



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 641 294**

⑮ Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2011** PCT/EP2011/060930

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012** WO12007280

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2011** E 11728835 (7)

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017** EP 2588497

⑪ Título: **Nuevo anticuerpo para el diagnóstico y/o el pronóstico del cáncer**

⑩ Prioridad:

29.06.2010 US 359623 P
29.06.2010 EP 10305703

⑪ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2017

⑬ Titular/es:

PIERRE FABRE MÉDICAMENT (100.0%)
45, Place Abel Gance
92100 Boulogne-Billancourt, FR

⑭ Inventor/es:

JOUHANNEAUD, ALEXANDRA

⑮ Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 641 294 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

Nuevo anticuerpo para el diagnóstico y/o el pronóstico del cáncer.

- 5 La presente solicitud se refiere al campo de pronóstico y/o diagnóstico de una enfermedad proliferativa en un paciente. Más particularmente, la invención se refiere a nuevos anticuerpos que se pueden unir específicamente al receptor cMet humano, así como las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que codifican estos anticuerpos. La invención asimismo comprende la utilización de los anticuerpos y procedimiento correspondiente, para detectar y diagnosticar trastornos onco-génicos hiperproliferativos patológicos asociados a la expresión de cMet. En ciertas formas de realización, los trastornos son trastornos onco-génicos asociados a una aumentada expresión de polipéptido cMet respecto a lo normal o cualquier otra patología vinculada con la sobreexpresión de cMet. La invención finalmente comprende productos y/o composiciones o kits que comprenden por lo menos estos anticuerpos para el pronóstico o diagnóstico de ciertos cánceres.
- 10 15 Los agentes dirigidos de receptor de tirosina cinasa (RTK) tales como inhibidores trastuzumab, cetuximab, bevacizumab, imatinib y gefitinib han ilustrado el interés de dirigir esta clase de proteínas para el tratamiento de cánceres seleccionados.
- 20 25 30 El cMet, es el miembro prototípico de una subfamilia de RTKs que también incluye RON y SEA. La familia cMet RTK es estructuralmente diferente de otras familias RTK y es el único receptor de alta afinidad conocido para factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), también denominado factor de dispersión (SF) [D.P. Bottaro et al, Science 1991, 251 : 802-804; L. Naldini et al, Eur. Mol. Biol. Org. J. 1991, 10:2867-2878]. cMet y HGF se expresan ampliamente en una variedad de tejidos y su expresión normalmente se restringe a células de origen epitelial y mesenquimatoso respectivamente [M.F. Di Renzo et al, Oncogene 1991, 6: 1997-2003; E. Sonnenberg et al, J. Cell. Biol. 1993, 123:223-235]. Ambos se requieren para el desarrollo normal de mamíferos y se ha mostrado que son particularmente importantes en la migración celular, la diferenciación morfogénica y la organización de las estructuras tubulares tridimensionales así como el crecimiento y la angiogénesis [F. Baldt et al, Nature 1995, 376:768-771; C. Schmidt et al, Nature. 1995:373:699-702; Tsarfaty et al, Science 1994, 263:98-101]. Mientras que la regulación controlada de cMet y HGF se ha mostrado que es importante en el desarrollo y el mantenimiento de tejido y la reparación en mamíferos, [Nagayama T et al, Brain Res. 2004, 5; 999(2): 155-66; Tahara Y et al, J Pharmacol Exp Ther. 2003, 307(1): 146-51], su desregulación está implicada en el progreso de cánceres.
- 35 Una señalización aberrante dirigida por activación inapropiada de cMet es una de las alteraciones más frecuentes observadas en cánceres humanos y ejerce un papel crucial en tumorigénesis y metástasis [Birchmeier et al, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003, 4:915-925; L. Trusolino and Comoglio P. M., Nat Rev. Cancer. 2002, 2(4):289-300].
- 40 45 50 55 Una activación de cMet inapropiada puede surgir por mecanismos dependientes e independientes de ligando, que incluye sobreexpresión de cMet, y/o activación para paracrina o autocrina, o a través de ganancia en mutación de función [J.G. Christensen, Burrows J. and Salgia R., Cancer Letters. 2005, 226: 1-26]. Sin embargo una oligomerización de receptor cMet, en la presencia o ausencia de ligando, se requiere para regular la afinidad de enlace y cinéticas de enlace de la cinasa hacia ATP y sustratos péptido que contienen tirosina [Hays JL et al, Biochemistry, 2004 Aug 17, 43: 10570-8]. El cMet activado recluta efectores de señalización a su sitio de acoplamiento múltiple, situado en el dominio de citoplasma, resultando en la activación de varias rutas de señalización clave, incluyendo Ras-MAPK, PI3K, Src y Stat3 [Gao CF et al, Oncogene. 2000, 19(49):5582-9]. Estas rutas son esenciales para proliferación de células de tumor, invasión y angiogénesis y para evadir apoptosis [Furge KA et al, Trends Cell Biol. 2003 Mar, 13(3): 122-30; Fan S et al, Oncogene. 2000 Apr 27, 19(18):2212-23]. Además, una faceta única de la señalización cMet respecto a otros RTK, es su interacción informada con complejos de adhesión focal y socios sin enlace cinasa tales como $\alpha 6\beta 4$ integrinas [Trusolino L et al, J Biol Chem. 1999, 274(10):6499-506], Plexina Bl o semaforinas [Giordano S et al, Nat Cell Biol. 2002, 4(9):720-4; Conrotto P et al, Blood. 2005, 105(11):4321-9; Conrotto P, Corso S, Gamberini S, Comoglio PM, Giordano S, Oncogene. 2004, 23:5131-7] que además puede contribuir a la complejidad de regulación de función celular por este receptor. Finalmente, recientes datos demuestran que cMet puede estar involucrado en resistencia de tumor a gefitinib o erlotinib, sugiriendo que la combinación de compuesto que dirige tanto EGFR como cMet puede ser de interés significativo [Engelman JA et al., Science, 2007, 316: 1039-43].
- 60 65 En los últimos años, muchas estrategias diferentes se han desarrollado para atenuar la señalización de cMet en estirpes celulares de cáncer. Estas estrategias incluyen i) neutralizar anticuerpos contra cMet o HGF/SF [Cao B et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 2001, 98(13):7443-8; Martens T et al, Clin Cancer Res. 2006, 12(20):6144-52] o la utilización de antagonista de HGF/SF NK4 para evitar enlace de ligando a cMet [Kuba K et al., Cancer Res., 2000, 60:6737-43], ii) inhibidores de sitio de enlace ATP pequeños a cMet que bloquean actividad de cinasa [Christensen JG et al, Cancer Res. 2003, 63:7345-55], iii) polipéptido de dominio SH2 de ingeniería que interfiere con acceso al sitio de acoplamiento múltiple ARNI o ribozima que reduce expresión de ligando o receptor. La mayoría de estos enfoques exhiben una inhibición selectiva de cMet resultando en inhibición de tumor y mostrando que cMet puede ser de interés para intervención terapéutica en cáncer. Goetsch y Caucassanel divulgán unos procedimientos para identificar biomarcadores para las terapias dirigidas a c-Met ("Selection

5 criteria for c-Met-targeted therapies: emerging evidence for biomarkers", Biomarkers in Medicine, Future Medicine, 2010, 4(1): 149-170). El documento WO 2007/025276 describe unos anticuerpos dirigidos contra los epítopos presentes sobre las proteínas de superficie de VIH cuando se acoplan en complejos de multiproteínas. Doh et al. ("Novel monoclonal antibody that recognizes new neoantigenic determinant of D-dimer", Thrombosis Research, 2006, 118(3): 353-360) se refiere a un anticuerpo que puede reconocer una forma específica de fibrinógeno.

10 Se proporciona en la presente memoria por lo menos un reactivo, que puede utilizarse como un biomarcador de diagnóstico o pronóstico para detectar y/o supervisar trastornos onco-génicos especialmente aquellos caracterizados por expresión de cMet o aquellos que son mediados por expresión de cMet aberrante.

15 En la presente memoria se describen nuevos anticuerpos que cumplen con estos criterios.

20 Otras características y ventajas de la invención resultan evidentes a partir de la descripción detallada y los ejemplos siguientes.

25 En un primer aspecto, se describe una proteína de unión, o un fragmento o derivado funcional de la misma, que une específicamente a la forma activada independiente de ligando de la proteína cMet (cMet) preferentemente cMet humana, con alta afinidad y de esta manera puede ser útil en métodos para diagnosticar trastornos onco-génicos hiperproliferativos patológicos mediados por forma activada independiente de ligando de expresión cMet.

30 Una activación independiente de ligando se refiere a una fosforilación constitutiva de cMet consecutiva a i) ya sea una dimerización del receptor que ocurre en la ausencia de HGF en un caso de sobreexpresión de cMet (usualmente unido a una amplificación del gen cMet) o ii) a activar mutaciones dentro del dominio intracelular de cMet o iii) ambos.

35 En un primer aspecto, la invención se refiere a una proteína de unión, o un fragmento o derivado funcional de la misma, que en tumores i) específicamente se une a la forma activada independiente de ligando de cMet, pero ii) no se une a la o las formas activadas dependientes de ligando y/o no activadas de cMet.

40 La proteína de unión es un anticuerpo, un fragmento o derivado de un anticuerpo.

45 Las expresiones "fragmento(s) y/o derivado(s) funcional(es)" se definirán en detalle a continuación en la presente memoria.

50 Por la expresión "en tumor", debe entenderse que las propiedades mencionadas de la proteína de unión de acuerdo con la invención existen en el ambiente tumoral *in vivo* y no solo en ejemplos *in vitro*. Más particularmente, se ha demostrado que como resulta evidente a partir de los siguientes ejemplos, con experimentos *ex vivo* que representan un ambiente lo más cercanamente posible al natural o análisis en micromatriz de tejido (TMA)-comercial de tumor humano.

55 Debe entenderse en la presente memoria que la invención no se refiere a la proteína en forma natural, es decir que no está en su ambiente natural pero que ha podido ser aislada u obtenida por purificación de fuentes naturales, o de otra forma obtenida por recombinación genética, o por síntesis química, y que puede entonces contener aminoácidos no naturales como se describirá a continuación. De acuerdo con una forma de realización de la invención, se describe una proteína de unión o un fragmento o derivado funcional de la misma, como se describió anteriormente que no bloquea el enlace del factor de crecimiento de hepatocito-ligando (HGF) a cMet.

60 Más particularmente, la proteína de unión o un fragmento o derivado funcional de la misma, de la invención interactúa con la región extracelular de cMet entre residuos de aminoácidos 1 y 950.

65 Un "fragmento funcional" de un anticuerpo significa en particular un fragmento de anticuerpo tal como fragmentos Fv, scFv (sc= cadena simple) Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o cualquier fragmento cuya vida media se ha incrementado. Estos fragmentos funcionales se describirán en detalle a continuación en la presente descripción. La proteína de unión, o su derivado o fragmento funcional, consiste en un anticuerpo aislado.

70 Más preferentemente, la invención comprende los anticuerpos, sus compuestos derivados o sus fragmentos funcionales, divulgados en la presente memoria, que se obtienen por recombinación genética o síntesis química. El anticuerpo descrito en la presente memoria, o sus fragmentos funcionales o compuestos derivados, está(n) caracterizado(s) por que consiste en un anticuerpo monoclonal.

75 "Anticuerpo monoclonal" se entiende que significa un anticuerpo que surge de una población de anticuerpos casi homogénea. Más particularmente, los anticuerpos individuales de una población son idénticos excepto por unas cuantas mutaciones de origen natural posibles que pueden encontrarse en proporciones mínimas. En otras palabras, un anticuerpo monoclonal consiste en un anticuerpo homogéneo que surge del crecimiento de un solo

clon celular (por ejemplo un hibridoma, una célula anfitriona eucariótica transfectada con una molécula de ADN (ADN) que codifica el anticuerpo homogéneo, una célula anfitriona procariótica transfectada con una molécula de ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, etc.) y generalmente se caracteriza por cadenas pesadas de una y solo una clase y subclase, y cadenas ligeras de un solo tipo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un solo antígeno. Además, en contraste con preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diversos anticuerpos dirigidos contra diversos determinantes o epítopos, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo epítopo del antígeno.

Debe apreciarse en la presente memoria que la invención no se refiere a anticuerpos en forma natural, es decir, no se toman de su ambiente natural sino que se aíslan u obtienen por purificación de fuentes naturales u obtienen por recombinación genética o síntesis química y de esta manera pueden transportar aminoácidos no naturales como se describirá a continuación.

En la presente descripción, los términos “polipéptidos”, “secuencias polipéptido”, “péptidos” y “proteínas fijadas a compuestos de anticuerpo o a sus secuencias”, son intercambiables.

Debe apreciarse en la presente memoria que la invención no se refiere a anticuerpos en forma natural, es decir no se toman de su ambiente natural sino que se aíslan u obtienen por purificación de fuentes naturales u obtienen por recombinación genética o síntesis química y de esta manera pueden transportar aminoácidos no naturales como se describirá a continuación. Por regiones CDR o CDR(s), se pretenden indicar las regiones hipervariables de las cadenas ligera y pesada de las inmunoglobulinas como se define en IMGT.

La numeración única de IMGT se ha definido para comparar los dominios variables cualquiera que sea el receptor de antígeno, el tipo de cadena o la especie [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommie, C, Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol, 27, 55-77 (2003)]. En la numeración única de IMGT, los aminoácidos conservados siempre presentan la misma posición, por ejemplo cisteína 23 (1st-CYS), triptófano 41 (TRP CONSERVADO), aminoácido hidrófobo 89, cisteína 104 (2nd-CYS), fenilalanina o triptófano 118 (J-PHE o J-TRP). La numeración única IMGT proporciona una delimitación estandarizada de las regiones marco (FR1-IMGT: posiciones 1 a 26, FR2-IMGT: 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 y FR4-IMGT: 118 a 128) y de las regiones de determinación de complementariedad: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 y CDR3-IMGT: 105 a 117. Ya que espacios representan posiciones no ocupadas, los tramos CDR-IMGT (mostrados entre paréntesis cuadrados y separados por puntos, por ejemplo [8.8.13]) resultan información crucial. La numeración única IMGT se utiliza en representaciones gráficas 2D designadas como IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], y en estructuras 3D en IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Tres CDRs de cadena pesada y 3 CDRs de cadena ligera existen. Los términos CDR o CDRs se utilizan en la presente memoria a fin de indicar, de acuerdo con el caso, una o varias de estas regiones, o incluso todas estas regiones que contienen la mayoría de los residuos aminoácidos responsables del enlace por afinidad del anticuerpo por el antígeno o el epítopo que reconoce.

Para mayor claridad, debe apreciarse que la siguiente descripción y más particularmente en las tablas 2a, 2b y 3, las CDRs se definirán por numeración IMGT y por numeración Kabat.

Como se utiliza en la presente memoria, el “porcentaje de identidad” entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, significa el porcentaje de residuos nucleótidos o aminoácidos idénticos entre las dos secuencias que se van a comparar, que se obtienen después de alineamiento óptimo, este porcentaje es puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen en forma aleatoria sobre su longitud. La comparación de dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se lleva a cabo tradicionalmente al comparar las secuencias después de tenerlas alineadas en forma óptima, la comparación puede conducirse por segmento o al utilizar una “ventana de alineamiento”. El alineamiento óptimo de las secuencias para comparación puede llevarse a cabo, además de comparación a mano, mediante el algoritmo de homología local de Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], mediante el algoritmo de homología local de Needleman and Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], mediante el método de búsqueda de similaridad de Pearson and Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] o mediante soporte lógico de computadora utilizando estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA del Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o por el soporte lógico de comparación BLAST NR o BLAST P).

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos es determinado al comparar las dos secuencias alineadas en forma óptima en las que la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos para comparar, pueden presentar adiciones o eliminaciones comparadas con la secuencia de referencia para alineamiento óptimo entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula al determinar el número de posiciones en las cuales el nucleótido, aminoácido o residuo es idéntico entre las dos secuencias, dividir el número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en la ventana de alineamiento y multiplicar el

resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre las dos secuencias.

Por ejemplo, el programa BLAST, "secuencias BLAST 2" (Tatusova et ah, "Blast 2 SECuences - a new tool for comparing protein and nucleotide SECuences", FEMS Microbiol, 1999, Lett. 174:247-250) disponible en el sitio

5 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, puede utilizarse con los parámetros predefinidos (particularmente para los parámetros "sanción de espacio abierto" ("open gap penalty"): 5 y "sanción de espacio de extensión" ("extension gap penalty"): 2; la matriz seleccionada es por ejemplo la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa); el porcentaje de identidad entre las dos secuencias para comparar se calcula directamente por el programa.

10 Para la secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98%) de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia, ejemplos preferidos incluyen aquellos que contienen la secuencia de referencia, ciertas modificaciones, particularmente una eliminación, adición o sustitución de al menos un aminoácido, truncado o de extensión. En el caso de sustitución de uno o más aminoácidos

15 consecutivos o no consecutivos, se prefieren sustituciones en las que los aminoácidos sustituidos se reemplazan por aminoácidos "equivalentes". En la presente memoria, la expresión "aminoácidos equivalentes" se entiende que indique cualesquier aminoácidos que probablemente se sustituyan por uno de los aminoácidos estructurales sin modificar, sin embargo las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes de esos ejemplos específicos definidos a continuación.

20 Los aminoácidos equivalentes pueden ser determinados ya sea en su homología estructural con los aminoácidos para los cuales se sustituyen o en resultados de pruebas comparativas de actividad biológica entre los diversos anticuerpos que probablemente se generen.

25 Como un ejemplo no limitativo, la tabla 1 a continuación resume las sustituciones posibles que probablemente se lleven a cabo sin dar como resultado una modificación significativa de la actividad biológica del anticuerpo modificado correspondiente, las sustituciones inversas son posibles naturalmente bajo las mismas condiciones.

30 Tabla 1

Residuo Original	Sustitución (es)
Ala(A)	Val, Gly, Pro
Arg(R)	Lys, His
Asn(N)	Gln
Asp(D)	Glu
Cys(C)	Ser
Gln(Q)	Asn
Glu(G)	Asp
Gly(G)	Ala
His(H)	Arg
He(I)	Leu
Leu(L)	He, Val, Met
Lys(K)	Arg
Met(M)	Leu
Phe(F)	Tyr
Pro(P)	Ala
Ser(S)	Thr, Cys
Thr(T)	Ser
Trp(W)	Tyr
Tyr(Y)	Phe, Trp
Val(V)	Leu, Ala

Es conocido por el experto en la materia, que la mayor variabilidad (longitud y composición) entre las seis CDRs se encuentra en las tres CDRs de cadena pesada y más particularmente en CDR-H3 de esta cadena pesada.

35 En una forma de realización específica, la presente invención se refiere a un anticuerpo murino o compuestos derivados o fragmentos funcionales del mismo.

40 En una forma de realización preferida, el anticuerpo, o su fragmento o derivado funcional, de la invención que en tumores i) se une específicamente a la forma activada independiente de ligando de cMet, pero ii) no se une a la o las formas no activadas y/o activadas dependientes de ligando de cMet, comprende a) una cadena ligera que comprende las siguientes tres CDRs como se define de acuerdo con IMGT, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde CDR-L1 comprende la secuencia SEC ID nº: 1, CDR-L2 comprende la secuencia SEC ID nº: 2 y CDR-L3 comprende la secuencia SEC ID nº: 3 y b) una cadena pesada que comprende las siguientes tres CDRs como se define de acuerdo con IMGT, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde CDR-H1

comprende la secuencia SEC ID nº: 4, CDR-H2 comprende la secuencia SEC ID nº: 5 y CDR-H3 comprende la secuencia SEC ID nº: 6.

En una forma de realización preferida, el anticuerpo, o su fragmento o derivado funcional, de la invención que en tumores i) se une específicamente a la forma activada independiente del ligando de cMet, pero ii) no se une a la o las formas no activadas y/o activadas dependientes de ligando de cMet, comprende a) una cadena ligera que comprende las siguientes tres CDRs como se define de acuerdo con IMGT, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde CDR-L1 comprende la secuencia SEC ID nº: 9, CDR-L2 comprende la secuencia SEC ID nº: 10 y CDR-L3 comprende la secuencia SEC ID nº: 11 y b) una cadena pesada que comprende las siguientes tres CDRs como se define de acuerdo con IMGT, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde CDR-H1 comprende la secuencia SEC ID nº: 12, CDR-H2 comprende la secuencia SEC ID nº: 13 y CDR-H3 comprende la secuencia SEC ID nº: 14.

La invención de esta manera describe un anticuerpo o su fragmento o derivado funcional que en tumores i) se une específicamente a la forma activada independiente de ligando de cMet, pero ii) no se une a la o las formas no activadas y/o activadas dependientes de ligando de cMet, el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera de la secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 7 y un dominio variable de cadena pesada de la secuencia que comprende una secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 8.

La invención describe un anticuerpo, o su fragmento o derivado funcional que en tumores i) se une específicamente a la forma activada independiente de ligando de cMet, pero ii) no se une a la o las formas no activadas y/o activadas dependientes de ligando de cMet, el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera de la secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 15 y un dominio variable de cadena pesada de la secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 16.

La presente divulgación se refiere asimismo a cualquier compuesto derivado de un anticuerpo como se describe anteriormente.

Otro aspecto de la invención se refiere a los fragmentos funcionales del anticuerpo descrito anteriormente.

Más particularmente, la invención dianiza un anticuerpo, o sus compuestos o fragmentos funcionales derivados, caracterizado por que el fragmento funcional se selecciona de entre los fragmentos Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc y diacuerpos, o cualquier fragmento cuya vida media se ha incrementado tales como fragmentos PEGilados.

Estos fragmentos funcionales del anticuerpo de acuerdo con la invención consisten, por ejemplo en los fragmentos Fv, scFv (sc = cadena simple), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o cualquier fragmento cuya vida media se ha incrementado por modificación química, tal como la adición de polialquilenglicol tal como polietilenglicol (PEGilación) (fragmentos PEGilados se refieren como Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG y Fab'-PEG), o por incorporación en un liposoma, microesferas o PLGA, los fragmentos poseen al menos una de CDRs características de la invención que pueden particularmente ejercer una actividad en una forma general, incluso parcial del anticuerpo del cual surgen.

Preferentemente, dichos fragmentos funcionales comprenderán o incluirán una secuencia parcial de la cadena pesada o ligera variable del anticuerpo del cual derivan, la secuencia parcial es suficiente para retener la misma capacidad de enlace que el anticuerpo del cual surge y suficiente afinidad, preferentemente por lo menos igual a 1/100, más preferentemente por lo menos 1/10 de la del anticuerpo del cual procede.

Preferentemente, estos fragmentos funcionales serán de los tipos Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc o diacuerpos, que en general presentan la misma especificidad de enlace que el anticuerpo del cual resultan. De acuerdo con la presente invención, fragmentos del anticuerpo de la invención pueden obtenerse de los anticuerpos descritos anteriormente por métodos tales como digestión de enzima, incluyendo pepsina o papaína y/o por disociación de los puentes disulfuro por reducción química. Los fragmentos de anticuerpo también pueden obtenerse por técnicas genéticas recombinantes también conocidas por un experto en la materia o por síntesis de péptidos mediante por ejemplo sintetizadores peptídicos automáticos tales como los comercializados por Applied BioSystems, etc.

Para mayor claridad, la tabla 2 a continuación resume las diversas secuencias de aminoácidos que corresponden al anticuerpo de la invención de acuerdo con IMGT.

Tabla 2 (en la que Mu. = murino)

Anticuerpo	Numeración CDR	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID NO.
227D3	IMGT		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	3
		CDR-H1		4
		CDR-H2		5
		CDR-H3		6
			Dominio Variable Mu.	7
		Dominio Variable Mu.		8
205A4	IMGT		CDR-L1	9
			CDR-L2	10
			CDR-L3	11
		CDR-H1		12
		CDR-H2		13
		CDR-H3		14
			Dominio Variable Mu.	15
		Dominio Variable Mu.		16

- 5 De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un hibridoma murino que puede secretar un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención, particularmente el hibridoma de origen murino depositado en CNCM, Institut Pasteur, Paris, Francia, en noviembre 18, 2009, bajo el número 1-4247. El hibridoma se obtuvo por la fusión de esplenocitos de ratones inmunizados Balb/C y células de estirpes de mieloma Sp 2/O-Ag 14.
- 10 El anticuerpo monoclonal, al que se hace referencia en la presente memoria como 227D3, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, caracterizado por que el anticuerpo es secretado por el hibridoma depositado en CNCM en noviembre 18, 2009, bajo el número 1-4247, evidentemente forma parte de la presente invención.
- 15 La invención de esta manera comprende asimismo un anticuerpo monoclonal derivado de hibridoma 1-4247 o un subclón del mismo, que en tumores i) se une específicamente a la forma activada independientemente de ligando de cMet, pero ii) no se une a la o las formas no activadas y/o activadas dependientes de ligando de cMet.
- 20 De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un hibridoma murino que puede secretar un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención, particularmente el hibridoma de origen murino depositado en CNCM, Institut Pasteur, Paris, Francia, en noviembre 18, 2009, bajo el número 1-4246. El hibridoma se obtuvo por la fusión de esplenocitos de ratones inmunizados Bslb/C y células de los estirpes de mieloma Sp 2/O-Ag 14.
- 25 El anticuerpo monoclonal, al que se hace referencia en la presente memoria como 205A5, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, caracterizado por que el anticuerpo es secretado por el hibridoma depositado en CNCM en noviembre 18, 2009, bajo el número 1-4246, evidentemente forma parte de la presente invención.
- 30 La invención de esta manera comprende asimismo un anticuerpo monoclonal derivado de hibridoma 1-4246 o su subclón, que en los tumores i) se une específicamente a la forma activada independiente de ligando de cMet, pero ii) no se une a la o las formas activadas dependientes de ligando y/o no activadas de cMet.
- Otra forma de realización, se refiere a un ácido nucleico aislado, caracterizado por que se selecciona de entre los siguientes ácidos nucleicos:
- 35 a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo como se describe anteriormente;
- b) un ácido nucleico como en a), que comprende una secuencia de ADN que comprende las secuencias SEC ID nº: 27 a 32 o 35 a 40;
- 40 c) un ácido nucleico como en a), que comprende una secuencia de ADN que comprende las secuencias SEC ID nº: 33, 34, 41 o 42;
- d) los ácidos nucleicos de ARN correspondientes de los ácidos nucleicos como se define en b) o c); y
- 45 e) los ácidos nucleicos complementarios de los ácidos nucleicos como se define en a), b) y c).

La Tabla 3 a continuación resume las diversas secuencias de nucleótido que se refieren al anticuerpo de la invención. Todas las CDRs se definen en la presente memoria de acuerdo con IMGT.

Tabla 3

Anticuerpo	Numeración CDR	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº:
227D3	IMGT		CDR-L1	27
			CDR-L2	28
			CDR-L3	29
		CDR-H1		30
		CDR-H2		31
		CDR-H3		32
			Dominio de variable Mu.	33
				34
			CDR-L1	35
			CDR-L2	36
205A5	IMGT		CDR-L3	37
		CDR-H1		38
		CDR-H2		39
		CDR-H3		40
			Dominio de variable Mu.	41
				42

Las expresiones "ácido nucleico", "secuencia nucleica", "secuencia de ácido nucleico", "polinucleótido", "oligonucleótido", "secuencia de polinucleótido" y "secuencia de nucleótido", utilizadas de manera intercambiable en la presente descripción, significan una secuencia precisa de nucleótidos, modificados o no, que definen un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene los nucleótidos no naturales o no y ya es un ADN de doble hebra, un ADN de una hebra sencilla o productos de transcripción de los ADNs.

10 También habrá de incluirse entonces que la presente invención no se refiere a secuencias de nucleótido en su ambiente cromosómico natural, es decir en un estado natural. Las secuencias de la presente invención se han 15 aislado y/o purificado, es decir, se muestraron de forma directa o indirecta, por ejemplo por una copia, su ambiente ha sido al menos parcialmente modificado. Los ácidos nucleicos aislados que se obtienen por genética recombinante, mediante por ejemplo, de células hospedadoras, o que se obtienen por síntesis química también deberán ser mencionadas en la presente memoria.

20 "Secuencias nucleicas que exhiben un porcentaje de identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98%>, después de alineamiento óptimo con una secuencia preferida" significan secuencias nucleicas que exhiben, con respecto a la secuencia nucleica de referencia, ciertas modificaciones tales como, en particular, una eliminación, un truncado, una extensión, una fusión química y/o una sustitución, particularmente de forma puntual. Preferentemente, éstas son secuencias que codifican las mismas secuencias de aminoácidos 25 que la secuencia de referencia, relacionado con la degeneración del código genético, o secuencias complementarias que probablemente hibridarán específicamente con las secuencias de referencia, preferentemente bajo condiciones altamente severas, particularmente las definidas a continuación.

30 La hibridación bajo condiciones altamente severas significa que las condiciones relacionadas a temperatura y concentración iónica se seleccionan de manera tal que permiten que se mantenga en hibridación entre dos fragmentos ADN complementarios. Con una base puramente ilustrativa, las condiciones altamente severas de la etapa de hibridación para el propósito de definir los fragmentos de polinucleótido descritos anteriormente, son ventajosamente como se expone a continuación.

35 La hibridación ADN-ADN o ADN-ARN se lleva a cabo en dos etapas: (1) por hibridación a 42°C durante tres horas en amortiguador fosfato (20 mM, pH 7.5) que contiene 5X SSC (IX SSC corresponde a una solución de NaCl 0.15 M + citrato de sodio 0.015 M), formamida al 50%>, dodecil sulfato de sodio (SDS) al 7%, Denhardt's 40 10X, dextrano sulfato al 5% y ADN de esperma de salmón al 1%; (2) hibridación primaria durante 20 horas a una temperatura que depende de la longitud de la sonda (es decir: 42°C para una sonda >100 nucleótidos de longitud) seguido por dos lavados de 20 minutos a 20°C en 2X SSC + 2% SDS, un lavado de 20 minutos a 20°C en SSC 0,1X + SDS 0,1%. El último lavado se lleva a cabo en SSC 0,1X + SDS 0,1% durante 30 minutos a 60°C 45 por una sonda >100 nucleótidos de longitud. Las condiciones de hibridación altamente severas descritas anteriormente para un polinucleótido de tamaño definido, pueden adaptarse por un experto en la materia para oligonucleótidos más largos o más cortos, de acuerdo con los procedimientos descritos en Sambrook, et al. (Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory; 3rd edition, 2001).

Se describe asimismo en la presente memoria un vector que comprende un ácido nucleico como se describe en la invención.

La presente divulgación particularmente dianiza los vectores de expresión y/o clonación que contienen esta secuencia de nucleótidos.

- 5 Dichos vectores preferentemente contienen elementos que permiten la expresión y/o secreción de secuencias de nucleótidos en una célula hospedadora determinada. El vector de esta manera debe contener un promotor, señales de inicio y terminación de traducción así como regiones de regulación de transcripción convenientes. Debe poder mantenerse de una manera estable en la célula hospedadora y puede opcionalmente tener señales específicas que especifican la secreción de la proteína traducida. Estos diversos elementos se seleccionan y optimizan por un experto en la materia de acuerdo con la célula hospedadora utilizada. Para este propósito, las secuencias de nucleótido pueden insertarse en vectores autorreplicantes dentro del hospedador seleccionado o ser vectores integradores del hospedador seleccionado.
- 10 Estos vectores se preparan por métodos típicamente utilizados por un experto en la materia y los clones resultantes pueden introducirse en un hospedador conveniente por métodos estándares tales como lipofección, electroporación, choque térmico o métodos químicos.
- 15 Los vectores por ejemplo son vectores de origen plásmido o viral. Se utilizan para transformar células hospedadoras para clonar o expresar las secuencias de nucleótidos de la invención.
- 20 La presente divulgación también comprende unas células hospedadoras transformadas caracterizadas por que comprenden un vector como se describe anteriormente.
- 25 La célula hospedadora puede seleccionarse de entre sistemas procarióticos o eucarióticos tales como células bacterianas por ejemplo, pero también células de levadura o células de animales, particularmente células de mamíferos. Las células de insectos o plantas también pueden utilizarse.
- 30 La presente divulgación también se refiere a animales, diferentes a los humanos, que presentan una célula transformada de acuerdo descrita anteriormente.
- 35 a) el cultivo en un medio de y las condiciones de cultivo convenientes para una célula hospedadora como se describe anteriormente; y
 b) la recuperación del anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, de esta manera producidos del medio de cultivo o de las células cultivadas.
- 40 Las células transformadas descritas anteriormente son de utilización en métodos para la preparación de polipéptidos recombinantes divulgados anteriormente. Los métodos para la preparación de polipéptidos de acuerdo con la invención de manera recombinante, caracterizados por que los métodos utilizan un vector y/o una célula transformada por un vector de acuerdo con la invención, también están comprendidos en la presente divulgación. Preferentemente, una célula transformada por un vector de acuerdo con la invención se cultiva bajo condiciones que permiten la expresión del polipéptido anteriormente mencionado y recuperación del péptido recombinante.
- 45 Como se menciona anteriormente, la célula hospedadora puede seleccionarse entre sistemas procarióticos o eucarióticos. En particular, es posible identificar las secuencias de nucleótidos que facilitan la secreción en este sistema procariótico o eucariótico. Un vector como se describe anteriormente portador de esta secuencia, puede de esta manera utilizarse ventajosamente para la producción de proteínas recombinantes que se deben secretar. Sin duda, la purificación de estas proteínas recombinantes de interés se facilitará por el hecho de que están presentes en el sobrenadante del cultivo celular en vez de dentro de las células hospedadoras.
- 50 Los presentes polipéptidos también pueden prepararse por síntesis química. Un método de preparación semejante también es un objeto de la presente divulgación. Un experto en la materia conoce los métodos para síntesis química, tales como técnicas de fase sólida (ver particularmente Steward et al., 1984, *Solid phase peptides synthesis*, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed.) o técnicas en fase sólida parcial, por condensación de fragmentos o por síntesis en solución convencional. Los polipéptidos obtenidos por síntesis química y que pueden contener aminoácidos no naturales correspondientes también están comprendidos en la presente divulgación. Los anticuerpos, o los compuestos derivados o fragmentos funcionales de los mismos, probablemente para obtenerse por dicho método también están comprendidos en la presente divulgación.
- 55 La invención también comprende la utilización *in vitro* de una proteína de unión o un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención, o un fragmento o derivado funcional del mismo, para la identificación de la forma

activada independientemente de ligando de cMet.

En otra forma de realización, la invención se refiere a un procedimiento para diferenciar entre la forma activada independiente de ligando de cMet y otras formas de cMet, incluyendo formas no activadas o activadas dependientes de ligando de cMet, en una muestra, este procedimiento comprende las etapas de:

- 5 a) poner en contacto la muestra con un enlace o un anticuerpo de acuerdo con la invención, o su fragmento o derivado funcional, y
- 10 b) detectar la unión de la proteína de unión o anticuerpo con la muestra.

La utilización de la proteína de unión, y más particularmente el anticuerpo de la invención como biomarcador también se describe. Los métodos pueden utilizarse para detectar o diagnosticar diversos trastornos onco-génicos hiperproliferativos asociados con la expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet, ejemplificados por pero no limitados a, osteosarcomas, cáncer pulmonar, cáncer de mama, cáncer endometrial, glioblastoma, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer renal, hepatocarcinomas o cualquier otro cáncer asociado con la expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet. Como se reconocerá por un experto ordinario en la materia, el nivel de expresión de anticuerpo y/o proteína de unión asociado con un trastorno particular, variará dependiendo de la naturaleza y/o gravedad de la afección preexistente.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vivo* para detectar o diagnosticar o clasificar en un paciente, trastornos onco-génicos hiperproliferativos asociados con la expresión de la forma activada independientemente de ligando de cMet, particularmente los trastornos onco-génicos hiperproliferativos como se menciona anteriormente, el método comprende las etapas de:

- 25 a) administración de la proteína de unión y/o anticuerpos divulgados anteriormente, preferentemente marcados, al paciente que lo requiere; y
- 30 b) detectar, preferentemente por formación de imagen, enlace de la proteína de unión o anticuerpo con la forma activada independiente de ligando de cMet expresada en el paciente, preferentemente por el órgano del paciente en donde se sospecha o se conoce la presencia de células tumorales o tumor (particularmente para la clasificación).

35 La administración de la proteína de unión y/o anticuerpos divulgados en la presente memoria en cualquiera de las formas convencionales conocidas por un experto en la materia (por ejemplo, tópica, parenteral, intramuscular, etc.), proporcionará un método extremadamente útil para detectar células displásicas en una muestra así como permitir que un médico clínico supervise el régimen terapéutico de un paciente que se somete a tratamiento para un trastorno hiperproliferativo asociado con o mediado por expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet.

40 En otra forma de realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica para formación de imagen *in vivo* de un trastorno onco-génico asociado con la expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet, que comprende la proteína de unión y/o anticuerpo o su fragmento anteriores, que se marca y que une a la forma activada independiente de ligando de cMet *in vivo*; y un portador farmacéutico aceptable.

45 La proteína de unión y el anticuerpo divulgados en la presente memoria o su fragmento o derivado funcional, se utilizarán para diversos propósitos médicos o de investigación, incluyendo la detección, diagnóstico y clasificación de diversas patologías asociadas con la expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet.

50 La determinación de etapas tiene un valor potencial de pronóstico y proporciona criterios para diseñar terapias óptimas. Simpson et al, J. Clin. Oncology 18:2059 (2000). En general, la clasificación por etapas patológicas de cáncer de mama por ejemplo, resulta preferida la clasificación por etapas clínica debido a que la primera proporciona un pronóstico más preciso. Sin embargo, la clasificación por etapas clínicas se preferirá si fuera tan precisa como la clasificación por etapas patológica debido a que no depende de un procedimiento invasivo para obtener tejido para evaluación patológica.

60 Cuando se utilizan con marcadores convenientes u otra biomolécula o productos químicos detectables apropiados, la proteína de unión y/o anticuerpo de la invención es particularmente útil para aplicaciones de diagnóstico y pronóstico *in vitro* e *in vivo*.

65 Los marcadores para utilizar en inmunoensayos, en general se conocen por un experto en la materia e incluyen enzimas, radioisótopos, y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromógenas, incluyendo partículas de color tales como perlas de látex u oro coloidal. Los inmunoensayos convenientes incluyen ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima (ELISA). Diversos tipos de marcadores y métodos de conjugado de los marcadores a la proteína de unión y/o los anticuerpos de la invención son bien conocidos por un experto en la

materia, tales como los establecidos a continuación.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "un trastorno oncógeno asociado con la expresión de forma activada independiente de ligando de cMet", se pretende que incluya enfermedades y otros trastornos en los que

5 la presencia de altos niveles o niveles anormalmente bajos de forma activada independiente de ligando de cMet (aberrante) en un sujeto que sufre trastorno, se ha mostrado que son o se sospecha son ya responsables por la patofisiología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Alternativamente, estos trastornos pueden ser evidenciados, por ejemplo por un aumento en los niveles de la forma activada independiente de ligando de cMet en la superficie celular que resulta en una autofosforilación de tirosina incrementada de cMet en las células o tejidos afectados de un sujeto que sufre del trastorno. El aumento en la forma activada independiente de ligando de cMet puede ser detectado por ejemplo utilizando el anticuerpo 205A5 o 227D3 de la invención. Aún más, se refiere a células que exhiben crecimiento relativamente autónomo, de manera tal que exhiben un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significante de control de proliferación celular. Alternativamente, las células pueden expresar niveles normales de la forma activada independiente de ligando de cMet pero están marcadas por proliferación anormal.

10 En ciertas formas de realización, "expresión incrementada" como se refiere a la forma activada independiente de ligando de cMet, se refiere a niveles de expresión de proteínas o genes que demuestran un aumento estadísticamente significativo en expresión (como se mide por expresión de proteína o expresión de ARN) respecto a un control.

15 Más particularmente, se considera la utilización de una proteína de unión o un anticuerpo, o un fragmento funcional o su derivado, como se describe, para diagnóstico *in vitro* de un trastorno oncógeno asociado con la expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet, o determinar *in vitro* el pronóstico para desarrollar un trastorno oncógeno asociado con la expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet.

20 Otros amplio aspecto de acuerdo con la invención se refiere a un método para diagnosticar un trastorno oncógeno hiperproliferativo patológico o una susceptibilidad a una afección patológica asociada con la expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet, en un sujeto que comprende determinar la presencia o ausencia de la forma activada independiente de ligando de células que contienen cMet en una muestra, y diagnosticar una afección patológica o susceptibilidad a una afección patológica sobre la base en la presencia o ausencia de la forma activada independiente de ligando de células que contienen cMet. Las utilizaciones para diagnóstico de la proteína de unión o el anticuerpo de la invención comprenden tumores primarios, cánceres y metástasis. La proteína de unión o el anticuerpo pueden estar presentes en la forma de un inmunoconjunto o de una proteína/anticuerpo de enlace marcado para obtener una señal detectable y/o cuantificable.

25 Más particularmente, un objeto preferido es un procedimiento para detectar *in vitro* la presencia y/o ubicación de una forma activada independiente de ligando de tumor que expresa cMet en un sujeto, en el que el procedimiento comprende las etapas de a) poner en contacto una muestra de un sujeto con una proteína de unión o un anticuerpo, o su fragmento funcional o derivado, de acuerdo con la invención, y b) detectar el enlace de la proteína de unión o anticuerpo con la muestra. Otro aspecto del sujeto es seguimiento de la forma activada independiente de ligando de la expresión de cMet como una respuesta a terapia dirigida a cMet durante pruebas clínicas, y más particularmente cuando la regulación a la baja y o degradación de la forma activada independiente de ligando de cMet es uno del componente del mecanismo de acción del componente probado.

30 Como resulta evidente para un experto en la materia, la detección del enlace de los presentes proteína de unión o anticuerpo puede ser revelada por diversos ensayos. Aunque cualesquiera medios para llevar a cabo los ensayos sean compatibles con la invención, pueden mencionarse como ejemplos FACS, ELISA o IHC.

35 Como se utiliza en la presente memoria, el término "muestra" se pretende que signifique cualquier fluido biológico, célula, tejido, órgano o porción de los mismos, que incluye o incluye potencialmente una célula neoplásica, tales como una célula de colon, gástrica, recto, mama, ovario, próstata, riñón, pulmón, sangre, cerebro u otro órgano o tejido que contiene o se sospecha que contiene una célula neoplásica. El término incluye muestras presentes en un individuo así como muestras que se obtienen o derivan del individuo. Por ejemplo, una muestra puede ser una sección histológica de un espécimen que se obtiene por biopsia, o células que se colocan en o adaptan al cultivo de tejido. Una muestra además puede ser una fracción subcelular o extracto o una preparación de proteína o molécula de ácido nucleico sustancialmente puro.

40 La muestra clínica se pretende que comprenda una variedad de tipos de muestra que se obtienen de un sujeto y útil en el procedimiento divulgado en la presente memoria, tal como por ejemplo, una prueba de diagnóstico, supervisión o monitorización para determinar o detectar niveles de expresión en la forma activada independiente de ligando de cMet. La definición comprende unas muestras de tejido sólido que se obtienen por eliminación quirúrgica, un espécimen patológico, una muestra archivada o un espécimen de biopsia, cultivos de tejido o células derivadas de los mismos y su progenie, y secciones o frotis preparados de cualquiera de estas fuentes. Los ejemplos no limitativos son muestras que se obtienen de tejido de mama, nodos linfáticos, colon, páncreas,

próstata, etc. La definición también comprende muestras de líquidos de origen biológico, y pueden referirse ya sea a las células o fragmentos celulares que ahí se suspenden o al medio líquido y sus solutos.

Otro aspecto se refiere a un procedimiento para determinar el nivel de expresión *in vitro* de la forma activada independiente de ligando de cMet, en un tumor que expresa cMet de un sujeto, en el que el procedimiento comprende las etapas de: a) poner en contacto una muestra del sujeto con una proteína de unión o un anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, de acuerdo con la invención, y b) cuantificar el nivel de proteína de unión o anticuerpo que se une a la forma activada independiente de ligando de cMet en dicha muestra.

Como resulta evidente para un experto en la materia, el nivel de proteína de unión o anticuerpo que se enlaza a la forma activada independiente de ligando de cMet puede ser cuantificado en una cantidad de formas tales como por diversos ensayos. Aunque cualesquiera medios para llevar a cabo los ensayos son compatibles con la invención, un método preferido pone en desarrollo procedimientos inmunoenzimáticos de acuerdo con la técnica ELISA, por inmunofluorescencia, por inmunohistoquímica o una técnica de radio inmunoensayo (RIA) o equivalente.

En una forma de realización preferida del procedimiento de la invención, el nivel de expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet se mide por inmunohistoquímica (IHC).

Preferentemente, la muestra biológica se forma por un fluido biológico, tal como suero, sangre entera, células, una muestra de tejido o biopsias de origen humano. La muestra, por ejemplo puede incluir, tejido de biopsia, que puede ensayarse de manera conveniente por la presencia de un trastorno oncógeno hiperproliferativo patológico asociado con la expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet.

Una vez que se realiza una determinación de la cantidad de la forma activada independiente de ligando de cMet presente en la muestra de prueba, los resultados pueden compararse con aquellos de muestras de control, que se obtienen en una forma similar a las muestras de prueba pero de individuos que no tienen o presentan un trastorno oncógeno hiperproliferativo asociado con la expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet. Si el nivel de la forma activada independiente de ligando de cMet se eleva significativamente en la muestra de prueba, puede concluirse que existe una probabilidad incrementada de que el sujeto del cual se derivó presente o desarrolle ese trastorno.

La invención se refiere, más particularmente, a un procedimiento para diagnosticar *in vitro* una forma activada independiente de ligando de un tumor que expresa cMet o determinar *in vitro* el pronóstico para desarrollar una forma activada independiente de ligando del tumor que expresa cMet en un sujeto, en el que el procedimiento comprende las etapas de a) determinar el nivel de expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet, como se describió anteriormente, y b) comparar el nivel de expresión de la etapa a) con un nivel de expresión de referencia de la forma activada independiente de ligando de cMet, de tejido normal o una forma activada independiente de ligando sin expresión del tejido de cMet.

"Diagnosticar" una enfermedad como se utiliza en la solicitud, se pretende que incluyan, por ejemplo, diagnóstico o detección de la presencia de un trastorno oncógeno hiperproliferativo patológico asociado con o mediado por la expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet, supervisar el progreso de la enfermedad, e identificar o detectar células o muestras que son indicativas de un trastorno asociado con la expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet.

"Pronóstico" como se utiliza en la presente solicitud significa la probabilidad de recuperación de una enfermedad o la predicción del desarrollo probable o resultado de una enfermedad. Por ejemplo, si una muestra de un sujeto es positiva para tinción con la proteína de unión o el anticuerpo de la invención, entonces el "pronóstico" para ese sujeto es mejor que si la muestra fuera negativa para la forma activada independiente de ligando de tinción de cMet. Las muestras pueden ser puntuadas para forma activada independiente de ligando de los niveles de expresión de cMet en una escala apropiada como se detalla más a continuación.

Sin embargo otro aspecto también se refiere a la supervisión de la forma activada independiente de ligando de la expresión de cMet para compuestos terapéuticos que inducen una degradación de cMet como uno de sus mecanismos de acción. En este caso después de la forma activada independiente de ligando de la expresión de cMet en membrana celular puede ser una herramienta crítica para evaluar la eficacia del tratamiento durante pruebas clínicas y terapias "personalizadas".

El nivel de expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet se compara o mide ventajosamente en relación a niveles en una muestra o célula de control a los que se hace referencia asimismo como un "nivel de referencia" o "nivel de expresión de referencia". "Nivel de referencia", "nivel de expresión de referencia", "nivel de control" y "control" se utilizan de manera intercambiable en la descripción. Es decir, un "nivel de control" significa un nivel de línea base separado medido en una célula de control comparable, que en general está libre de enfermedad o cáncer. Puede ser del mismo individuo o de otro individuo que es normal o no presenta la misma

enfermedad de la cual se obtiene la muestra de prueba o enferma. Dentro del contexto de la presente invención, la expresión "nivel de referencia" se refiere a un "nivel de control" de expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet utilizado para evaluar un nivel de prueba de expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet en una muestra que contiene células de cáncer de un paciente. Por ejemplo, 5 cuando el nivel de la forma activada independiente de ligando de cMet en la muestra biológica de un paciente es superior al nivel de referencia o la forma activada independiente de ligando de cMet, las células se considera que tienen un nivel de expresión alto, o sobreexpresión, de la forma activada independiente de ligando de cMet. El nivel de referencia puede ser determinado por una pluralidad de métodos. Los niveles de expresión pueden de 10 esta manera definir la forma activada independiente de ligando de células que contienen cMet o alternativamente el nivel de expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet independiente del número de células que expresan la forma activada independiente de ligando de cMet. De esta manera el nivel de referencia por cada paciente puede describirse por una proporción de referencia de la forma activada independiente de ligando de cMet, en donde la proporción de referencia puede ser determinada por cualquiera de los métodos para 15 determinar los niveles de referencia descritos en la presente memoria.

Por ejemplo, el control puede ser un valor predeterminado, que puede adoptar una variedad de formas. Puede 20 ser un valor de un solo corte, tal como una media o promedio. El "nivel de referencia" puede ser un solo número, igualmente aplicable a cada paciente en forma individual, o el nivel de referencia puede variar de acuerdo con subpoblaciones específicas de pacientes. De esta manera, por ejemplo hombres mayores pueden tener un nivel 25 de referencia diferente a hombres más jóvenes para el mismo cáncer, y mujeres pueden presentar un nivel de referencia diferente que los hombres para el mismo cáncer. Alternativamente, el "nivel de referencia" puede ser determinado al medir el nivel de expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet en células de cáncer no onco 30 génas del mismo tejido como el tejido de las células neoplásicas que se debe someter a prueba. Por igual, el "nivel de referencia" puede ser una cierta proporción de la forma activada independiente de ligando de niveles cMet en células neoplásicas de un paciente respecto a la forma activada independiente de ligando de cMet en células no tumorales dentro del mismo paciente. El "nivel de referencia" también puede ser un 35 nivel de la forma activada independiente de ligando de cMet de células cultivadas *in vitro*, que pueden manipularse para simular células de tumor, o puede manipularse en cualquier otra forma que produzca niveles de expresión que determinen en forma precisa el nivel de referencia. Por otra parte, el "nivel de referencia" 40 puede establecerse sobre la base de grupos comparativos, tales como en grupos que no tienen la forma activada independiente de ligando elevada de los niveles cMet y grupos que tienen la forma activada independiente de ligando elevada de los niveles de cMet. Otro ejemplo de grupos comparativos serán grupos que tienen una particular enfermedad, afección o síntomas y grupos sin la enfermedad. El valor predeterminado puede disponerse por ejemplo cuando una población sometida a prueba se divide igualmente (o desigualmente) en 45 grupos, tales como un grupo de bajo riesgo, un grupo de riesgo medio y un grupo de alto riesgo o en cuadrantes o quintiles, en el cuadrante más bajo o quintil son individuos con el más bajo riesgo o la cantidad más alta de la forma activada independiente de ligando de cMet y en el cuadrante o quintil más alto son individuos con el riesgo más alto o la cantidad más baja de la forma activada independiente de ligando de cMet.

El nivel de referencia también puede determinarse por comparación del nivel de la forma activada independiente 50 de ligando de cMet en poblaciones de pacientes que tienen el mismo cáncer. Esto puede lograrse, por ejemplo por análisis de histograma, en el que toda una cohorte de pacientes se presenta gráficamente, en el que un primer eje representa el nivel de la forma activada independiente de ligando de cMet, y un segundo eje representa el número de pacientes en cuya cohorte las células tumorales expresan la forma activada independiente de ligando de cMet a un nivel determinado. Dos o más grupos de pacientes separados pueden 55 determinarse por identificación de poblaciones subconjunto de la cohorte que tiene los niveles iguales o similares de la forma activada independiente de ligando de cMet. La determinación del nivel de referencia puede entonces realizarse sobre la base de un nivel que distingue mejor estos grupos separados. Un nivel de referencia también puede representar los niveles de dos o más marcadores, uno de los cuales es la forma activada independiente de ligando de cMet. Dos o más marcadores pueden ser representados, por ejemplo, por una proporción de 60 valores para niveles de cada marcador.

Igualmente, una población aparentemente sana presenta un intervalo "normal" diferente al que presenta una población que es conocido que presenta una afección asociada con la expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet. De acuerdo con esto, el valor predeterminado seleccionado puede considerar 65 la categoría en la que se encuentra un individuo. Los intervalos y las categorías apropiados pueden seleccionarse con no más que experimentación rutinaria por un experto en la materia. Por "elevado", "incrementado" se entiende alto respecto a un control seleccionado. Típicamente, el control se basará en individuos normales sanos aparentemente en un grupo de edad apropiada.

Debe asimismo apreciarse que los controles pueden ser, además de los valores predeterminados, unas muestras de materiales sometidos a prueba paralelamente a los materiales experimentales. Los ejemplos incluyen tejido o células que se obtienen al mismo tiempo del mismo sujeto, por ejemplo partes de una sola biopsia, o partes de una muestra celular única del sujeto.

En el diagnóstico clínico o la supervisión de pacientes con una forma activada independiente de ligando de

enfermedades mediadas por cMet, la detección de forma activada independiente de ligando de cMet de células que expresan o un aumento en los niveles de la forma activada independiente de ligando de cMet, en comparación con los niveles en una muestra biológica correspondiente de un sujeto normal o tejido no canceroso, generalmente es indicativo de un paciente con o que se sospecha que presenta una forma activada independiente de ligando de trastorno mediado por cMet.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, se proporciona un procedimiento para pronosticar la susceptibilidad de cáncer, comprendiendo dicho procedimiento detectar el nivel de expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet, en una muestra de tejido, su presencia indica susceptibilidad a cáncer, en el que el grado de la forma activada independiente de ligando de expresión de cMet, correlaciona con el grado de susceptibilidad. De esta manera, en las formas de realización específicas, la expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet por ejemplo en tejidos de próstata, tejido de osteosarcomas, tejido pulmonar, tejido pancreático, tejido de colon, tejido de mama, tejido de glioblastoma, tejidos de ovarios o cualquier otro tejido que se sospecha de células que expresan la forma activada independiente de ligando de cMet, se examina con la presencia de la forma activada independiente de ligando de cMet en una muestra que proporciona una indicación de susceptibilidad de cáncer o aparición o existencia de un tumor específico de tejido.

Un método para evaluar la agresividad de tumor también se proporciona. En una forma de realización, un método para observar el progreso de una malignidad en un individuo con el tiempo, comprende determinar el nivel de forma activada independiente de ligando de cMet expresado por células en una muestra del tumor, comparar el nivel así determinado con el nivel de la forma activada independiente de ligando de cMet expresado en una muestra de tejido equivalente que se toma del mismo individuo en un momento diferente, en el que el grado de forma activada independiente de ligando de expresión de cMet en la muestra de tumor con el tiempo, proporciona información en el progreso del cáncer.

Todavía en otra forma de realización, la solicitud proporciona métodos para determinar el protocolo terapéutico apropiado para un sujeto. Específicamente, la proteína de unión o los anticuerpos divulgados en la presente memoria serán muy útiles para supervisar el curso de mejora de la malignidad en un individuo, especialmente en aquellas circunstancias en las que el sujeto se trata con la proteína de unión cMet o anticuerpo que no compite con la proteína de unión o los anticuerpos de la invención para unirse a la forma activada independiente de ligando de cMet. La presencia o ausencia o un cambio en el nivel de la forma activada independiente de ligando de cMet puede ser indicativo de que el sujeto probablemente presente una recidiva o un cáncer progresivo persistente asociado a la forma activada independiente de ligando de cMet. De esta manera, al medir un aumento en el número de células que expresan la forma activada independiente de ligando de cMet o cambios en la concentración de la forma activada independiente de ligando de cMet presente en diversos tejidos o células, es posible determinar si un régimen terapéutico particular dirigido a mejorar una malignidad asociada con la forma activada independiente de ligando de cMet, es efectivo.

Otro objeto es un método *in vivo* para la formación de imágenes de un trastorno oncógeno asociado con una expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet. Por ejemplo, este método puede utilizarse en un paciente que presenta síntomas de un trastorno oncógeno. Si el paciente por ejemplo presenta unos niveles de expresión incrementados de forma activada independiente de ligando de cMet, entonces el paciente probablemente sufrirá un trastorno canceroso. Por igual, el método puede ser útil para supervisar el progreso y/o la respuesta al tratamiento en pacientes a quienes se les ha diagnosticado previamente con una forma activada independiente de ligando de cáncer mediado por cMet. De acuerdo con el objeto anterior, se proporciona un reactivo para formación de imagen *in vivo* que comprende una proteína de unión o un anticuerpo de acuerdo con la invención, o un fragmento o derivado funcional del mismo, preferentemente marcado, especialmente radiomarcado, y su uso en formación de imagen médica. De esta manera, un método general de acuerdo con la invención funciona al administrar a un paciente una cantidad eficaz para formación de imagen de un reactivo para formación de imagen tal como el anticuerpo o proteína de unión anteriormente descrito que se marca y un portador farmacéuticamente efectivo y después detectar el agente después de que se ha unido a la forma activada independiente de ligando de cMet presente en la muestra. En ciertas formas de realización, el método funciona al administrar una cantidad eficaz para formación de imagen de un agente de formación de imagen que comprende una porción que dianiza y una porción activa. El agente de formación de imagen se administra en una cantidad eficaz para uso de diagnóstico en un mamífero tal como un humano y la localización y acumulación del agente para formación de imagen se detecta a continuación. La localización y acumulación del agente para formación de imagen pueden ser detectadas por formación de imagen por radionúclido, radiocentellograma, formación de imagen por resonancia magnética nuclear, tomografía computarizada, tomografía por emisión de positrones, tomografía axial computarizada, método de formación de imagen por resonancia magnética o rayos X, detección de fluorescencia y detección quimioluminiscente.

Respecto al desarrollo de terapia antitumor dirigida, el diagnóstico con técnicas inmunohistológicas proporciona, *in situ*, información a nivel de expresión del receptor y de esta manera permite que pacientes seleccionados susceptibles de tratamiento sigan el nivel de expresión de receptores requeridos para este tratamiento.

Para inmunoterapia que utiliza anticuerpos monoclonales, la respuesta al tratamiento dependiendo del nivel de

- expresión dirigido al receptor como tratamiento con trastuzumab en el que la determinación de la sobreexpresión Her2 en carcinoma de mama es entonces de importancia clínica principal con el surgimiento del anticuerpo monoclonal anti-Her2 humanizado trastuzumab. La demostración de sobreexpresión de Her2 es un prerrequisito para tratamiento con trastuzumab ya que actúa al dianizar específicamente células de carcinoma que sobreexpresan Her2. Una prueba precisa para Her2 se dirige a asegurar que el tratamiento con trastuzumab costoso y potencialmente tóxico no se proporciona a pacientes con tumores que no sobreexpresan y que todo paciente que puede beneficiarse trastuzumab recibe el tratamiento apropiado.
- 5 La enseñanza con trastuzumab que se refiere a la selección de paciente que sobreexpresa Her2 mostró el beneficio para determinar el nivel de expresión del receptor cuando se utiliza una terapia con un anticuerpo monoclonal y para desarrollar, al mismo tiempo, un anticuerpo monoclonal terapéutico, un anticuerpo monoclonal que puede utilizarse para la selección de pacientes.
- 10 Como consecuencia, se proporciona en la presente memoria un procedimiento para determinar *in vitro* la forma activada independiente de ligando del estado de cMet de un tumor de un sujeto, en el que el procedimiento comprende las etapas de a) determinar el nivel de expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet, como se describió anteriormente, b) puntuar el tumor para forma activada independiente de ligando de nivel de expresión de cMet, y c) comparar la puntuación con la obtenida de una muestra de control.
- 15 20 "La forma activada independiente de ligando del estado cMet" como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la clasificación de tumor a una forma activada independiente de ligando de cMet positivo [forma activada independiente de ligando de cMet (+)] o una forma activada independiente de ligando de cMet negativo [forma activada independiente de ligando de cMet (-)] clase basada en la determinación del nivel de expresión de la forma activada independiente de ligando del gen cMet como se mide por cualesquiera métodos tales como hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH), hibridación cromogénica *in situ* (CISH), chip génico u otros métodos conocidos por un experto en la materia.
- 25 30 En una forma de realización preferida, el anticuerpo para diagnóstico debe poder unirse al receptor dianizado cuando se fijan con formalina muestras de tejido e incrustan en parafina.
- 35 40 Má particularmente, la forma activada independiente de ligando del nivel de expresión de cMet se mide por inmunohistoquímica (IHC).
- 45 50 Como un ejemplo, pueden puntuarse unas muestras para la forma activada independiente de ligando de los niveles de expresión de cMet en una escala de 0-3⁺ para niveles tinción de anticuerpo o proteína de unión, en la que 0 es negativo y 1⁺-3⁺ representan una tinción positiva en cuatro etapas semicuantitativas de intensidad creciente. Las puntuaciones 1⁺-3⁺ pueden recodificarse como positivas debido a que cada puntuación positiva puede estar asociada con riesgo significativamente reducido para recidiva y enfermedad fatal cuando se comparan con puntuación de 0 (negativo), pero intensidad creciente entre las puntuaciones positivas puede proporcionar reducción de riesgo adicional. Cualquier método de análisis de riesgo convencional puede utilizarse para estimar el valor de pronóstico de la forma activada independiente de ligando de cMet. Los métodos de análisis representativos incluyen análisis de regresión Cox que es un método semiparamétrico para modelar datos de tiempo-a-evento o supervivencia en la presencia de casos censurados (Hosmer y Lemeshow, 1999; Cox, 1972). En contraste con otro análisis de supervivencia, por ejemplo tablas de vida o Kaplan-Meyer, Cox permite la inclusión de variables pronosticadoras (covariables) en los modelos. Utilizando un método de análisis convencional, por ejemplo Cox, se puede probar la hipótesis respecto a la correlación de la forma activada independiente de ligando para estado de expresión de cMet en un tumor primario a tiempo para inicio de cualquier recidiva de enfermedad (tiempo de supervivencia libre de enfermedad, o tiempo a enfermedad metastática), o tiempo para fallecimiento por la enfermedad (tiempo de supervivencia total). El análisis de regresión Cox también se conoce como análisis de riesgo proporcional Cox. Este método es estándar para prueba del valor de pronóstico de un marcador de tumor en tiempo de supervivencia del paciente. Cuando se utiliza en modo multivariado, el efecto de varias covariables se prueba en paralelo de manera tal que las covariables individuales que tienen valor de pronóstico independiente puedan ser identificadas, es decir los marcadores más útiles. El término positivo o negativo "forma activada independiente de ligando del estado cMet" [al que se hace referencia asimismo como forma activada independiente de ligando de cMet (+) o forma activada independiente de ligando de cMet (-)] de tumores, se refiere a puntuaciones 0 o puntuaciones 1⁺-3⁺, respectivamente.
- 55 60 65 Una muestra puede ser "puntuada" durante el diagnóstico o la supervisión de cáncer. En su forma más simple la puntuación puede ser categóricamente negativa o positiva como se juzga por examen visual de muestras mediante inmunohistoquímica. Una puntuación más cuantitativa involucra juzgar la intensidad de los dos parámetros de tinción y la proporción de células teñidas ("positivas") que se muestrean. Sobre la base de estos dos parámetros, se pueden asignar números que reflejan niveles crecientes de tinción positiva. Allred et al (Allred, Harvey et al. 1998) han descrito una forma de lograr esto, que involucra puntuar ambos parámetros en una escala de 0 (negativo) a 3⁺, y resumir las puntuaciones de los parámetros individuales a una puntuación total. Esto resulta en una escala con puntuaciones posibles de 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 (Payne et al. Predictive marker in

breast cancer – the present. Histopathology 2008, 52, 82-90) (Debe apreciarse que una puntuación de 1 no es posible en la escala de Allred). Un método de puntuación algo más simple integra la intensidad de tinción nuclear y la proporción de células que exhiben núcleos teñidos en una escala combinada de 0 a 3⁺. Cualquier método de puntuación puede aplicarse para puntuar la intensidad y la proporción de tinción de Stat5 activado en los núcleos de la célula. Los términos positivo o negativo "forma activada independiente de ligando de estado cMet" de tumores utilizados en la presente memoria, se refieren a niveles de expresión de forma activada independiente de ligando de cMet que corresponden a puntuaciones 0 o 1⁺-3⁺ en la escala simplificada, respectivamente.

En general, los resultados de una prueba o ensayos pueden presentarse en cualquiera de una variedad de formatos. Los resultados pueden presentarse cualitativamente. Por ejemplo, el informe de prueba puede indicar únicamente si se detectó o no un polipéptido particular, probablemente también con una indicación de los límites de detección. Los resultados pueden presentarse de una forma semicuantitativa. Por ejemplo, pueden definirse diversos intervalos y a los intervalos se les puede asignar una puntuación (por ejemplo, 1⁺ a 3⁺) que proporciona un cierto grado de información cuantitativa. Esta puntuación puede reflejar diversos factores, por ejemplo, el número de células en las que la forma activada independiente de ligando de cMet se detecta, la intensidad de la señal (que puede indicar el nivel de expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet o la forma activada independiente de ligando de células que contienen cMet), etc. Los resultados pueden presentarse cuantitativamente, por ejemplo, como un porcentaje en células en las que se detecta el polipéptido (forma activada independiente de ligando de cMet), como una concentración de proteína, etc. Como apreciará un experto ordinario en la materia, el tipo de resultado que es proporcionado por una prueba variará dependiendo de las limitaciones técnicas de la prueba y la significación biológica asociada con la detección del polipéptido. Por ejemplo, en el caso de ciertos polipéptidos un resultado puramente cualitativo (por ejemplo, si el polipéptido se detecta o no a un cierto nivel de detección) proporciona información significativa. En otros casos, un resultado más cuantitativo (por ejemplo, una proporción del nivel de expresión del polipéptido en una muestra que se somete a prueba contra el nivel normal) es necesario.

En una forma de realización más preferida, la puntuación de la forma activada independiente de ligando del nivel de expresión cMet se gradúa de 0 a 3⁺, sobre la base de una evaluación de la intensidad del producto de reacción y el porcentaje de células positivas. Para más claridad, la tabla 4 a continuación resume estos parámetros. Únicamente la reactividad membranaria circunferencial completa del tumor invasivo deberá considerarse y a menudo se asemeja a una apariencia de "malla de gallinero". Bajo las guías actuales, las muestras puntuadas como límite (puntuación de 2⁺ o más) para la forma activada independiente de ligando de cMet IHC deben considerarse como la forma activada independiente de ligando de cMet (+) y se requiere que se sometan a mayor evaluación. El análisis IHC deberá ser rechazado, y ya repetido o probado por FISH o cualquier otro método si, a título de ejemplo no limitativo, los controles no son como se esperaba, los utensilios involucran la mayoría de la muestra y la muestra presenta una fuerte positividad membranaria de conductos de mama normal (controles internos) sugiriendo una recuperación de antígeno excesiva.

Tabla 4

Estado	Descripción IHC
0	Sin reactividad o reactividad membranaria en menos de 10% de las células de tumor
1 ⁺	Reactividad membranaria débil/apenas perceptible se detecta en más de 10% de las células de tumor. Las células son inmunorreactivas únicamente en parte de la membrana.
2 ⁺	Reactividad membranaria débil a moderada completa se aprecia en más de 10% de las células de tumor
3 ⁺	Fuerte reactividad completa se aprecia en más de 10% de las células de tumor.

En una forma de realización más preferida, dicha puntuación comprende utilizar una escala apropiada sobre la base de dos parámetros que son la intensidad de la tinción y el porcentaje de células positivas.

En una forma de realización preferida, el presente procedimiento se refiere a una escala apropiada de 0 a 3⁺ en la que no se puntuá la reactividad membranaria de las células de tumor con 0, y fuerte reactividad completa en más de 10% de las células de tumor se puntuá con 3⁺.

Con mayor detalle, como se describió anteriormente, la escala apropiada es una escala de 0 a 3 en la que sin reactividad membranaria de las células de tumor se puntuá 0; reactividad membranaria débil perceptible en más de 10% de células tumor se puntuá con 1⁺; reactividad membranaria débil a completa moderada en más de 10% de células de tumor se puntuá con 2⁺; y fuerte reactividad completa en más de 10% de las células de tumor se puntuá con 3⁺.

En un aspecto particular, un tumor es una forma activada independiente de ligando de cMet (+) con una puntuación de 2⁺.

En un aspecto particular, un tumor es una forma activada independiente de ligando de cMet (+) con una

puntuación de 3⁺.

En otro aspecto particular, un tumor es una forma activada independiente de ligando de cMet (+) con una puntuación de 2⁺ o 3⁺.

- 5 Se describe asimismo en la presente memoria un procedimiento para determinar si un trastorno onco^{geno} es susceptible de tratamiento con una proteína de unión o anticuerpo, o un fragmento o derivado de la/del misma(o) anti-forma activada independiente ligando de cMet, o su fragmento o derivado, en el que el procedimiento comprende las etapas de (a) determinar *in vitro* la forma activada independiente de ligando del estado de cMet de un tumor de un sujeto como se describió anteriormente, y (b) determinar que, si el estado es la forma activada independiente de ligando de cMet (+), el trastorno onco^{geno} es susceptible de tratamiento con una proteína de unión o anticuerpo, o un fragmento o derivado de la/del misma(o) anti-forma activada independiente ligando de cMet.
- 10 15 En otro aspecto, se considera un kit útil para este procedimiento de diagnóstico o pronóstico, comprendiendo el kit la proteína de unión y/o el anticuerpo divulgados en la presente memoria.

Por razones de conveniencia, una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico, por ejemplo los kits también están comprendidos en el alcance de la invención. El kit contiene las proteínas o anticuerpos de enlace para detección y cuantificación de la forma activada independiente de ligando de cMet *in vitro*, por ejemplo en un ELISA o transferencia Western. La proteína de unión o el anticuerpo de la presente invención puede proporcionarse en un kit para detección y cuantificación de la forma activada independiente de ligando de cMet *in vitro*, por ejemplo en un ELISA o transferencia Western. Cuando la proteína de unión o el anticuerpo se marcan con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, otros aditivos pueden incluirse tales como estabilizantes, amortiguadores (por ejemplo, un amortiguador de bloque o amortiguador de lisis) y semejantes. Este kit puede comprender un receptáculo que se divide en compartimentos o secciones para recibir uno o más recipientes, tales como viales, tubos y similares, estos recipientes contienen elementos separados de la invención. Por ejemplo, un recipiente puede contener un anticuerpo o proteína de unión ligado a un portador insoluble o parcialmente soluble. Un segundo recipiente puede contener, un segundo anticuerpo o proteína de unión soluble, marcado de manera detectable, de forma liofilizada o en solución. El receptáculo puede también contener un tercer recipiente que contiene una tercera proteína o anticuerpo de enlace marcada/o de manera detectable de forma liofilizada o en solución. Un kit de esta naturaleza puede utilizarse en el ensayo de tipo sándwich de la invención. La etiqueta o inserción de envasado puede proporcionar una descripción de la composición así como instrucciones para el uso de diagnóstico o *in vitro* pretendido.

40 Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse ampliamente para proporcionar unas concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, usualmente liofilizados, incluyendo excipientes que al disolver proporcionarán una solución de reactivo que presenta la concentración apropiada.

45 Todavía en otro aspecto, proteínas de unión, anticuerpos o sus fragmentos de unión como se detalla en la presente memoria, se proporcionan marcados con una parte detectable, de manera que puedan envasarse y utilizarse por ejemplo, en kits, para diagnosticar o identificar células que presentan el antígeno anteriormente mencionado. Los ejemplos no limitativos de estos marcadores incluyen fluoróforos tales como isotiocianato de fluoresceína; cromóforos, radionúclidos o enzimas. Estos anticuerpos marcados o fragmentos de unión pueden utilizarse para la ubicación histológica del antígeno, ELISA, clasificación celular, así como otras técnicas inmunológicas para detectar o cuantificar la forma activada independiente de ligando de cMet, y células que contienen este antígeno, por ejemplo.

55 60 65 También se proporcionan unos kits que son útiles como un control positivo para ensayos de apoptosis, para purificación o inmunoprecipitación de la forma activada independiente de ligando de cMet de células. Para el aislamiento y la purificación de la forma activada independiente de ligando de cMet, el kit puede contener los anticuerpos descritos en la presente memoria o sus fragmentos de unión de antígeno acoplados a perlas (por ejemplo, perlas de sefarosa). Pueden proporcionarse unos kits que contienen la proteína de unión o los anticuerpos para detección y cuantificación de la forma activada independiente de ligando de cMet *in vitro*, por ejemplo en un ELISA o una transferencia Western. Como con el artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o inserción de envasado en o asociado con el recipiente. El recipiente contiene una composición que comprende por lo menos una proteína de unión o anticuerpo, o un fragmento o derivado de la/del misma(o) anti-forma activada independiente ligando de cMet divulgados en la presente memoria. Los recipientes adicionales pueden incluirse que contienen por ejemplo diluyentes y amortiguadores, anticuerpos de control. La etiqueta o inserción de envasado puede proporcionar una descripción de la composición así como instrucciones para la utilización pretendida *in vitro* o de diagnóstico.

Más particularmente, la invención se refiere a un kit para la determinación de la forma activada independiente de

ligando del estado de cMet de un tumor por cualquier método conocido por un experto en la materia. Como se describirá en el ejemplo, una forma de realización preferida se refiere a un kit para la determinación de la forma activada independiente de ligando del estado de cMet de un tumor por métodos IHC.

5 Una forma de realización particular se refiere un kit que comprende por lo menos una proteína de unión o un anticuerpo, o su fragmento o derivado funcional, como se describió anteriormente, estando la proteína de unión o anticuerpo marcada/o.

10 En una forma de realización más particular, la invención consiste en un kit que comprende por lo menos un anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, como se describe anteriormente, estando marcados dicha proteína de unión o anticuerpo.

15 Debe apreciarse que cualquier método de marcado puede utilizarse por el experto en la materia tal como por ejemplo, la utilización de marcadores anteriormente mencionada.

15 En una forma de realización preferida, dicho kit, útil para detectar la presencia *in vitro* y/o la ubicación de una forma activada independiente de ligando de un tumor que expresa cMet en un sujeto, además comprende un reactivo útil para detectar la extensión de enlace entre la proteína de unión o anticuerpo marcado y la forma activada independiente de ligando de cMet.

20 En otra forma de realización preferida, dicho kit útil para determinar el nivel de expresión *in vitro* de la forma activada independiente de ligando de cMet en una forma activada independiente de ligando de tumor que expresa cMet, comprende además un reactivo útil para cuantificar el nivel de unión entre la proteína de unión o anticuerpo marcado y la forma activada independiente de ligando de cMet.

25 Todavía en otra forma de realización, dicho kit útil para determinar *in vitro* la forma activada independiente de ligando del estado de un tumor de cMet, comprende además:

- 30 a) un reactivo útil para detectar la extensión de unión entre la proteína de unión o anticuerpo marcado y la forma activada independiente de ligando de cMet; y
- b) muestras de control positivo y negativo útiles para la puntuación de la forma activada independiente de ligando del nivel de expresión de cMet.

35 Dicho kit para determinar la forma activada independiente de ligando *in vitro* del estado de cMet de un tumor puede comprender además:

- i) un segundo anticuerpo policlonal marcado específico a anticuerpos murinos;
- 40 ii) un reactivo útil para detectar la extensión de unión entre el segundo anticuerpo marcado y anticuerpos murinos a la forma activada independiente de ligando de cMet; y
- iii) muestras de control positivo y negativo útiles para puntuación de la forma activada independiente de ligando del nivel de expresión de cMet.

45 La presente divulgación también comprende una proteína de unión, o su fragmento funcional o derivado, incluyendo anticuerpo, que compite en forma cruzada por unión con la forma activada independiente de ligando de cMet con una proteína de unión como se describe anteriormente.

50 La presente divulgación también comprende una proteína de unión, o su fragmento o derivado funcional incluyendo anticuerpo, compite en forma cruzada por unión a la forma activada independiente de ligando de cMet con un anticuerpo divulgado en la presente memoria.

55 Otra forma de realización se refiere también a la utilización de una proteína de unión o un anticuerpo divulgados anteriormente, o su fragmento o derivado funcional, para la identificación de proteínas de unión, incluyendo anticuerpos, capaces de unirse específicamente a la forma activada independiente de ligando de cMet.

60 Más particularmente, en una forma de realización preferida, se describe un procedimiento para identificar una pareja de unión a la forma activada independiente de ligando de cMet, que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto la forma activada independiente de ligando de cMet con una proteína de unión o un anticuerpo de acuerdo con la invención, o su fragmento o derivado funcional;
- b) poner en contacto el complejo de a) con una biblioteca de compuestos,
- c) identificar un compuesto que disocia el complejo de a).

La invención también comprende un procedimiento para purificar la forma activada independiente de ligando de cMet, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- 5 a) incubar con una muestra una proteína de unión o un anticuerpo de acuerdo con la invención, o su fragmento o derivado funcional, bajo unas condiciones para permitir la unión específica de la proteína de unión o anticuerpo y la forma activada independiente de ligando de cMet; y
- 10 b) separar la proteína de unión o anticuerpo de la muestra y obtener la forma activada independiente de ligando purificada de cMet.

Otro aspecto particular comprende un complejo formado por la unión de una proteína de unión divulgada anteriormente, o su fragmento o derivado funcional y la forma activada independiente de ligando de cMet.

- 15 De manera similar, se proporciona en la presente memoria un complejo formado por la unión de un anticuerpo de acuerdo con la invención, o su fragmento o derivado funcional y la forma activada independiente de ligando de cMet.

20 Otra forma de realización se refiere a la utilización de una proteína de unión o un anticuerpo de acuerdo con la invención, o su fragmento o derivado funcional, como un vehículo destinado a la dianización específica de un compuesto biológicamente activo a células que expresan la forma activada independiente de ligando de cMet. Más particularmente, el compuesto biológicamente activo se selecciona de entre el grupo que consiste en agentes quimioterápicos, radioisótopos o toxinas.

- 25 Todavía en otra forma de realización, se proporciona un procedimiento, siendo dicho procedimiento para generar un anticuerpo, o su fragmento o derivado funcional, que i) se une específicamente a la forma activada independiente de ligando de cMet, pero ii) no se une a la o las formas activadas dependientes de ligando o no activadas de cMet, el procedimiento se caracteriza por que comprende las etapas de:

- 30 a) inmunizar un animal con estirpes celulares tumorales o transfectadas que expresan la proteína de cMet o su fragmento;
- 35 b) extraer células que producen anticuerpo del animal;
- 40 c) fusionar las células que producen anticuerpo con células de mieloma, para obtener células de hibridoma;
- 45 d) llevar a cabo ensayos de cribado para seleccionar células de hibridoma que producen anticuerpo que i) se unen específicamente a la forma activada independiente de ligando de cMet, pero ii) no se unen a la o las formas activadas dependientes de ligando y/o no activadas de cMet;
- 50 e) cultivar el hibridoma seleccionado en un cultivo celular que produce el anticuerpo; y
- 55 f) extraer el anticuerpo del cultivo celular.

- 45 En una forma de realización más preferida, el ensayo de clasificación de la etapa anteriormente descrita d), consiste en un ensayo de cribado IHC.

En otra forma de realización más preferida, dicho ensayo de cribado IHC comprende las etapas de:

- 50 a) recoger las secciones de tejido de tumores que expresan formas diferentes de cMet,
- 55 b) realizar una tinción IHC de manera simultánea en las diferentes secciones de tejido de la etapa a) utilizando células de hibridoma de la etapa c) del procedimiento para generar un anticuerpo, o su fragmento funcional o derivado, que i) se une específicamente a la forma activada independiente de ligando de cMet, pero ii) no se une a la o las formas activadas dependientes de ligando o no activadas de cMet anteriormente descritas,
- 60 c) seleccionar las células de hibridoma que presentan una reactividad específica en secciones de tejido que expresan la forma activada independiente de ligando de cMet y sin reactividad en otras secciones de tejido.

Otras características y ventajas de la invención se proporcionan a continuación en la descripción con ejemplos y figuras cuyas leyendas se representan a continuación.

- 65 Figuras 1A-1B: Reconocimiento FACS de cMet por Mabs m205A5 (A) o m227D3 (B)

Figura 2: Curvas de titulación de m205A5 y m227D3 Mabs en la proteína cMet dimérica inmovilizada.

Figuras 3A-3C: m227D3 y m205A5 IHC patrón de reconocimiento en tumores incrustados en parafina (MCF7, U87MG y Hs746T).

Figuras 4A-4C: Panel IHC de reconocimiento de m227D3 y anticuerpo 3D4 anti-cMet comercial en tumores incrustados en parafina (MCF7, U87MG, Hs746T, MK 45 y EBC-1).

Figura 5: Ensayo de competencia HGF con los m205A5 o los m227D3 Mabs por ELISA.

Figura 6: Actividad antitumoral de m224G11 en el modelo de xenoinjerto Hs746T.

Figura 7: Análisis *ex vivo* de la expresión cMet en tumores Hs746T de ratones de control y ratones tratados con m224G11 por análisis de transferencia Western.

Figuras 8A-8B: Análisis *ex vivo* de la expresión cMet en tumores Hs746T de ratones de control y ratones tratados m224G11 por IHC utilizando el m205A5.

Figura 9: Tinción de IHC de secciones incrustadas en parafina de tejidos de tumor de hígado que expresan diversos niveles de cMet.

Ejemplo 1: Generación de un anticuerpo contra la forma activada independiente de ligando de cMet que puede utilizarse para propósitos de diagnóstico.

Para generar anticuerpos, los ratones anti-cMet de 8 semanas de edad BALB/c se inmunizaron ya sea 3 a 5 veces de manera subcutánea con una estirpe celular transfectada CHO que expresa cMet en su membrana de plasma (20×10^6 células/dosis/ratón) o 2 a 3 veces con una proteína de fusión de dominio extracelular cMet (10-15 μ g/dosis/ratón) (R&D Systems, # de Catálogo 358MT) o fragmentos de esta proteína recombinante en mezcla con adyuvante completo de Freund para la primera inmunización y adyuvante incompleto de Freund para la siguiente. Tres días antes de fusión celular, se reforzaron ratones i.p. o i.v. con la proteína recombinante o fragmentos. Después se recogieron los bazos de los ratones y se fusionaron con células de mieloma SP2/0-Ag14 (ATCC) y se sometieron a selección HAT. En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, en especial de origen murino, es posible referirse a técnicas que se describen en particular en el manual "Antibodies" (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) o a la técnica de preparación de hibridomas descrita por Kohler and Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

Los hibridomas obtenidos inicialmente se cribaron por ELISA en la proteína recombinante cMet-Fc dimérica. Brevemente, la proteína cMet humana recombinante se revistió durante la noche a 4°C en placas de 96 pocillos Immulon II y después de una etapa de bloqueo de 1 h con una solución de gelatina al 0,5%, se agregó sobrenadante de hibridoma puro durante 1 h adicional a 37°C. Después, las placas se lavaron y se agregan IgG HRP cabra antirratón (Jackson) durante 1 h a 37°C. El desarrollo de la reacción se realizó utilizando la solución un sustrato TMB. Después se realizó una segunda criba por análisis FACS en la estirpe celular A459, que expresa unos niveles moderados a elevados de cMet, para asegurarse que los anticuerpos producidos podrán asimismo reconocer al receptor nativo en las células de tumor. Para ese propósito 2×10^5 células se incubaron ya sea con 10 μ g/ml de m205A5, m227D3 o m10D9 (Mab de control de isotipo IgG1) durante 20 min a 4°C. Después de 3 lavados en salino amortiguado con fosfato (PBS) suplementado con BSA al 1% y NaN₃ al 0,01%, se incubaron células con Alexa antirratón de cabra de anticuerpo secundario 488 (dilución 1/500) durante 20 minutos a 4°C. Después de 3 lavados adicionales en PBS suplementado con BSA al 1% y NaN₃ al 0,1%, se analizaron células por FACS (Facscalibur, Becton-Dickinson). Por lo menos 5000 células se evaluaron para calcular el valor promedio de intensidad de fluorescencia.

Tabla 5

Datos de análisis de citometría (MFI) realizado con 205A5 y 227D3 Mabs en 5 estirpes de células humanas tumorales (ATCC)

	A549	BXPC-3	MCF7	U87MG	HepG2
Solo células	13,98	11,87	9,87	9,10	10,52
Anticuerpo secundario	11,98	13,23	11,10	11,20	15,85
Control de isotipo	11,83	14,77	12,06	11,56	18,12
205A5	189,94	217,87	22,78	48,71	151,89
227D3	144,28	158,04	15,89	35,35	110,83

Los hibridomas positivos en este ensayo se amplificaron, clonaron, isotiparon y expandieron. Se recogieron

entonces nuevos sobrenadantes de hibridoma. Su contenido de IgG se determinó. Un análisis citométrico complementario se realizó en un panel de 5 estirpes celulares de tumor humano (A459, BXPC3, MCF7, U87MG, y HepG2). Todas estas estirpes celulares se proporcionaron por ATCC. Los datos obtenidos se presentan en la figura 1 y valores MFI se presentan en la Tabla 5.

- 5 Los experimentos complementarios se realizaron con anticuerpos purificados 205A5 o 227D3. Se realiza la primera titulación de anticuerpo en la proteína cMet-Fc dimérica. Las curvas de titulación se presentan en la figura 2.
- 10 Los anticuerpos 205A5 y 227D3 han cumplidos los 2 criterios descritos anteriormente (i) reconocimiento cMet en prueba ELISA, (ii) unión en el cMet nativo expresado en la superficie de las estirpes de células de tumor humano y se seleccionaron para mayores ensayos.
- 15 Los Mabs se seleccionan para la prueba de reconocimiento cMet final en secciones incrustadas con parafina de xenoinjertos de tumor que expresan cMet. Para esa evaluación, las secciones de tumor de xenoinjertos de MCF7, U87-MG y Hs746T (tumores que es conocido que expresan niveles variables de cMet) fueron desparafinados, rehidratados y colocados en Target Retrieval Buffer IX (Dako S1 699) en un baño de ebullición precalentado a 98°C para la recuperación de epítopo inducido con calor a 98°C durante 30 minutos y después durante 30 minutos adicionales en el amortiguador Target Retrieval Buffer. Después de 3 lavados en
- 20 Amortiguador Tris Salino-Tween 20 al 0,05% (TBS-T) (Dako S3006), la actividad de peroxidasa endógena se bloqueó utilizando reactivo de bloqueo de peroxidasa (Peroxidase Blocking Reagent) (Dako K4007) durante cinco minutos. Se lavaron secciones con TBS-T e incubaron con reactivo de bloqueo (UltraV block-TA-125UB-Lab Vision) durante 5 minutos antes de adición del anticuerpo monoclonal de ratón cMet que se va a someter a prueba (5 µg/ml). Una IgG1/kappa de ratón (5 µg/ml, X0931, Dako) se utilizó como un control negativo. Después se incubaron secciones durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron con TBS-T y se incubaron con Envision Dual Link Peroxidase System (Dako K4061). Se utiliza un sustrato de peroxidasa diaminobenzidina (DAB) para el desarrollo de un producto de reacción marrón.
- 25 Los resultados representados en la figura 3 demuestran que, como se esperó no se observó tinción con un control de isótipo IgG1 (figura 3 Panel A) y que tanto 227D3 (figura 3 Panel B) y 205 A (figura 3 Panel C) pudieron reconocer cMet únicamente en tumores de xenoinjerto Hs746T en los que los 3 tumores expresaron diversos niveles de cMet. Estos primeros resultados sugieren que ambos anticuerpos 205A5 y 227D3 reconocen una forma particular de cMet que únicamente se expresa en células de tumor amplificadas.
- 30 Para confirmar el patrón de reconocimiento de estos Mabs, un panel de tumores de ratones de xenoinjerto se somete a prueba para expresión de cMet utilizando cualquiera de 205A5, 227D3 o 3D4, un anticuerpo comercialmente disponible de Invitrogen descrito por su reconocimiento de cMet en IHC. Como se muestra en la figura 4 Panel C, 3D4 reconoce cMet en todos los tipos de tumor. Utilizando 227D3 (Panel A) o 205A5 (datos no representados), únicamente se observó una fuerte tinción membranaria en los 3 tipos de tumor que contienen una forma constitutivamente activa de cMet (debido a amplificación de cMet que resulta en una sobreexpresión de cMet): Hs746T, MKN45 y EBC-1. Como se espera, no se observa tinción con el control de isótipo mlG1 (figura 4 Panel B).
- 35 **Ejemplo 2: Experimentos de competencia HGF realizados en la presencia de anticuerpos 205A5 o 227D3.**
- 40 Para caracterizar adicionalmente el diagnóstico de Mabs, se realizaron ensayos de competencia HGF. La primera mezcla de reacción que comprende la proteína cMet en la presencia o no de los Mabs que se deben someter a prueba, se prepara a partir de una placa saturada separada (gelatina 0.5% en PBS IX). Se realizaron diluciones en serie 1 : 2 (partiendo de 40 µg/ml sobre 12 columnas) de anticuerpos murinos (referencias y Mabs para estudio). Después se agregaron 0,8 µg/ml de la proteína rh cMet-Fc (RDSsystems, ref. 358-MT/CF), excepto por la línea de control negativo que contiene únicamente diluyente ELISA (gelatina 0.1%, Tween 0.05% en 20 en PBS IX). Después de homogeneización, las muestras de competencia se cargaron en placas revestidas con HGF con 0,3 µg/ml de solución rhHGF en PBS (RDSsystems, ref. 294-HGN/CF). Después de una incubación y varios lavados, las proteínas cMet unidas se detectan utilizando un IgG-HRP antihumano de cabra (Jackson, ref. 109-035-098). Una vez unido, el sustrato TMB se agrega a las placas. La reacción se detiene por adición de solución de ácido H₂SO₄ y las densidades ópticas obtenidas se leen a 450 nm utilizando un instrumento de lector de microplacas.
- 45 El experimento se llevó a cabo con 205A5 y 227D3 en la presencia o ausencia de proteína recombinante cMet-Fc, (ver figura 5). Este experimento mostró que 205A5 y 227D3 Mabs no compiten con enlace cMet en su receptor de ligando inmovilizado.
- 50 **Ejemplo 3: Especificidad de anticuerpos**
- 55 El tratamiento de m224GI I de ratones que presentan un tumor Hs746T induce una disminución significativa de crecimiento de tumor (figura 6). Cuando el tumor de este experimento se analiza, la actividad antitumoral resultó

en una disminución de expresión Ki67 en ratones tratados con m224GII contra ratones de control (datos no representados) y en una dramática regulación a la baja de expresión de cMet demostrada por análisis de Transferencia Western (figura 7). Para realizar análisis WB, se retiraron los tumores y rápidamente se congelaron en nitrógeno. Después se lisaron y la misma cantidad de proteína se inmunotransfiere. Finalmente, cMet se revela utilizando la subunidad 25H2 Mab anti-Met-beta comercialmente disponible de Cell Signalling.

Cuando tumores del mismo experimento se analizaron por IHC utilizando 205A5, la regulación a la reducción esperada de expresión cMet se observa en los ratones tratados, en los que todas las células de tumor del grupo de control fueron Met positivas (figura 8).

De hecho, como se muestra en la figura 8A, cuando los tumores de los ratones de control se tiñeron utilizando 205A5 Mab, se observó una fuerte tinción membranaria y homogénea en células de tumor de los 3 ratones. Cuando los tumores de los ratones tratados con m224G11 se tiñeron con 205A5, se observó una marcada disminución de la tinción membranaria (figura 8B). Estos datos en concordancia con los observados previamente por análisis de Transferencia Western (figura 7) demostraron que 205A5 reconoce específicamente cMet.

Ejemplo 4: Puntuación de tejidos para la forma activada independiente de ligando de expresión de cMet con m224G11 Mab

Utilizando el protocolo descrito anteriormente y resumido en la figura 9, un conjunto de tejidos de tumor humano incrustados en parafina, que expresan niveles variables de la forma activada independiente de ligando de cMet se tiñeron con m205A5 Mab.

Los resultados mostrados en la figura 9 demuestran, en carcinoma hepatocelular, que m205A5 pudo discriminar tumores humanos con niveles variables de la forma activada independiente de ligando de cMet. Utilizando este anticuerpo, pueden puntuarse estos tumores como:

- 0: tumores negativos en los que no se aprecia una tinción de membrana o menos de 10% de células positivas de membrana,
- 1⁺: tinción escasamente perceptible en más de 10% de las células de tumor,
- 2⁺: Tinción de membrana completa moderada que se aprecia en más de 10% de células de tumor,
- 3⁺: Una tinción fuerte completa de más de 10% de células de tumor.

Listado de secuencias

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> Nuevo anticuerpo para el diagnóstico y/ el pronóstico del cáncer

<130> 358486D28791

<150> EP 10305703.0

<151> 2010-06-29

<150> US 61/359.623

<151> 2010-06-29

<160> 42

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 1

Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr

1

5

10

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> mus musculus
 <400> 2
 Gln Met Ser
 1
 5
 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 10
 <400> 3
 Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr
 1 5
 15
 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 20
 <400> 4
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5
 25
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 30
 <400> 5
 Ile Met Gly Gly Gly Thr Thr
 1 5
 35
 <210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 40
 <400> 6
 Ala Arg Gly Arg Asp Tyr Gly Ile Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10 15
 <210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 45
 <400> 7
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Thr Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

5 <210> 8
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> mus musculus

10 <400> 8
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Gln Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Arg Gly Arg Asp Tyr Gly Ile Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> mus musculus

15 <400> 9
 Glu Ser Val Asp Ser Asn Gly Asn Ser Phe
 1 5 10

20 <210> 10
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> mus musculus

25 <400> 10
 Val Ala Ser
 1

30 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mus musculus

35 <400> 11
 Gln Gln Asn Asn Glu Tyr Pro Leu Thr
 1 5

40 <210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> mus musculus

45 <400> 12
 Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Gly
 1 5

50 <210> 13

<211> 7
 <212> PRT
 <213> mus musculus

5 <400> 13
 Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 14
 <211> 13
 10 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 14
 Ala Thr Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Gly Pro Phe Thr Tyr
 1 5 10

15 <210> 15
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> mus musculus

20 <400> 15
 Asn 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 Asn
 20 25 30

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

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

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

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

Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 16
 25 <211> 119
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 16
 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15

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

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

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

30 Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe

ES 2 641 294 T3

	65	70	75	80
	Arg Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp	Thr Ala Ile Tyr Tyr	Cys Ala	
	85	90	95	
	Thr Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Gly Pro Phe	Thr Tyr Trp Gly Gln Gly		
	100	105	110	
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			
	115			
5	<210> 17			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> mus musculus			
	<400> 17			
	Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr			
10	1	5	10	15
	<210> 18			
	<211> 7			
	<212> PRT			
	<213> mus musculus			
15	<400> 18			
	Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser			
	1	5		
20	<210> 19			
	<211> 4			
	<212> PRT			
	<213> mus musculus			
25	<400> 19			
	Ser Tyr Ala Met			
	1			
30	<210> 20			
	<211> 16			
	<212> PRT			
	<213> mus musculus			
	<400> 20			
	Ser Ile Met Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly			
	1	5	10	15
35	<210> 21			
	<211> 13			
	<212> PRT			
	<213> mus musculus			
40	<400> 21			
	Gly Arg Asp Tyr Gly Ile Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr			
	1	5	10	
	<210> 22			
	<211> 15			
45	<212> PRT			
	<213> mus musculus			
	<400> 22			
	Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Asn Gly Asn Ser Phe Ile His			
	1	5	10	15
50	<210> 23			
	<211> 7			

<212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 23
 Val Ala Ser Lys Leu Glu Ser
 5 1 5

<210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 10 <213> mus musculus

<400> 24
 Asp Tyr Gly Ile Gln
 1 5

15 <210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> mus musculus

20 <400> 25
 Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Pro Phe Met Ser
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 11
 25 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 26
 Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Gly Pro Phe Thr Tyr
 1 5 10

30 <210> 27
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> mus musculus

35 <400> 27
 aagagtctcc tacatagtaa tggcatca t a t 33

<210> 28
 40 <211> 9
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 28
 45 cagatgtcc 9

<210> 29
 <211> 27
 <212> ADN
 50 <213> mus musculus

<400> 29
 gctcaaaaatc tagaacttcc gtacacg 27

55 <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> mus musculus

60 <400> 30
 ggattcactt tcagtagcta tgcc 24

ES 2 641 294 T3

5	<210> 31 <211> 21 <212> ADN <213> mus musculus	
10	<400> 31 attatgggtg gtggtaccac c 21	
15	<210> 32 <211> 45 <212> ADN <213> mus musculus	
20	<400> 32 gcaagaggca gggactacgg tattaggta tatgctatgg actac 45	
25	<210> 33 gatattgtga tgacgcaggc tgcattctcc aatccagtca ctcttgaac atcagttcc atctcctgca ggtctagtaa gagtctctta catagtatg gcatcactta tttgtattgg 120 tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcctgattt atcagatgtc caaccttgcc 180 tcaggagtcc cagacaggtt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc 240 agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg 300 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336	60
30	<210> 34 <211> 363 <212> ADN <213> mus musculus	
35	<400> 34 gaagtgaagt tggtggagtgc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgcaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgcca tgtcttgggt tcgcccagact 120 ccagaaaatga ggctggagtgc ggtcgctcc attatgggtg gtggtaccac ctactatcca 180 gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacattt ccaggaacat cctgaacctg 240 caaatgagca gtctgagggtc tgaggacacg gccatattt actgtgcaag aggcaggggac 300 tacggtatta ggtcatatgc tatggactac tgggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tca 363	60
40	<210> 35 <211> 30 <212> ADN <213> mus musculus	
45	<400> 35 gaaaagtgtt atagtaatgg caatagttt 30	
50	<210> 36 <211> 9 <212> ADN <213> mus musculus	
55	<400> 36	

ES 2 641 294 T3

	gttgcacatc	9
	<210> 37	
	<211> 27	
5	<212> ADN	
	<213> mus musculus	
	<400> 37	
	cagcagaata atgagtatcc gctcacg	27
10	<210> 38	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> mus musculus	
15	<400> 38	
	ggcttctcat taactgacta tgg	24
	<210> 39	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> mus musculus	
	<400> 39	
25	atatggagag gtgaaagcac a	21
	<210> 40	
	<211> 39	
	<212> ADN	
30	<213> mus musculus	
	<400> 40	
	gccacccctc actataaggta cgacggaccc ttacttac	39
35	<210> 41	
	<211> 333	
	<212> ADN	
	<213> mus musculus	
40	<400> 41	
	aacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggca gagggccacc	60
	atatcctgca gagccagtga aagtgttgat agtaatggca atagtttat tcattggtag	120
	cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ttgcacatctaa attagaatct	180
	ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcacccct caccattgtat	240
	cctgtggagg ctgaggatgt tgcaacctat tactgtcagc agaataatga gtatccgatc	300
	acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa	333
	<210> 42	
	<211> 357	
45	<212> ADN	
	<213> mus musculus	
	<400> 42	

ES 2 641 294 T3

caggtgcagc tgaaggcagtc aggacctggc ctgggtcagc cctcacagag cctgtccata	60
acctgcacag tctctggctt ctcatttaact gactatggta tccaatgggt tcggccagtct	120
ccaggacagg gtctggagtg gctgggggtg atatggagag gtggaagcac agactacaat	180
gcacctttca tgtccagact gagtatcacc aaggacaact ccaagagcca agtttcttt	240
agaatgaaca gtctgcaagc tgatgacact gccatatact actgtgccac ctctactat	300
aggtacgacg gaccctttac ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca	357

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado, o fragmento funcional del mismo, que en los tumores i) se une específicamente a la forma activada independiente de ligando de cMet ii) no se une a la forma no activada de cMet e iii) no se une a la forma activada dependiente de ligando de cMet, caracterizado por que:
- 5 i) no bloquea la unión del ligando HGF a cMet;
 ii) interactúa con la región extracelular de cMet entre los residuos de aminoácidos 1 y 950; y
 iii) es seleccionado de entre el grupo que consiste en:
- 10 a) un anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, que comprende:
 - una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes como se define según IMGT, respectivamente la CDR-L1 que presenta la secuencia SEC ID nº: 1, la CDR-L2 que presenta la secuencia SEC ID nº: 2 y la CDR-L3 que presenta la secuencia SEC ID nº: 3; y
 - una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes como se define según IMGT, respectivamente la CDR-H1 que presenta la secuencia SEC ID nº: 4, la CDR-H2 que presenta la secuencia SEC ID nº: 5 y la CDR-H3 que presenta la secuencia SEC ID nº: 6, y
- 15 b) un anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, que comprende
 - una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes como se define según IMGT, respectivamente la CDR-L1 que presenta la secuencia SEC ID nº: 9, la CDR-L2 que presenta la secuencia SEC ID nº: 10 y la CDR-L3 que presenta la secuencia SEC ID nº: 11; y
 - una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes como se define según IMGT, respectivamente la CDR-H1 que presenta la secuencia SEC ID nº: 12, la CDR-H2 que presenta la secuencia SEC ID nº: 13 y la CDR-H3 que presenta la secuencia SEC ID nº: 14.
- 20 2. Anticuerpo, o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 1, caracterizado por que se selecciona de entre el grupo que consiste en:
- 25 a) un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, que comprende un dominio variable de cadena ligera de secuencia que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 7 y un dominio variable de cadena pesada de secuencia que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 8; y
 b) un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, que comprende un dominio variable de cadena ligera de secuencia que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 15 y un dominio variable de cadena pesada de secuencia que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 16.
- 30 3. Híbridoma murino que puede secretar un anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, siendo dicho híbridoma murino seleccionado de entre híbridoma depositado en la CNCM, Institut Pasteur, París, el 18 de noviembre, 2009 con el número 1-4247 y el híbridoma depositado en la CNCM, Institut Pasteur, París, el 18 de noviembre, 2009 con el número 1-4246.
- 35 4. Anticuerpo monoclonal producido por el híbridoma según la reivindicación 3.
- 40 5. Ácido nucleico aislado, caracterizado por que es seleccionado de entre los ácidos nucleicos siguientes:
- 45 a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo según una de las reivindicaciones 1, 2 o 4;
 b) un ácido nucleico según 5a), que comprende una secuencia de ADN que comprende las secuencias SEC ID nº: 27 a 32 o 35 a 40;
- 50 c) un ácido nucleico según 5a), que comprende una secuencia de ADN que comprende las secuencias SEC ID nº: 33 y 34, o 41 y 42.
- 55 6. Utilización *in vitro* del anticuerpo o un fragmento funcional del mismo según una de las reivindicaciones 1, 2 o 4, para la identificación de la forma activada independiente de ligando de cMet.
- 60 7. Procedimiento de detección mediante inmunomarcado de la presencia y/o la ubicación de una forma activada independiente de ligando de cMet que expresa un tumor en un sujeto, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:
- 65 a) poner en contacto una muestra del sujeto con el anticuerpo o un fragmento funcional del mismo según una de las reivindicaciones 1, 2 o 4, y

b) detectar la unión de dicho anticuerpo con la muestra.

8. Procedimiento de determinación por inmunomarcado del nivel de expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet en un tumor que expresa cMet de un sujeto, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:

a) poner en contacto una muestra del sujeto con el anticuerpo o un fragmento funcional del mismo según una de las reivindicaciones 1, 2 o 4, y

10 b) cuantificar el nivel de unión de anticuerpo a la forma activada independiente de ligando de cMet en dicha muestra.

15 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el nivel de expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet se mide mediante inmunohistoquímica (IHC).

15 10. Procedimiento de diagnóstico por inmunomarcado de un tumor que expresa una forma activada independiente de ligando de cMet o determinación por inmunomarcado del pronóstico para desarrollar un tumor que expresa una forma activada independiente de ligando de cMet en un sujeto, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:

20 a) determinar el nivel de expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet según la reivindicación 8, y

25 b) comparar el nivel de expresión de la etapa a) con un nivel de expresión de referencia de la forma activada independiente de ligando de cMet de tejido normal

11. Procedimiento de determinación por inmunomarcado de la forma activada independiente de ligando del estado de cMet de un tumor de un sujeto, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:

30 a) determinar el nivel de expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet según la reivindicación 8,

35 b) puntuar dicho tumor para el nivel de expresión de la forma activada independiente de ligando de cMet, y

c) comparar dicha puntuación con la obtenida a partir de una muestra de control.

12. Procedimiento de determinación de si un trastorno oncógeno es sensible al tratamiento con una proteína de unión o un anticuerpo, o un fragmento o derivado de la/del misma(o) anti-forma activada independiente de ligando de cMet, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:

40 a) determinar por inmunomarcado el estado de la forma activada independiente de ligando de cMet de un tumor de un sujeto según la reivindicación 8, y

45 b) determinar que, si el estado es la forma activada independiente de ligando de cMet(+), el trastorno oncógeno es sensible al tratamiento con una proteína de unión o un anticuerpo, o un fragmento o derivado de la/del misma(o) anti-forma activada independiente de ligando de cMet.

50 13. Kit que comprende por lo menos un anticuerpo o fragmento funcional del mismo según una de las reivindicaciones 1, 2 o 4, estando dicho anticuerpo marcado.

55 14. Kit según la reivindicación 13 para detectar por inmunomarcado la presencia y/o la ubicación de un tumor que expresa una forma activada independiente de ligando de cMet en un sujeto, comprendiendo además dicho kit un reactivo útil para detectar la extensión de la unión entre dicho anticuerpo marcado y la forma activada independiente de ligando de cMet.

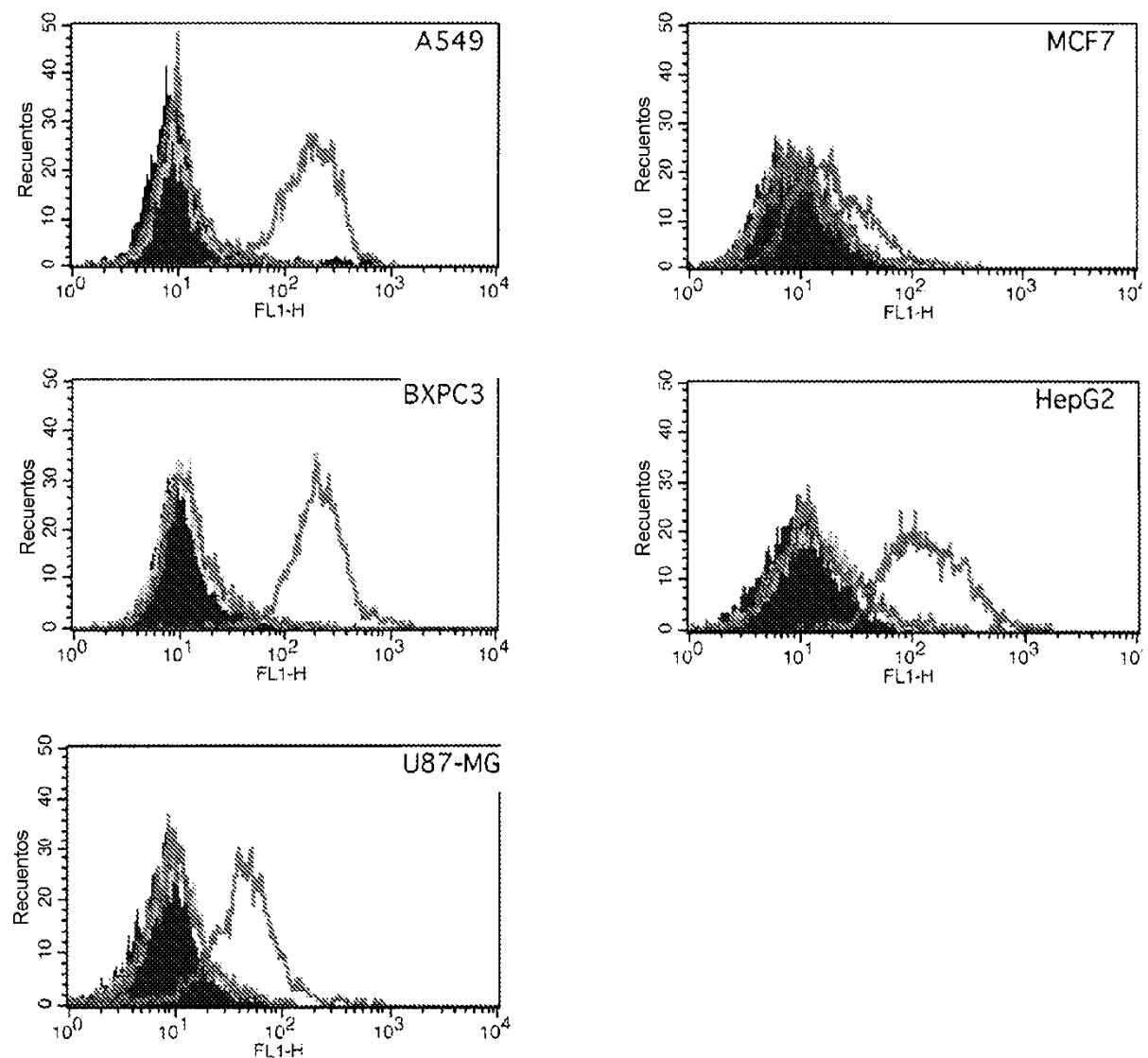


Figura 1A

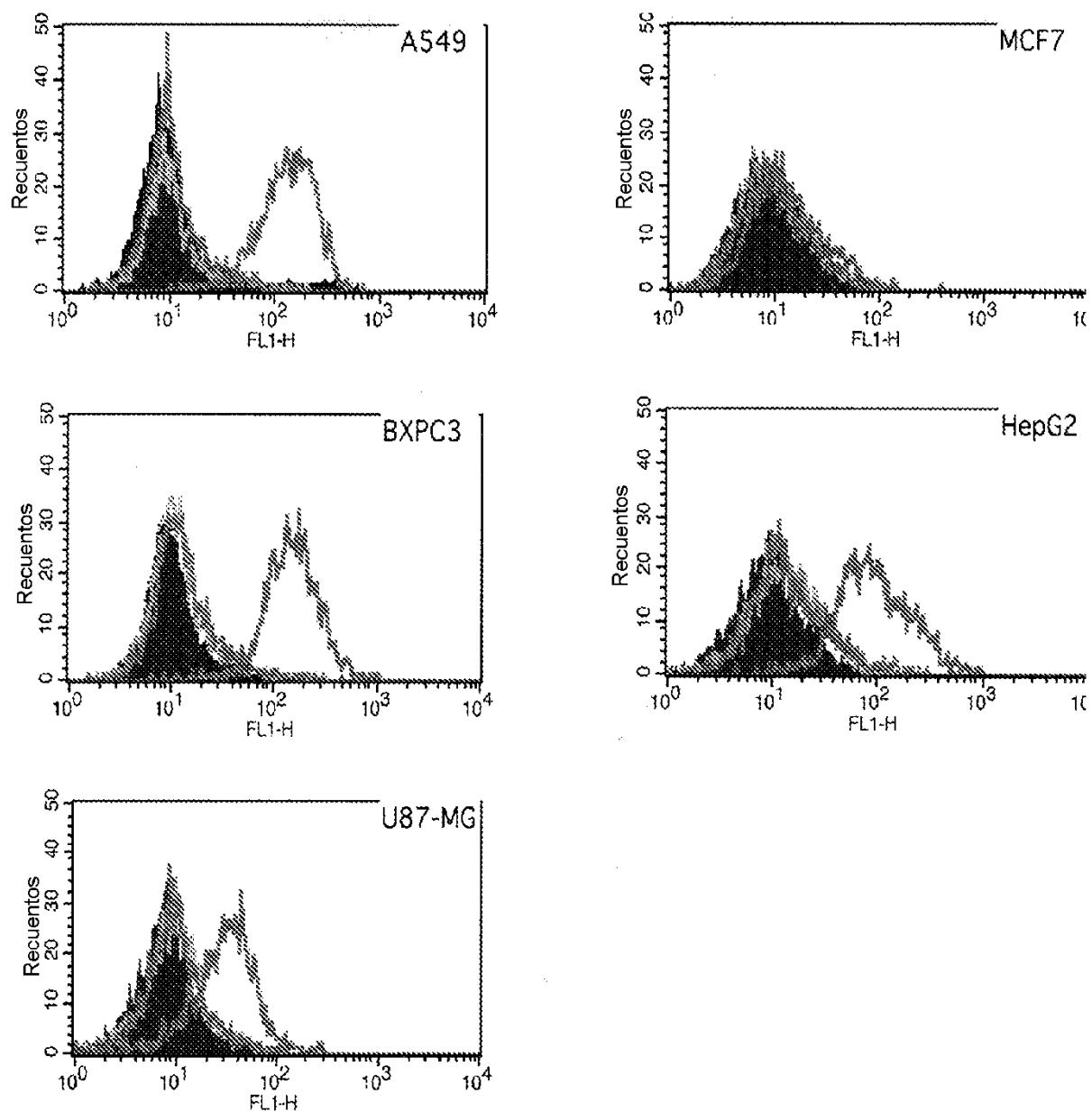


Figura 1B

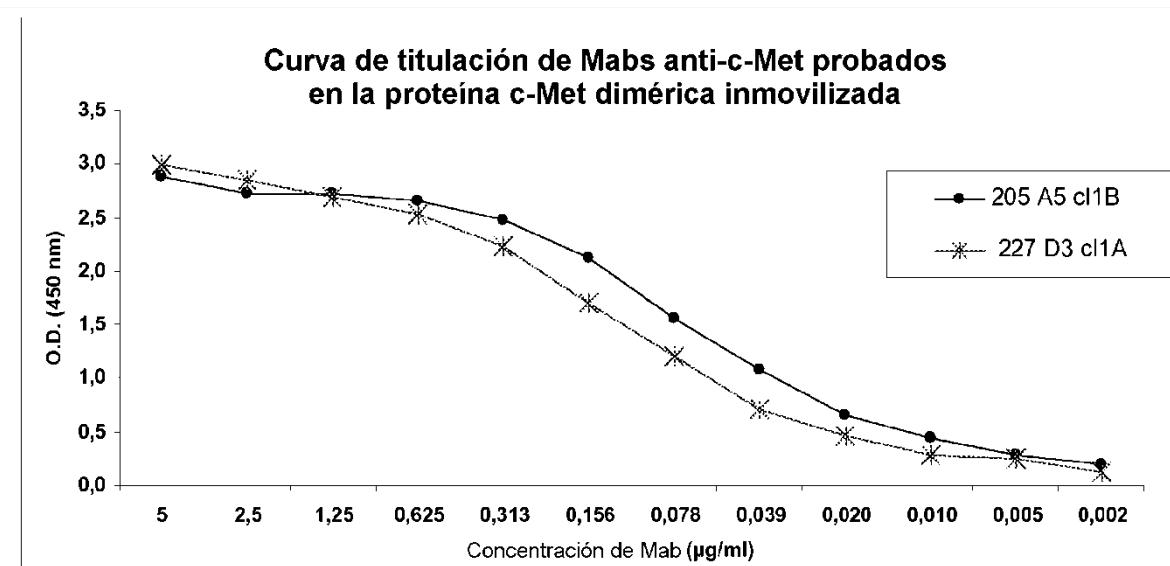
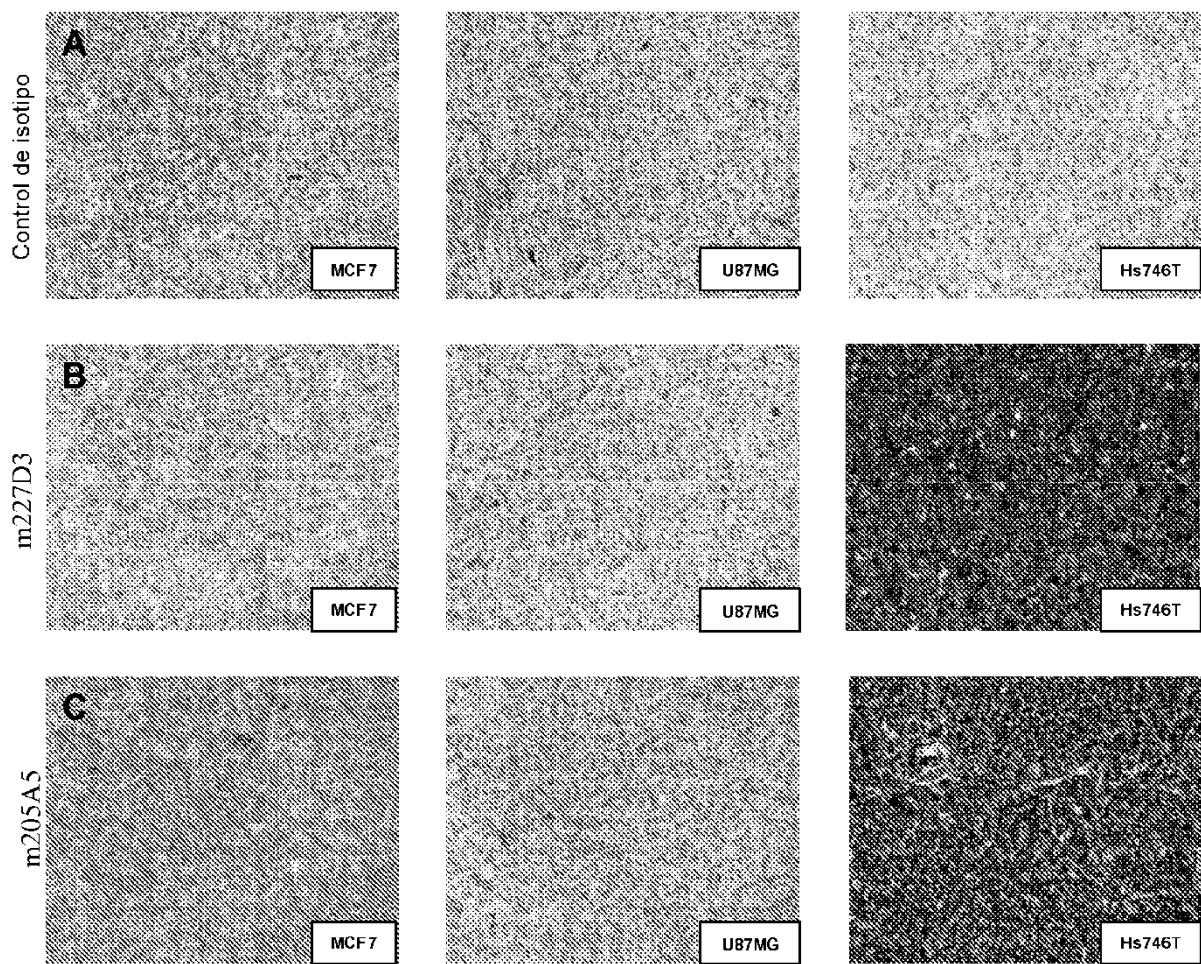
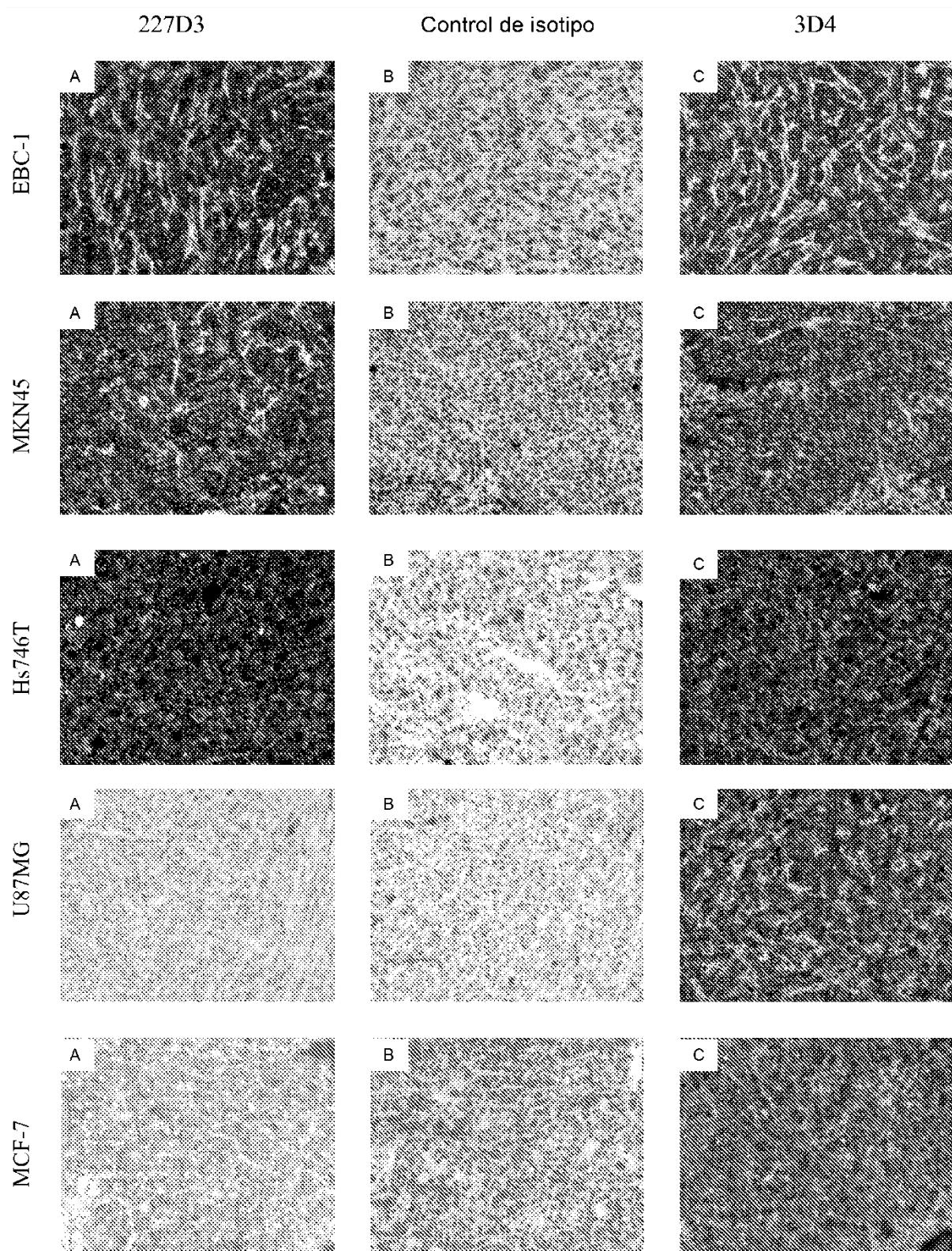


Figura 2



Figuras 3A-3C



Figuras 4A-4C

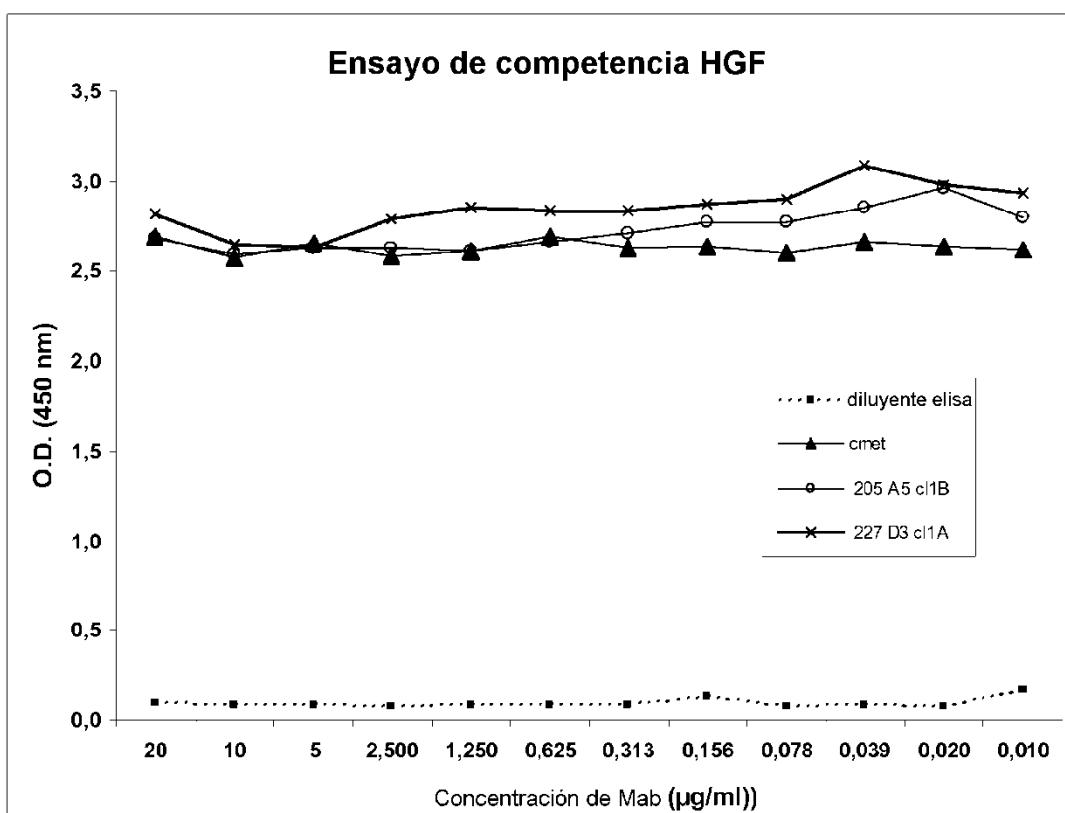


Figura 5

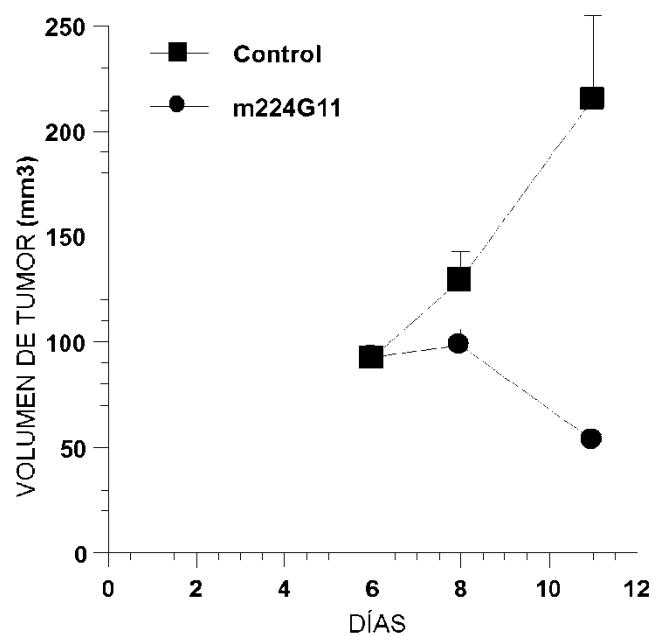


Figura 6

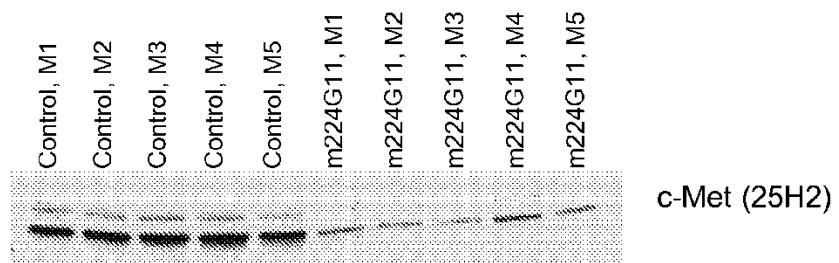
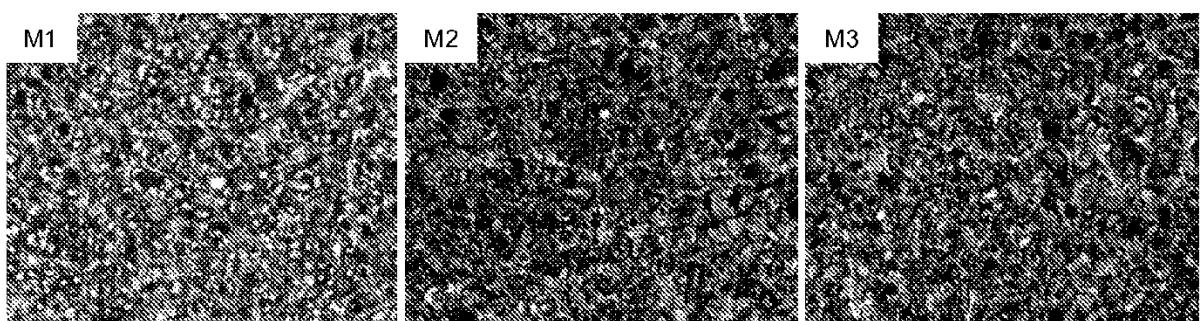
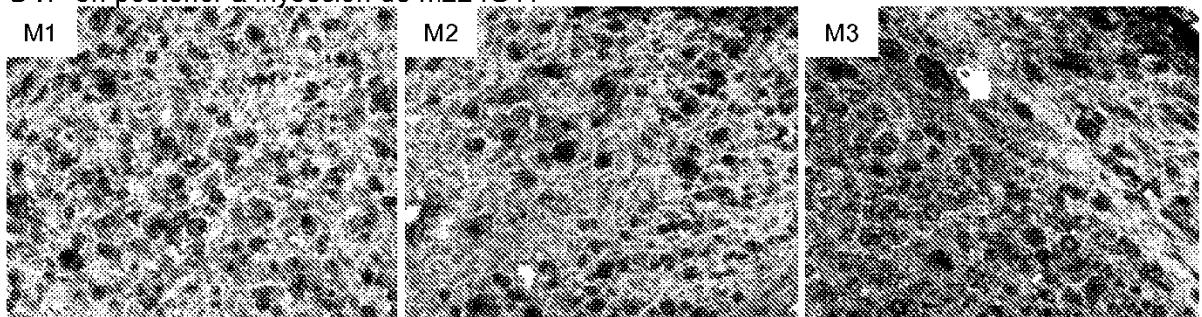


Figura 7

A : Control



B : T+6h posterior a inyección de m224G11



Figuras 8A-8B

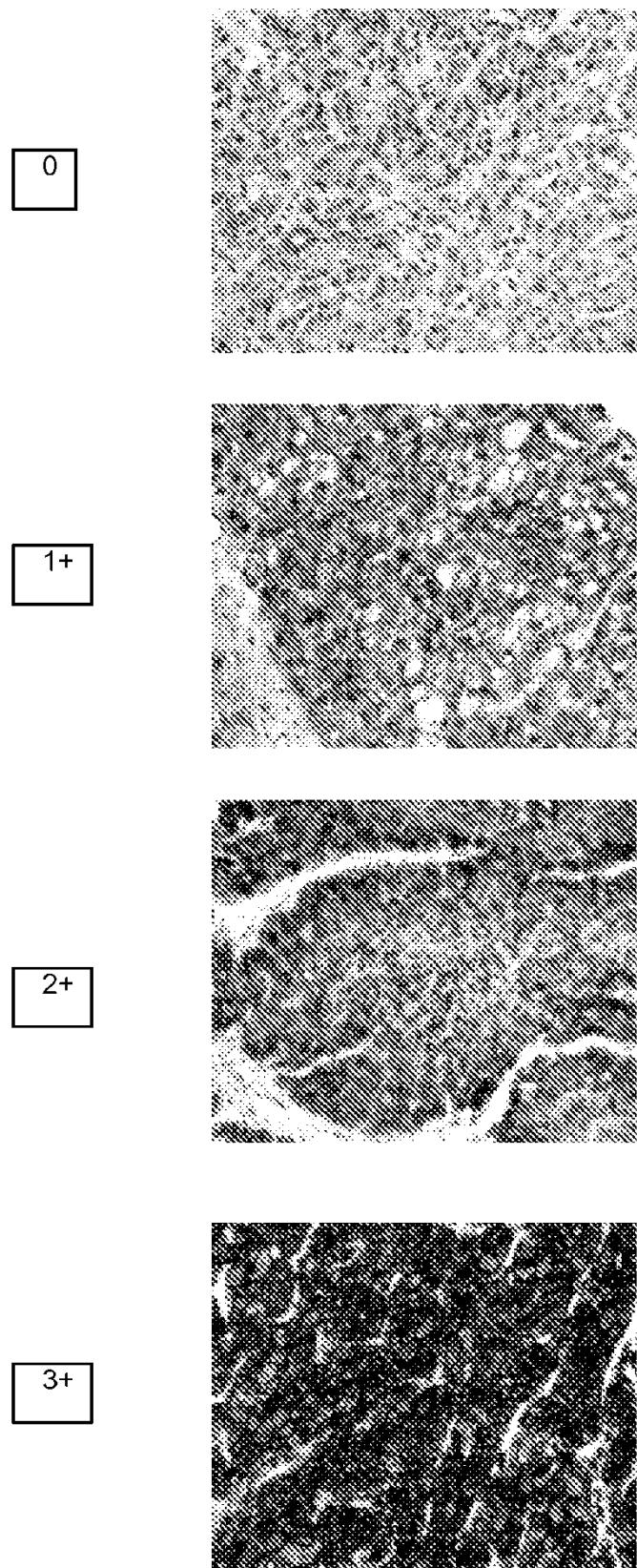


Figura 9