 75 80

Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg
85 90 95

30 Arg Leu Lys Glu Thr Lys
100

<210> 195
<211> 16

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> Secuencia CDR

10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente T o A

15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente I

20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente S o N

25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente W

30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente N

35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente D o G

40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente I, G o S

45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> X8 es cualquier aminoácido, preferentemente N o S

<400> 195

	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Ser	Met	Lys
	1				5					10					15	

50

<210> 196
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> Secuencia CDR

60
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente Y o D

ES 2 594 493 T3

<400> 196

Val Ile Ala Tyr Asp Gly Ser Thr Xaa Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

5 <210> 197
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (6)..(6)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente D, N o E

<400> 197

Arg Ile Asp Pro Glu Xaa Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

20 <210> 198
 <211> 6
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente D o S

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente A o V

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente T, N o S

45 <400> 198

Xaa Asp Tyr Xaa Met Xaa
1 5

50 <210> 199
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Secuencia CDR

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente G o T

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente A o Y

10

<400> 199

Xaa Asn Tyr Tyr Xaa Trp Ser
1 5

<210> 200
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia CDR

20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente M o N

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente N o Y

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente S o V

35

<400> 200

Xaa Xaa Xaa Ile Asp
1 5

40

<210> 201
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Secuencia CDR

50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente Y o W

55

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente Y o L

60

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente T o S

ES 2 594 493 T3

<400> 201

Gln Gln Gly Xaa Ser Phe Pro Xaa Xaa
1 5

5 <210> 202
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE

15 <222> (5)..(5)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente S, I, R o T

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente A, S, T o R

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente N o T

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente N, D, R o K

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente A, V, Y, N o H

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente V, A, S o G

45 <400> 202

Ala Ser Tyr Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val
1 5 10

50 <210> 203
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente I o T

60 <400> 203

ES 2 594 493 T3

Trp Ala Ser Xaa Arg Glu Ser
1 5

5 <210> 204
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente D, A o E

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente N o S

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente R, Y o K

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente A, o P

<400> 204

Xaa Val Xaa Xaa Arg Xaa Ser
1 5

35 <210> 205
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia CDR

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente W, L o F

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente R o S

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente S o P

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> X es cualquier aminoácido, preferentemente Q o H

ES 2 594 493 T3

<223> X es cualquier aminoácido, preferentemente N o Y

<220>

<221> MISC_FEATURE

5

<222> (13)..(13)

<223> X es cualquier aminoácido, preferentemente V o L

<400> 206

10

Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Ser
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une específicamente a la proteína c-Met humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR3, CDR2 y CDR1 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR3, CDR2 y CDR1, donde:
- la secuencia variable CDR3 de cadena pesada es SEQ ID NO: 21;
 la secuencia variable CDR2 de cadena pesada se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 84; y
 la secuencia variable CDR1 de cadena pesada es SEQ ID NO: 19; y el dominio variable de cadena ligera incluye una combinación de CDR que se selecciona de entre lo siguiente:
- (i) la secuencia variable CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO: 33;
 la secuencia variable CDR 2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 32;
 la secuencia variable CDR1 de cadena ligera es SEQ ID NO: 31; o
 (ii) la secuencia variable CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO: 145;
 la secuencia variable CDR2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 32;
 la secuencia variable CDR1 de cadena ligera es SEQ ID NO: 144; o
 (iii) la secuencia variable CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO: 146;
 la secuencia variable CDR2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 32;
 la secuencia variable CDR1 de cadena ligera es SEQ ID NO: 31; o
 (iv) la secuencia variable CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO: 147;
 la secuencia variable CDR2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 32;
 la secuencia variable CDR1 de cadena ligera es SEQ ID NO: 144; o
 (v) la secuencia variable CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO: 148;
 la secuencia variable CDR2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 32;
 la secuencia variable CDR1 de cadena ligera es SEQ ID NO: 144.
2. Un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, donde:
- la secuencia variable CDR3 de cadena pesada es SEQ ID NO: 21;
 la secuencia variable CDR2 de cadena pesada es SEQ ID NO: 83;
 la secuencia variable CDR1 de cadena pesada es SEQ ID NO: 19; y
 la cadena ligera variable comprende CDR3, CDR2 y CDR1, donde:
- la secuencia variable CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO: 33;
 la secuencia variable CDR 2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 32; y
 la secuencia variable CDR1 de cadena ligera es SEQ ID NO: 31.
3. Un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 2, donde el dominio variable de cadena pesada (VH) comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 94, o una secuencia que tiene al menos un 85%, o al menos un 90%, o al menos un 95%, o al menos un 97% o al menos un 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 94, y el dominio variable de cadena ligera (VL) comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 95, o una secuencia que tiene al menos un 75%, o al menos un 80%, al menos un 85%, o al menos un 90%, o al menos un 95%, o al menos un 97%, o al menos un 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 95.
4. Un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une al mismo epítipo de la proteína c-Met humana que el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que presenta una o más funciones efectoras que se seleccionan de entre citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCP) contra las células que expresan la proteína c-Met humana sobre la superficie celular.
6. El anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 5 que comprende un dominio Fc que está modificado con respecto al dominio Fc nativo humano, y presenta un aumento de la función efectora en comparación con un anticuerpo de referencia con especificidad de unión al antígeno sustancialmente idéntica pero que comprende un dominio Fc nativo humano, para al menos una función efectora que es la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC).
7. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que contiene la región bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de una IgG humana, preferentemente una IgG1 humana.

8. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que es una IgG defucosilada parcial o totalmente.
- 5 9. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 10 10. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 9 unido operativamente a secuencias reguladoras que permiten la expresión del polipéptido de unión al antígeno en una célula huésped o un sistema de expresión libre de células.
- 10 11. Una célula huésped o un sistema de expresión libre de células que contiene el vector de expresión de la reivindicación 10.
- 15 12. Un método para producir un anticuerpo recombinante o un fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende cultivar la célula huésped o el sistema de expresión libre de células de la reivindicación 11 en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno y recuperar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se expresa.
- 20 13. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. Un inmunocombinado que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un agente citotóxico, un agente citostático, una toxina o un radionúclido.
- 25 15. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento del cáncer.

Figura 1

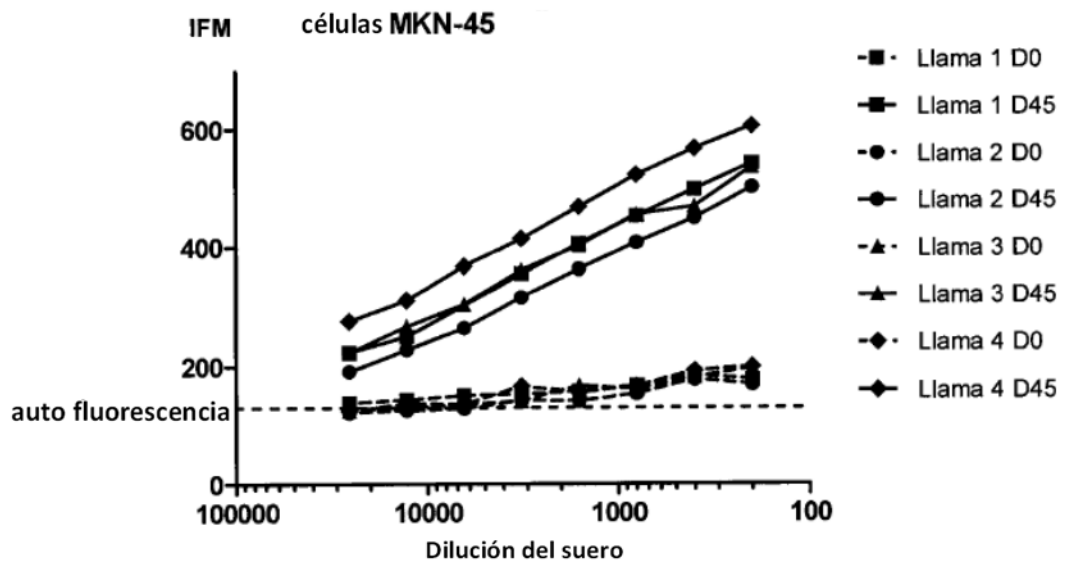


Figura 2

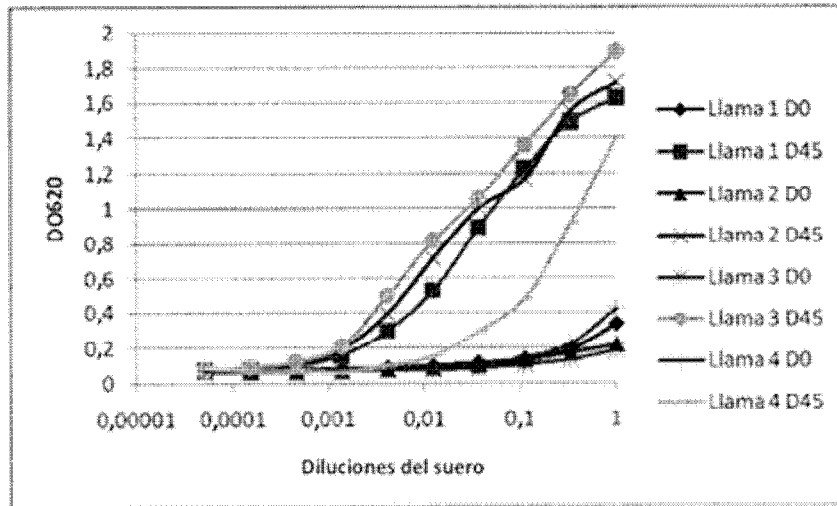


Figura 3

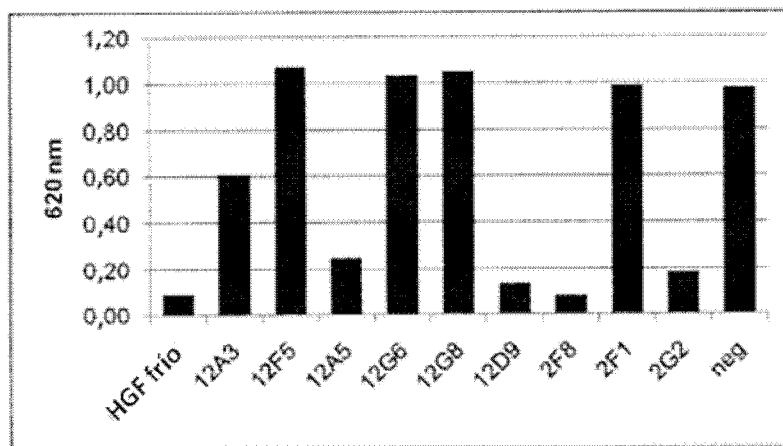


Figura 4

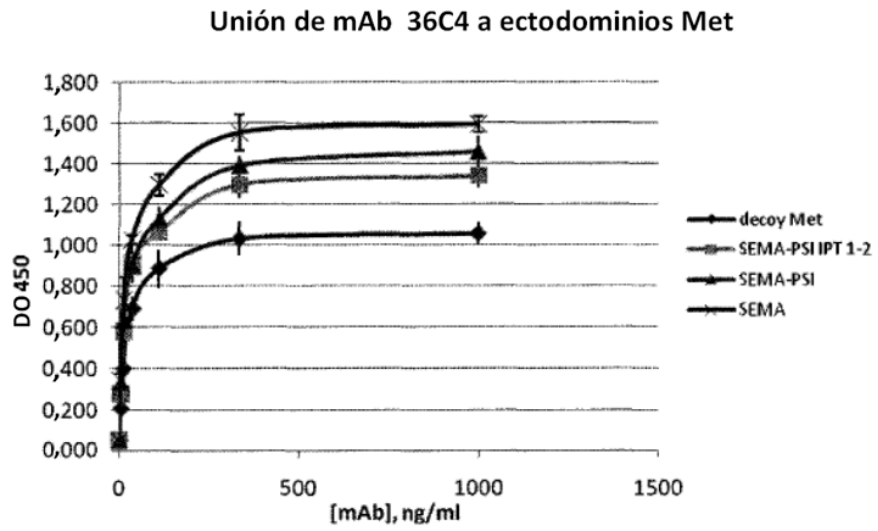
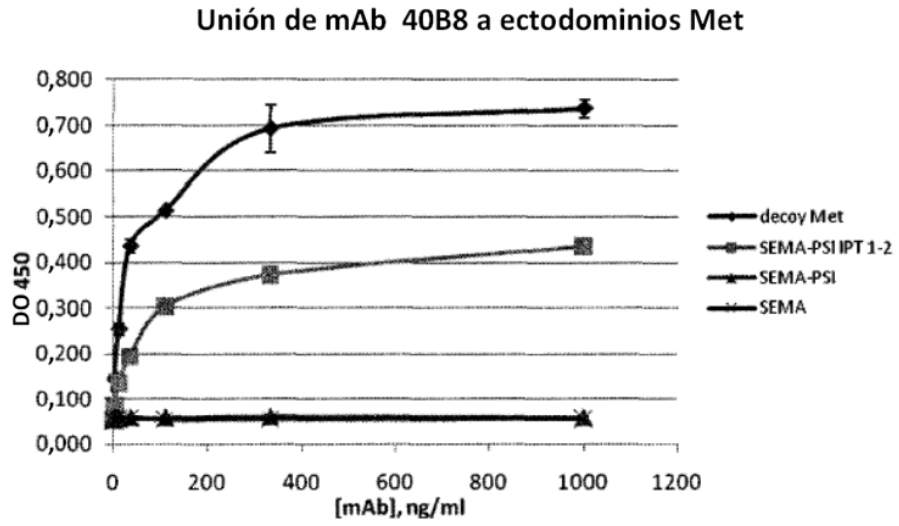


Figura 5

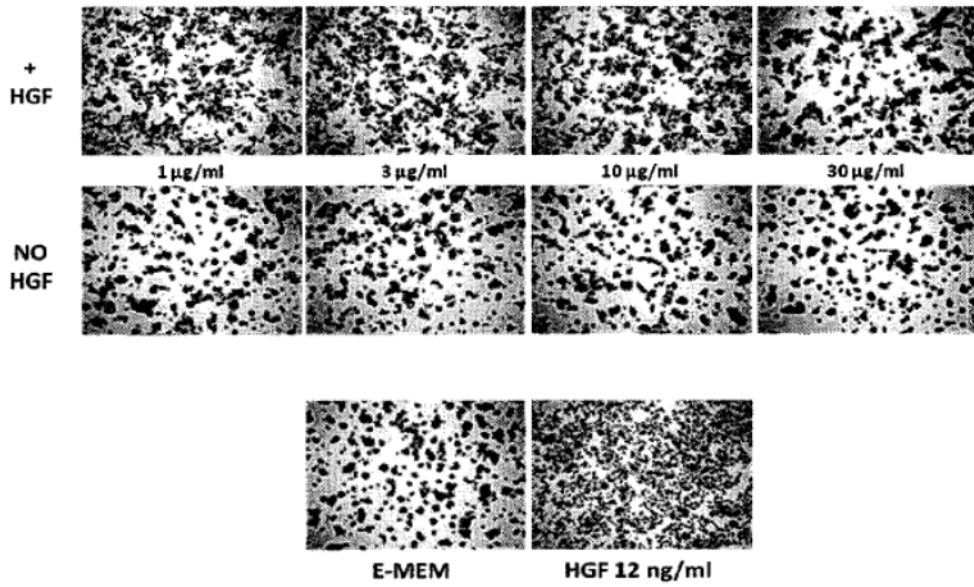


Figura 6

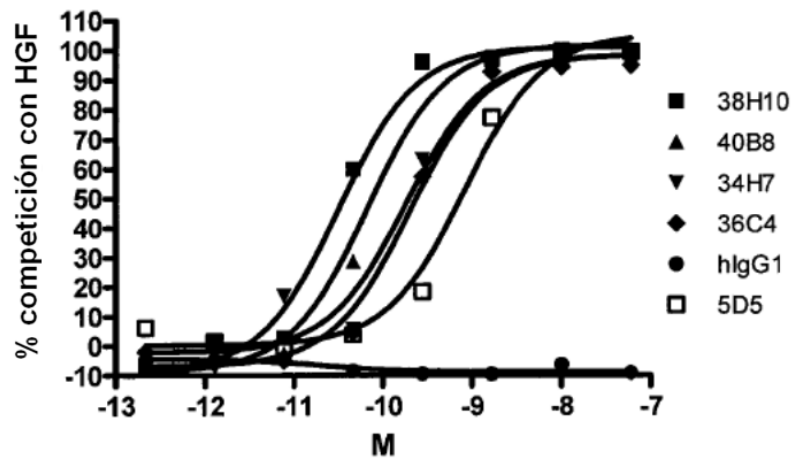


Figura 7

Figura 7A

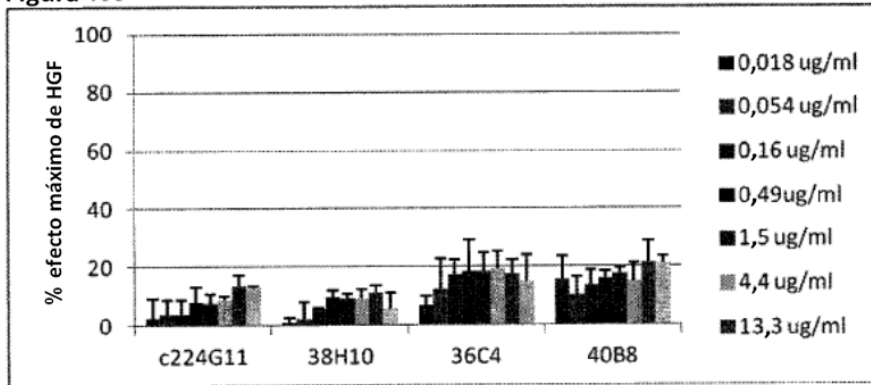


Figura 7B

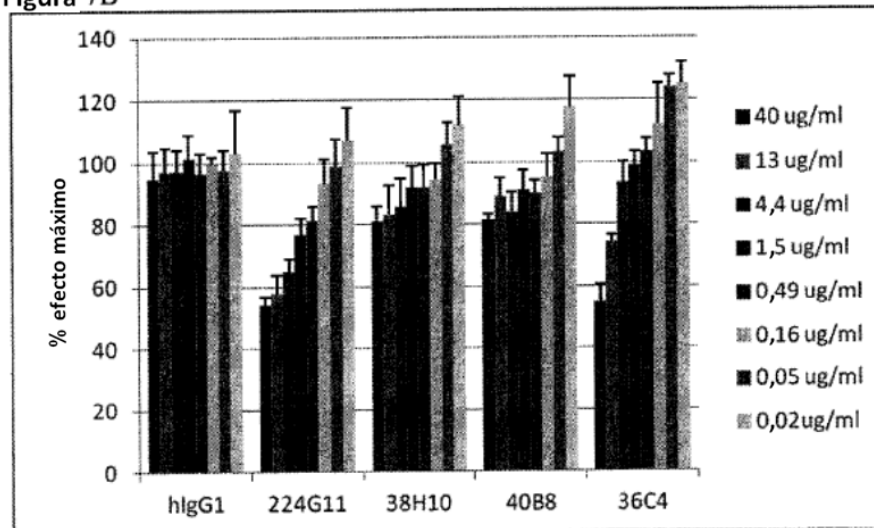


Figura 8

Figura 8A

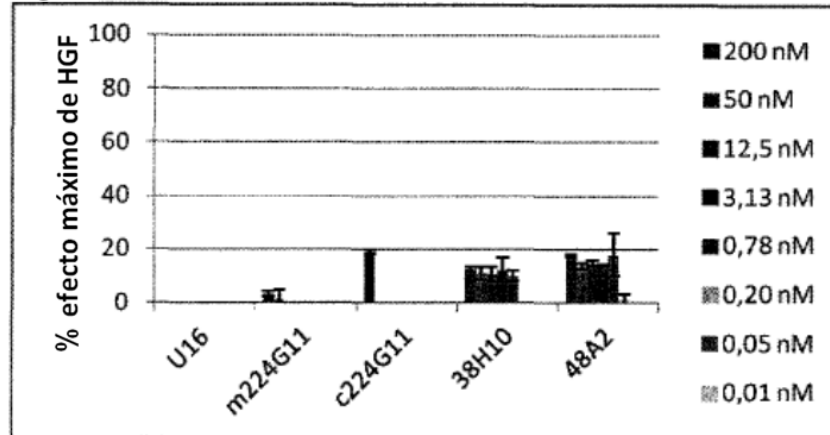


Figura 8B

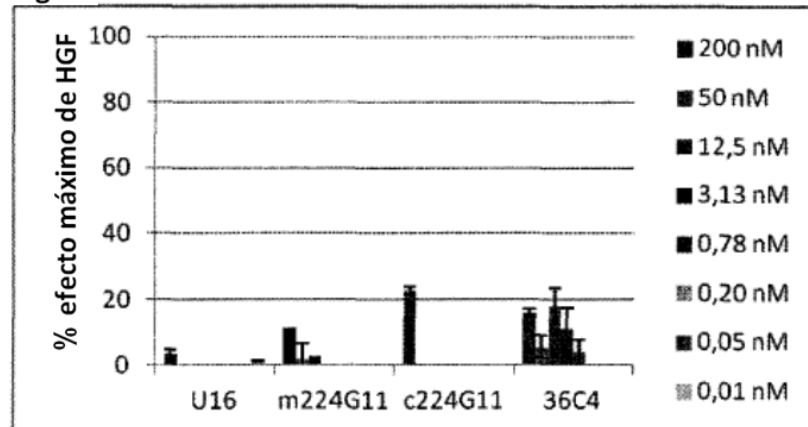


Figura 9

Figura 9

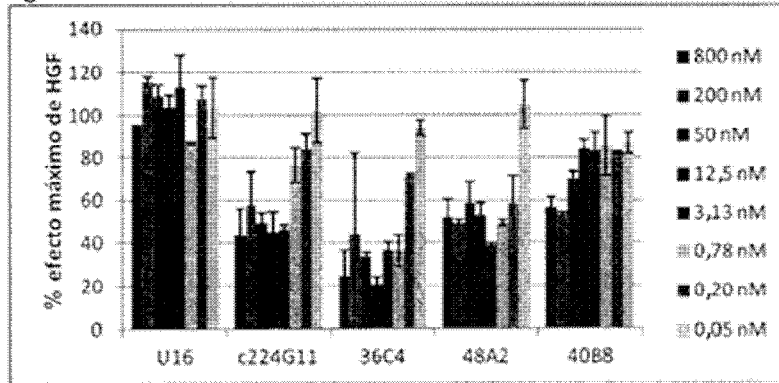


Figura 10

Figura 10

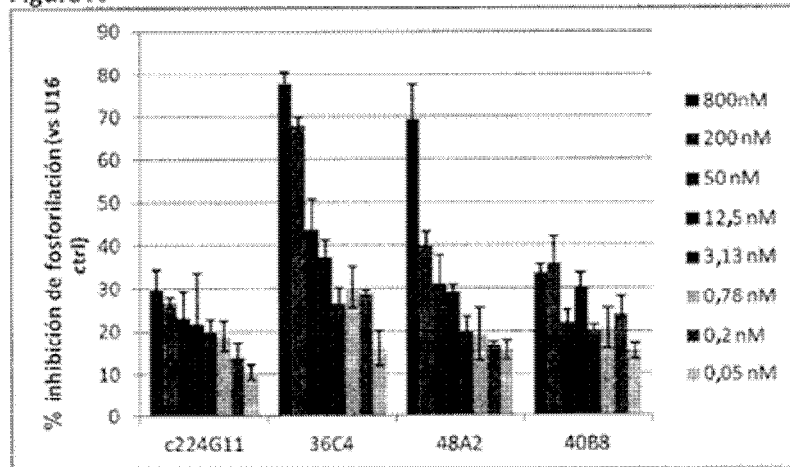


Figura 11

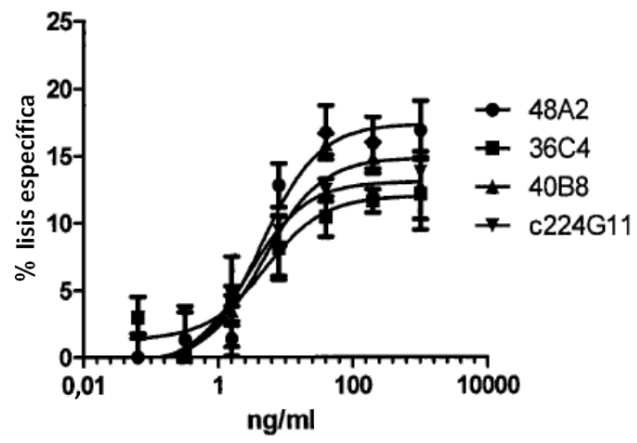


Figura 12

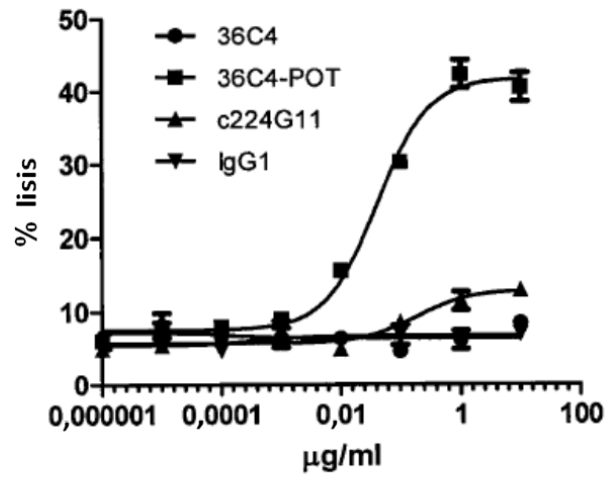


Figura 13

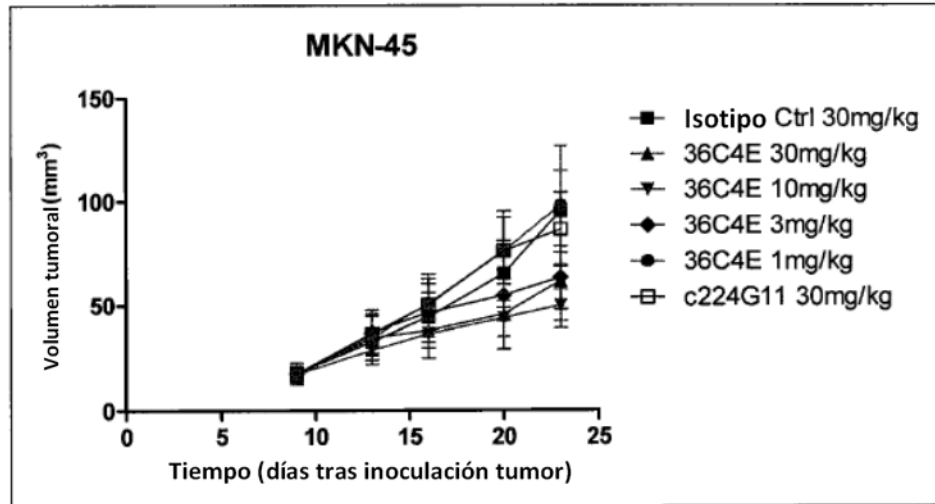


Figura 14

Figura 14A.

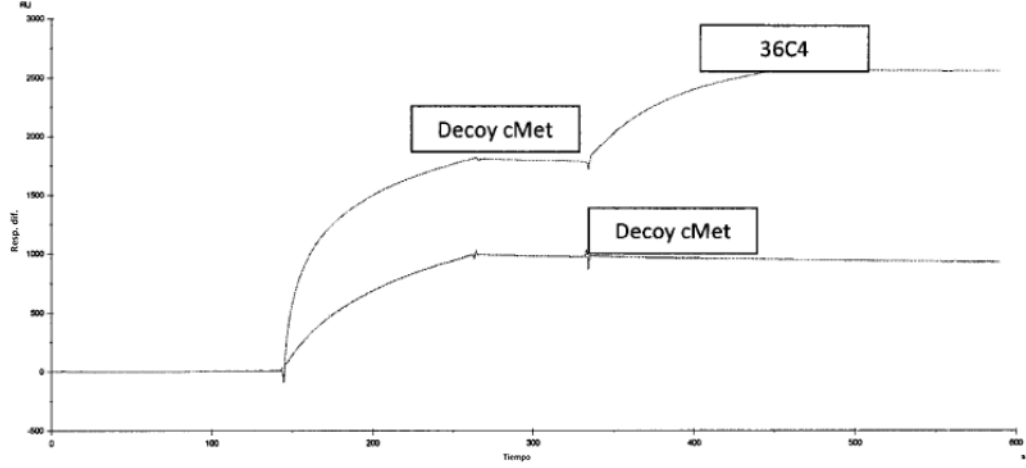


Figura 14B

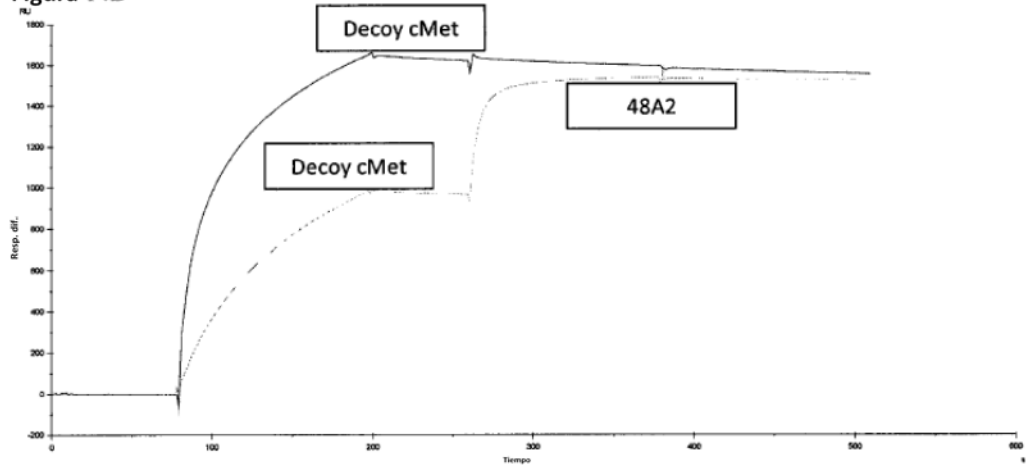


FIG. 15

Alineamiento de secuencias de proteína cMet humana y de llama glama

X54559	Lama glama C-Met	1	E	K	R	E	A	L	A	K	S	E	N	V	N	M	Q	L	P	N	F	T	A	E	T	F	L	O	N	V	L	L	E	H	H	I	F	L	G	A	N	I	Y	I	V	L	N	E	D	L	Q	K	V	A	E	Y	K	T	G	P	V	L	E	H	P			
X54559	Lama glama C-Met	211	C	F	P	C	D	C	S	K	A	N	L	S	G	V	K	D	N	I	N	M	A	I	V	D	T	Y	D	D	O	L	I	S	C	G	V	N	R	G	T	C	Q	R	H	V	F	E	H	N	H	T	A	D	I	Q	S	E	V	H	G	L	F	S	P			
X54559	Lama glama C-Met	421	Q	I	-	E	E	P	S	Q	C	P	D	C	V	S	A	L	G	A	K	V	L	S	V	K	D	R	F	I	N	F	V	G	N	T	I	N	S	S	I	F	D	H	F	L	H	S	I	S	V	R	R	L	K	E	T	K	D	G	F	M	L	T	D	S		
X54559	Lama glama C-Met	628	Q	I	-	E	E	P	S	Q	C	P	D	C	V	S	A	L	G	A	K	V	L	S	V	K	D	R	F	I	N	F	V	G	N	T	I	N	S	S	I	F	D	H	F	L	H	S	I	S	V	R	R	L	K	E	T	K	D	G	F	M	L	T	D	S		
X54559	Lama glama C-Met	631	Y	I	D	V	L	P	E	F	Q	A	Y	P	I	K	Y	V	H	A	F	E	S	N	F	I	F	L	T	V	Q	R	E	T	L	D	A	Q	T	F	H	R	I	I	R	F	C	S	I	N	S	G	L	S	M	E	M	P	L	E	C	I	L	T	E	K		
X54559	Lama glama C-Met	838	R	K	R	S	T	K	E	V	N	I	L	O	A	A	Y	V	S	K	P	G	A	L	A	Q	I	G	A	S	L	N	D	D	I	L	F	G	V	F	A	Q	S	K	P	D	S	A	E	P	M	R	S	A	C	A	F	I	K	Y	V	N	D	E				
X54559	Lama glama C-Met	1048	F	N	K	I	V	N	K	N	V	R	C	L	O	H	F	Y	G	N	H	E	C	F	N	R	T	L	L	R	N	S	S	G	C	E	A	R	D	E	R	T	E	F	T	T	A	L	O	R	V	D	L	E	M	S	O	F	S	E	V	L	L	T	S			
X54559	Lama glama C-Met	1258	T	F	I	K	G	D	L	T	I	A	N	L	G	T	S	E	G	R	E	M	O	V	V	S	R	S	G	S	T	P	H	V	N	F	L	L	D	S	H	P	V	S	P	E	V	I	V	E	H	L	N	Q	N	G	Y	T	L	V	I	T	G	K	K	I	T	K
X54559	Lama glama C-Met	1468	P	L	N	G	L	G	C	R	H	F	Q	S	C	L	S	A	P	H	F	V	Q	C	G	W	C	H	D	K	C	V	R	S	E	E	C	L	S	G	N	T	Q	I	C	L	E	P	A	L	Y	K	V	F	E	N	S	A	P	L	E	G	G	I	L	T		
X54559	Lama glama C-Met	1678	C	G	W	D	F	G	F	R	R	N	R	S	D	L	K	K	T	N	L	I	G	N	E	S	C	T	L	S	E	S	T	N	L	K	C	T	V	G	P	A	M	N	K	H	N	S	I	I	S	N	G	H	T	Q	Y	S	T	F								
X54559	Lama glama C-Met	1888	Y	V	D	R	V	L	T	S	I	S	R	M	Y	G	P	M	A	G	G	T	L	L	T	L	T	G	N	L	N	S	G	N	S	R	H	I	S	I	G	G	K	T	L	K	S	V	N	S	I	L	E	C	Y	T	P	A	Q	T	I	S	T	E	F	A	V	K
X54559	Lama glama C-Met	2098	L	K	I	D	L	A	N	R	E	T	S	I	S	E	S	R	E	D	E	V	Y	E	I	H	P	T	K	S	I	S	I	T	G	V	K	N	L	N	S	V	F	R	M	V	I	N	V	H	E	A	G	R	N	F	T	V	A	C	O	H						
X54559	Lama glama C-Met	2308	S	N	S	E	I	C	C	T	T	P	S	I	Q	L	N	L	Q	L	E	T	K	K	A	F	F	M	L	D	G	I	S	R	N	F	D	L	I	Y	V	H	N	P	V	F	K	P	F	E	K	P	V	M	I	S	M	G	N	E	N	V	L	E	I	K	G	
X54559	Lama glama C-Met	2518	D	I	D	P	E	A	V	K	G	E	V	L	K	V	G	N	K	S	C	E	N	I	H	S	E	A	V	L	C	T	V	P	N	D	L	L	K	N	S	E	L	N	I	E	W	K	Q	A	I	S	S	T	V	L	G	K	V	I	V	Q	P	D	N	F		
X54559	Lama glama C-Met	2521	D	I	D	P	E	A	V	K	G	E	V	L	K	V	G	N	K	S	C	E	N	I	H	S	E	A	V	L	C	T	V	P	N	D	L	L	K	N	S	E	L	N	I	E	W	K	Q	A	I	S	S	T	V	L	G	K	V	I	V	Q	P	D	N			

Figura 16

Figura 16A. Unión del mAb 36C4 a proteínas cMet ECD recombinantes quiméricas, humanas y de llama

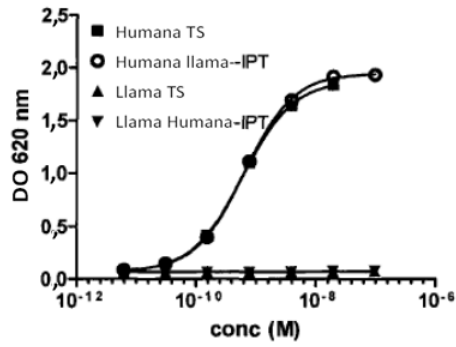


Figura 16B. Unión del mAb 13E6 a proteínas cMet ECD recombinantes quiméricas, humanas y de llama

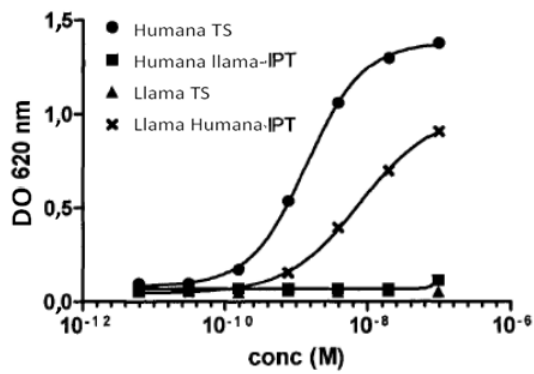


Figura 17

Figura 17

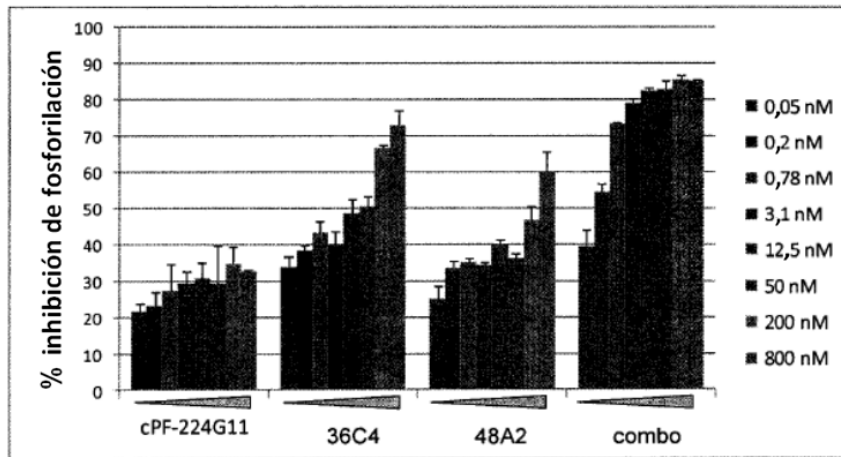


Figura 18

Figura 18A

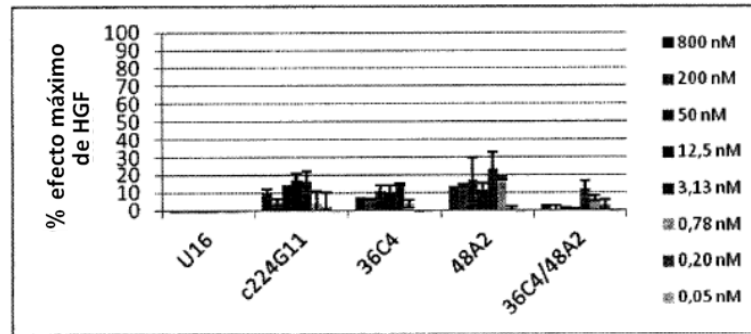


Figura 18B

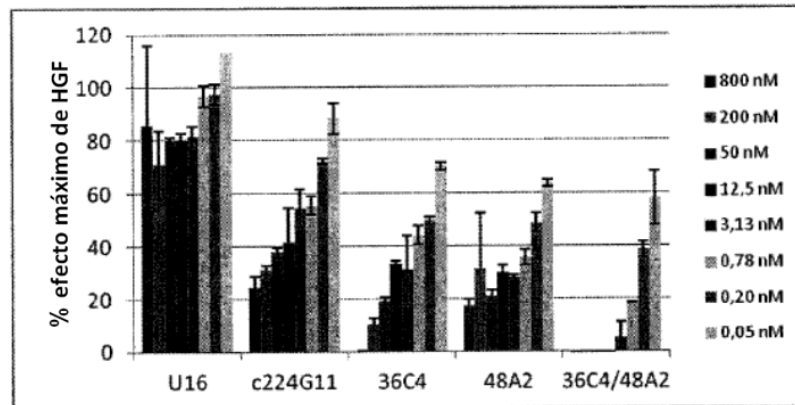


Figura 19

Figura 19. Experimento *in vivo* de xenoinjerto U87 MG que ensaya los efectos de la administración de 36C4 frente a c224G11 sobre el crecimiento tumoral

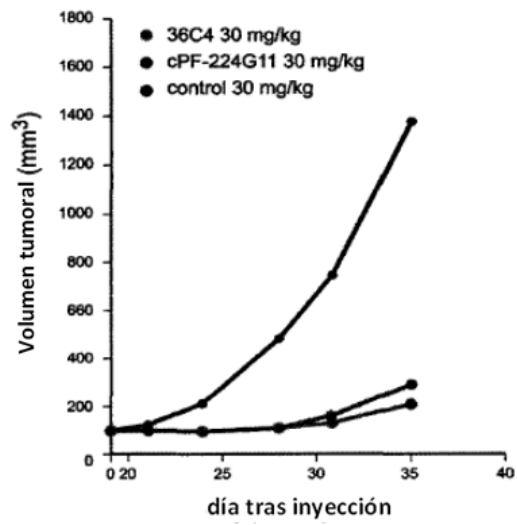


Figura 20

Figura 20A

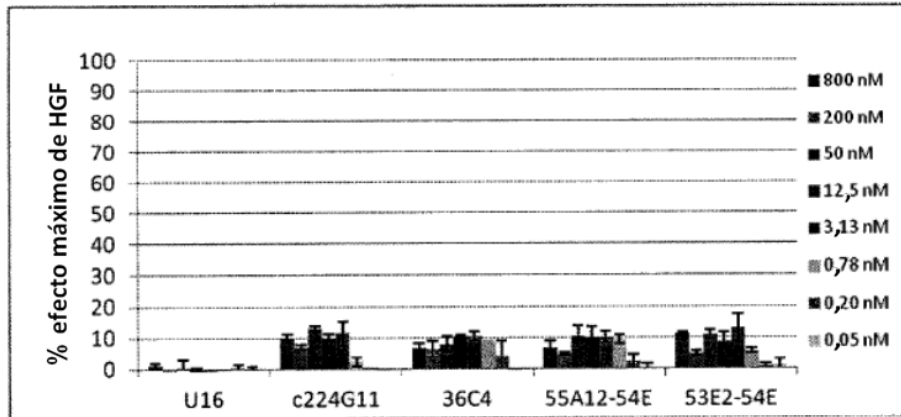


Figura 20B

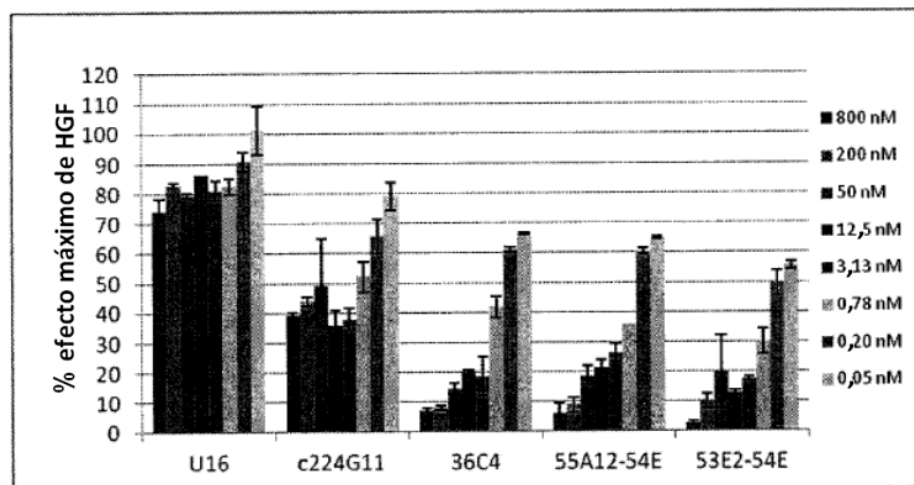


Figura 21

Figura 21: Estabilidad en PBS de variantes de 36C4 alineadas germinalmente a varias temperaturas

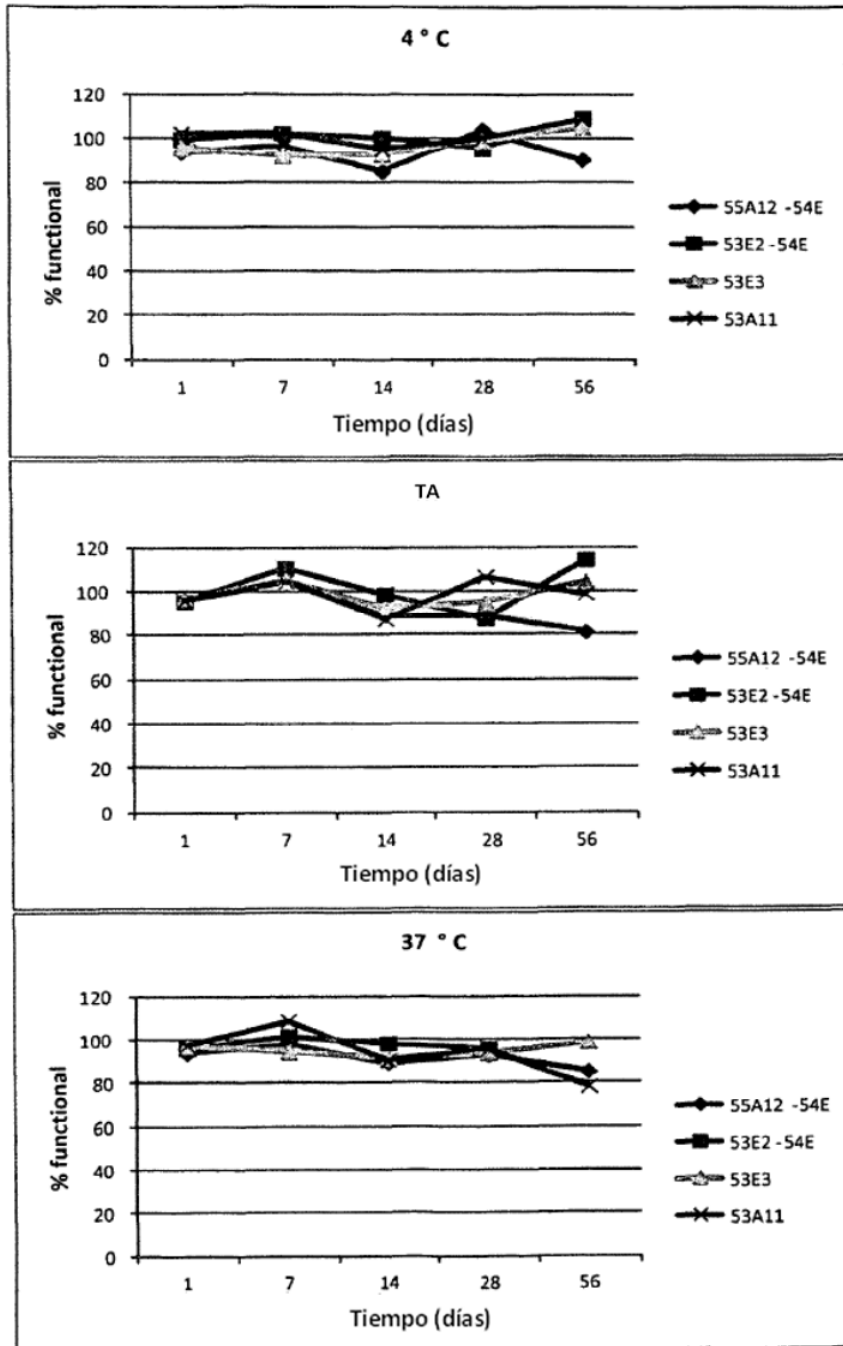


Figura 22

Figura 22A. Termotolerancia de clones 36C4 alienados germinalmente

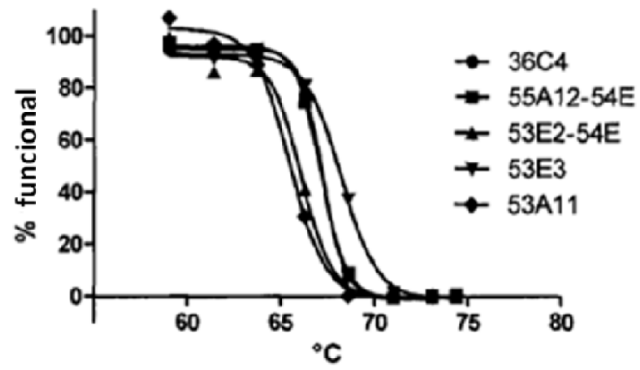


Figura 22B. Termotolerancia de clones 48AS alienados germinalmente

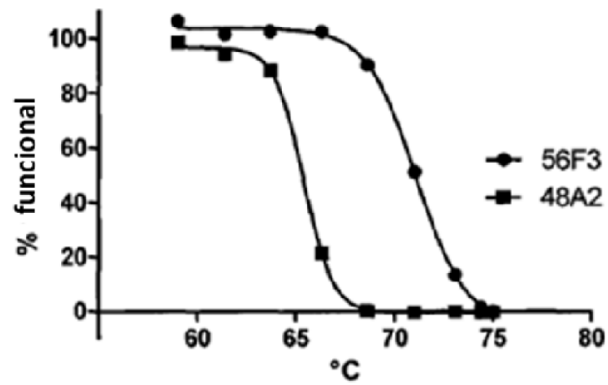


Figura 23

Figura 23A.

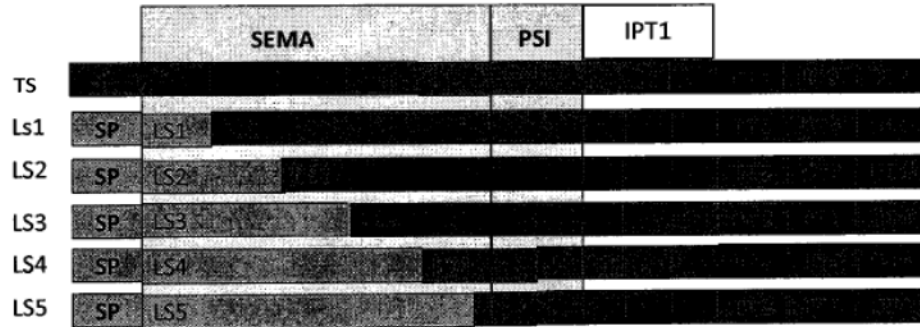


Figura 23B.

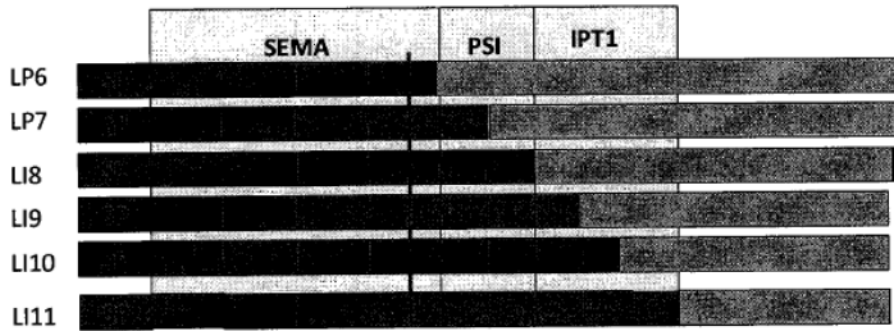


Figura 24

Figura 24. Regulación negativa de cMet total en células MKN-45 por mAb

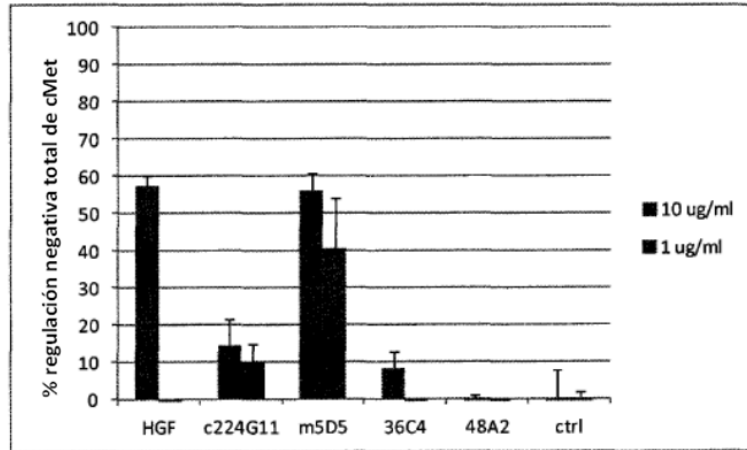


Figura 25

hMET - X54559,P08581

Péptido de señal

MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNG

SEMA (1-491)

ECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNBEEDLQKVAEY
KTGPFVLEHPDCFPQCDCSSKANLSGGVWKNINMALVVDYDDQLISCGSVNRGTCQRH
VFPNHNTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSS
YFPDHPLHSISVRRLLKETKDGFMFLTDQSYIDVLPFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTV
QRETLDAQTFHTRIIRFCSINSLHSYMEMPLECILTEKRKRSTKKEVFNILQAAYVSK
PGAQLARQIGASLNDLILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFFIKYVNDFFNKIVNKNVNR
CLQHFYGPNEHCFNRTLNRSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSIST
FIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDLSDHPVSPEVIVEHTLNQNGYTLV
ITGKKITKIPL

PSI (492-543)

NGLGCRHFQSCSQCLSAPPVFQCGWCHDKCVRSEECLSGTWTQQICLPAIYK

IPT-1 (544-632)

VFPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLESTMTLKCTVG
PAMNKHFNMSIIISNGHGTQYSTFSYVD

IPT-2 (633-717)

PVITSISPKYGPMAAGGTLTLTGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTI
STFAVKLKIDLANRETSIFS YRED

IPT-3 (718-814)

PIVYIEIHPTKSFISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVHEAGRNFVACQHRNSSEIICC
TTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIYVHN

IPT-4 (815-909)

PVFKPPEKPVMI SMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKSCENIHLHSEAVLCTVPN
DLLKLNSELNIEWKQAISSTVLGKIVIVQPDQNF TG