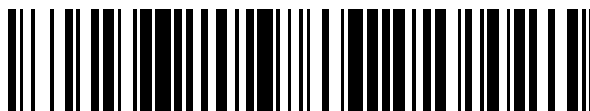


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 335**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2008** **E 11162718 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018** **EP 2415784**

54 Título: **Nuevos anticuerpos que inhiben la dimerización de c-Met y sus utilidades**

30 Prioridad:

12.07.2007 US 929789 P

11.01.2008 US 20639 P

12.07.2007 EP 07301231

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

17.10.2018

73 Titular/es:

PIERRE FABRE MEDICAMENT (100.0%)

45, Place Abel Gance

92100 Boulogne-Billancourt, FR

72 Inventor/es:

GOETSCH, LILIANE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 686 335 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

Nuevos anticuerpos que inhiben la dimerización de c-Met y sus utilidades.

5 **Campo técnico**

Se describen nuevos anticuerpos que pueden unirse específicamente al receptor de c-Met humano y/o que pueden inhibir específicamente la actividad de tirosina cinasa del receptor, especialmente anticuerpos monoclonales de origen murino, quimérico y humanizado, así como las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que codifican para estos anticuerpos. Más particularmente, estos anticuerpos pueden inhibir la dimerización de c-Met. Se divulga asimismo la utilización de estos anticuerpos como un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de cánceres o cualquier patología relacionada con la sobreexpresión del receptor, así como en procesos o equipos para diagnóstico de enfermedades relacionadas con la sobreexpresión de c-Met. La presente divulgación finalmente comprende productos y/o composiciones que comprenden estos anticuerpos, en combinación con otros anticuerpos y/o compuestos químicos dirigidos contra otros factores de crecimiento involucrados en avance de tumor o metástasis y/o compuestos y/o agentes anticancerígenos o agentes conjugados con toxinas y su uso para la prevención y/o el tratamiento de ciertos cánceres.

20 **Antecedentes de la invención**

Los agentes dirigidos al receptor tirosina cinasa (RTK) tales como inhibidores trastuzumab, cetuximab, bevacizumab, imatinib y gefitinib, han ilustrado el interés de diana esta clase de proteína para tratamiento de cánceres seleccionados.

El c-Met, es el miembro prototipo de una subfamilia de RTKs que también incluye RON y SEA. La familia c-Met RTK es estructuralmente diferente de otras familias RTK y es el único receptor de alta afinidad conocido para factor de crecimiento de hepatocitos (HGF = Hepatocyte Growth Factor), también denominado factor de dispersión (SF = scatter factor) [D.P. Bottaro et al, Science 1991, 251:802-804; L. Naldini et al, Eur. Mol. Biol. Org. J. 1991, 10:2867-2878]. c-Met y HGF se expresan ampliamente en una variedad de tejidos y su expresión normalmente se restringe a células de origen epitelial y mesenquimal 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 un desarrollo normal de mamífero y se ha mostrado que son particularmente importantes en migración celular, diferenciación morfogénica, y organización de las estructuras tubulares tridimensionales así como crecimiento y 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 c-Met y HGF se ha mostrado que es importante en el desarrollo, mantenimiento y reparación de tejidos de mamíferos [Nagayama T, Nagayama M, Kohara S, Kamiguchi H, Shibuya M, Katoh Y, Itoh J, Shinohara Y., Brain Res. 2004, 5:999(2): 155-66; Tahara Y, Ido A, Yamamoto S, Miyata Y, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H., J Pharmacol Exp Ther. 2003, 307(1): 146-51], su disregulación está implicada en el avance de cánceres.

La señalización aberrante dirigida por una activación inapropiada de c-Met es una de las alteraciones más frecuentes observadas en cánceres de humanos y juega 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].

Una activación c-Met inapropiada puede surgir por mecanismos dependientes e independientes de ligando, que incluye sobreexpresión de c-Met y/o activación 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 c-Met, en presencia o en 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, Watowich SJ, Biochemistry, 2004 Aug 17, 43:10570-8]. c-Met activado recluta efectores de señalización a su sitio de acoplamiento o conexión múltiple ubicado en el dominio de citoplasma, resultando en la activación de varias rutas de señalización clave, incluyendo Ras- MAPK, PI3K, Src y Stat3 [Gao CF, Vande Woude GF, Cell Res. 2005, 15(1):49-51; Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, 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, Zhang YW, Vande Woude GF, Oncogene, 2000, 19(49):5582-9; Gu H, Neel BG, Trends Cell Biol. 2003 Mar, 13(3): 122-30; Fan S, Ma YX, Wang JA, Yuan RQ, Meng Q, Cao Y, Laterra JJ, Goldberg ID, Rosen EM, Oncogene. 2000 Apr 27, 19(18):2212-23]. Además, una faceta única de la señalización c-Met respecto a otra RTK es la interacción de la que se ha informado con complejos de adhesión focal y asociados sin enlace a cinasa tales como $\alpha 6 \beta 4$ integrinas [Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM, Cell. 2001, 107:643-54], CD44v6 [Van der Voort R, Taher TE, Wielenga VJ, Spaargaren M, Prevo R, Smit L, David G, Hartmann G, Gherardi E, Pals ST, J Biol Chem. 1999, 274(10):6499-506], Plexina B1 o semaforinas [Giordano S, Corso S, Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D, Tamagnone L, Comoglio PM, Nat Cell Biol. 2002, 4(9):720-4; Conrotto P, Valdembri D, Corso S, Serini G, Tamagnone L, Comoglio PM, Bussolino F, Giordano S, Blood. 2005, 105(11):4321-9; Conrotto P, Corso S, Gamberini S, Comoglio PM, Giordano S, Oncogene. 2004, 23:5131-7] que además pueden contribuir a la complejidad de regular la función celular por este receptor. Finalmente datos recientes demuestran que

c-Met puede estar involucrado en resistencia a tumor de gefitinib o erlotinib, sugiriendo que la combinación del compuesto que hace blanco a EGFR como c-Met puede ser de interés significativo [Engelman JA et al., Science, 2007, 316:1039-43].

En los últimos años recientes, muchas estrategias diferentes se han desarrollado para atenuar la señalización c-Met en líneas celulares de cáncer. Estas estrategias incluyen i) neutralizar anticuerpos contra c-Met o HGF/SF [Cao B, Su Y, Oskarsson M, Zhao P, Kort EJ, Fisher RJ, Wang LM, Vande Woude GF, Proc Natl Acad Sci U S A. 2001, 98(13):7443-8; Martens T, Schmidt NO, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R, Westphal M, Lamszus K, Clin Cancer Res. 2006, 12(20):6144-52] o el uso de antagonista HGF/SF NK4 para evitar enlace de ligando a c-Met [Kuba K, Matsumoto K, Date K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T, Cancer Res., 2000, 60:6737-43], ii) inhibidores de sitio de enlace ATP pequeños a c-Met que bloquean actividad de cinasa [Christensen JG, Schreck R, Burrows J, Kuruganti P, Chan E, Le P, Chen J, Wang X, Ruslim L, Blake R, Lipson KE, Ramphal J, Do S, Cui JJ, Cherrington JM, Mendel DB, Cancer Res. 2003, 63:7345-55], iii) polipéptido de dominio SH2 de ingeniería que interfiere con el acceso al sitio de acoplamiento o conexión múltiple y ARNi (RNAi) o ribozima que reduce expresión de ligando o receptor. La mayoría de estos enfoques exhiben una inhibición selectiva de c-Met, resultando en inhibición de tumor y mostrando que c-Met puede ser de interés para la intervención terapéutica en cáncer.

Dentro de las moléculas generadas para la dianización de c-Met, algunos son anticuerpos.

La más extensamente descrita es el anticuerpo anti-c-Met 5D5 generado por Genentech [documento WO96/38557] que se comporta como un agonista potente cuando se agrega solo en diversos modelos y como un antagonista cuando se emplea como un fragmento Fab. Una forma de ingeniería monovalente de este anticuerpo descrita como 5D5 de un brazo (OA5D5) y producida como una proteína recombinante en *E. Coli*, también es la materia de una solicitud de patente [documento WO2006/015371] por Genentech. Sin embargo, esta molécula que no puede considerarse como un anticuerpo debido a su particular adaptador, exhibe también mutaciones que pueden ser inmunogénicas en humanos. En términos de actividad, esta molécula no glicosilada carece de funciones efectoras y finalmente no hay datos claros que demuestren que OA5D5 inhibe la dimerización de c-Met. Aún más, cuando se prueba en el modelo *in vivo* G55, una línea celular de glioblastoma que expresa c-Met pero no HGF mRNA y proteína que se desarrolla independientemente del ligando, el anti-c-Met de un brazo no tiene efecto significativo en crecimiento de tumor G55, sugiriendo que OA5D5 actúa primordialmente al bloquear enlace HGF y no es capaz de dianizar tumores activados independientemente de HGF [Martens T. et al, Clin. Cancer Res., 2006, 12(20):6144-6152].

Otro anticuerpo que dianiza c-Met se describe por Pfizer como un anticuerpo que actúa "predominantemente como un antagonista c-Met, y en algún caso o instancia como un agonista c-Met" [WO 2005/016382]. En esta solicitud no se describen datos que muestren efecto alguno de anticuerpos Pfizer en dimerización de c-Met.

Uno de los aspectos innovadores de la presente divulgación es generar anticuerpos monoclonales de ratón sin actividad agonista intrínseca e inhibir la dimerización de c-Met. Además de hacer blanco en tumores dependientes de ligando, este enfoque también deteriora activaciones independientes de ligando de c-Met debido a su sobreexpresión o mutaciones de los dominios intracelulares que quedan dependientes de oligomerización para señalización. Otro aspecto de la actividad de estos anticuerpos puede ser un impedimento estérico para interacción c-Met con sus asociados, que resulta en deterioro de funciones c-Met. Estos anticuerpos serán humanizados y preferencialmente sometidos a ingeniería pero no limitados como IgG1 humano para obtener funciones efectoras tales como ADCC y CDC además de funciones enlazadas a bloqueo específico del receptor c-Met.

Exposición de la invención

La invención es definida en las reivindicaciones adjuntas y cualesquier otros aspectos y formas de realización expuestos en la presente memoria se proporcionan únicamente a título informativo.

De manera sorprende, por primera vez, los inventores han logrado generar un anticuerpo capaz de unirse a c-Met pero también capaz de inhibir la dimerización de c-Met. Si es cierto que, en la técnica anterior, en ocasiones se sugiere que puede ser interesante un anticuerpo capaz de inhibir la dimerización de c-Met con sus asociados, nunca se ha descrito o sugerido claramente, un anticuerpo capaz de hacerlo. Aún más, respecto a la especificidad de anticuerpo, no fue evidente por completo lograr la generación de este anticuerpo activo.

Un primer aspecto se refiere a un proceso para la generación y selección de anticuerpos como se divulga en la presente memoria.

Más particularmente, se proporciona en la presente memoria un proceso para la selección de un anticuerpo anti c-Met, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, capaces de inhibir tanto activación dependiente de ligando como independiente de ligando de c-Met, comprendiendo dicho proceso las siguientes etapas:

- i) detectar los anticuerpos generados y seleccionar anticuerpos capaces de ligar específicamente a c-Met;
- ii) evaluar *in vitro* de los anticuerpos seleccionados de la etapa i) y seleccionar anticuerpos capaces de inhibir al menos 50%, de preferencia al menos 60%, 70% o 80% de proliferación de células de tumor para al menos un tipo de tumor; y después
- iii) someter a prueba los anticuerpos selectos de la etapa ii) y seleccionar anticuerpos capaces de inhibir la dimerización de c-Met.

Como se explicó anteriormente, la inhibición de la dimerización de c-Met es un aspecto capital ya que estos anticuerpos presentarán un interés real para una población más grande de pacientes. No solo cáncer c-Met activado dependiente de ligando, como fue el caso anteriormente, sino también cáncer c-Met activado independiente de ligando, pueden tratarse con anticuerpos generados por el presente proceso.

La generación del anticuerpo puede lograrse por cualquier método conocido por el experto en la materia, tal como por ejemplo fusión de una célula de mieloma con células de bazo de ratones inmunizados u otras especies compatible con las células de mieloma selectas [Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497]. Los animales inmunizados pueden incluir ratones transgénicos con sitios de inmunoglobulina humana que después producen directamente anticuerpos humanos. Otra forma de realización posible puede consistir en utilizar tecnologías de expresión en fago para cribas o detectar bibliotecas.

La etapa de detección i) puede lograrse por cualquier método o proceso conocido por el experto en la materia. Como ejemplos no limitativos pueden mencionarse ELISA, BIAcore, inmunohistoquímica, análisis FACS y cribas funcionales. Un proceso preferido consiste en una criba por ELISA en la proteína recombinante c-Met y después por análisis FACS en al menos una línea celular tumoral, para asegurarse que los anticuerpos producidos serán capaces de reconocer también el receptor nativo en células de tumor. Este proceso se describirá en forma más precisa en los siguientes ejemplos.

De la misma manera, la etapa ii) también puede lograrse en forma clásica por un método o proceso conocido tal como por ejemplo, utilizando 3H-timidina o cualquier otro agente de tinción de ADN, MTT, evaluación ATP, etc. Un modelo de células de tumor preferido puede consistir en el modelo BxPC3.

Al inhibir la dimerización de c-Met, debe entenderse preferentemente la homodimerización de c-Met.

En una forma de realización preferida de la etapa iii) de selección del presente proceso, dicha etapa iii) consiste en evaluar anticuerpos por análisis BRET en células que expresan tanto c-Met-RLuc/c-Met-YFP y seleccionar anticuerpos capaces de inhibir al menos 30%, de preferencia 35%, 40%, 45%, 50%, 55% y más preferible 60% de la señal BRET.

La tecnología BRET es una tecnología conocida como representativa de la dimerización de proteína [Angers et al, PNAS, 2000, 97:3684-89].

La tecnología BRET, empleada en la etapa iii) del proceso, es bien conocida por el experto en la materia y será detallada en los siguientes ejemplos. Más particularmente, la Transferencia de Energía por Resonancia Bioluminiscencia (BRET = Bioluminescence Resonance Energy Transfer) es una transferencia de energía no radiante, que ocurre entre un donador bio luminiscente (Renilla Luciferasa (Rluc)) y un aceptor fluorescente, un mutante de Proteína Fluorescente Verde (GFP = Green Fluorescent Protein) o Proteína Fluorescente Amarilla (YFP = Yellow fluorescent protein). En el presente caso se empleó Proteína Fluorescente Amarilla Mejorada (EYFP = Enhanced Yellow Fluorescent Protein). La eficacia de la transferencia depende de la orientación y la distancia entre el donador y aceptor. Después, la transferencia de energía puede ocurrir solo si las dos moléculas están en proximidad inmediata (1-10 nm). Esta propiedad se emplea para generar ensayos de interacción proteína-proteína. Sin duda, a fin de estudiar la interacción entre dos socios, el primero se fusiona genéticamente a la Renilla Luciferasa y el segundo al mutante amarillo de GFP. Proteínas de fusión en general, pero no en forma obligatoria, se expresan en células de mamífero. En la presencia de su sustrato permeable a membrana (coelenterazina), Rluc emite luz azul. Si el mutante GFP está más cercano a 10 nm de Rluc, puede ocurrir una transferencia de energía y puede detectarse una señal amarilla adicional. La señal BRET se mide como la proporción entre la luz emitida por el aceptor y la luz emitida por el donador. De esta manera, la señal BRET aumentará conforme las dos proteínas de fusión se ponen en proximidad o si un cambio de conformación lleva más cerca a Rluc y mutante GFP.

Si el análisis BRET consiste en una forma de realización preferida, cualquier método conocido por el experto en la materia puede emplearse para medir la dimerización de c-Met. Sin limitación, pueden mencionarse las siguientes tecnologías: FRET (Transferencia de Energía por Fluorescencia Resonancia), HTRF (Fluorescencia con resolución de tiempo homogénea), FLIM (Microscopía de Formación de Imagen por Vida Útil de Fluorescencia) o SW-FCCS (Espectroscopía de Correlación cruzada de Fluorescencia de Longitud de Onda Sencilla).

Otras tecnologías clásicas también pueden emplearse tales como Coinmunoprecipitación, Alpha screen, Entrelazamiento químico, Doble-Híbrido, Cromatografía de Afinidad, ELISA o Transferencia Far western.

- 5 Un segundo aspecto se refiere a un anticuerpo aislado, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, que se obtiene por el proceso. El anticuerpo o uno de sus fragmentos o derivados, es capaz de unirse específicamente al c-Met humano y de ser necesario, aún más de preferencia es capaz de inhibir la conexión natural de su HGF ligando y/o capaz de inhibir específicamente la actividad de tirosina cinasa del c-Met, el anticuerpo también es capaz de inhibir dimerización de c-Met. Más particularmente, los anticuerpos serán capaces de inhibir tanto
10 activación dependiente de ligando como independiente de ligando de c-Met.

Las expresiones "fragmentos y derivados funcionales" se definirán en detalle a continuación en la presente memoria.

- 15 Debe apreciarse en la presente memoria que los anticuerpos divulgados en la presente memoria no se encuentran en forma natural, es decir no están en su ambiente natural pero deben ser capaces de ser aislados u obtenidos por purificación de fuentes naturales, o de otra forma obtenidos por recombinación genética, o por síntesis química, y que pueden contener aminoácidos no naturales como se describirá adicionalmente.

- 20 Más particularmente, según otro aspecto, se reivindica un anticuerpo o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, caracterizándose el anticuerpo por que comprende cuando menos una región de determinación de complementariedad de CDR seleccionada de CDRs que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID Nos. 1 a 17 y 56 a 61.

- 25 Cualquier anticuerpo, o fragmentos o derivados, que tienen al menos una CDR cuya secuencia tiene al menos 80% de identidad, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad, después de alineamiento óptimo con las secuencias SEC ID Nos. 1 a 17 y 56 a 61, debe entenderse como equivalente.

- 30 Por regiones CDR o CDR(s), se pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas definidas por 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.,
35 Truong, L., Thouvenin-Contet, V. y Lefranc, Dev. Comp. Immunol, 27, 55-77 (2003)]. En la numeración única de IMGT, los aminoácidos conservados siempre tienen la misma posición, por ejemplo cisteína 23 (1ª-CYS), triptófano 41 (TRP-CONSERVADO), aminoácido hidrófobo 89, cisteína 104 (2ª-CYS), fenilalanina o triptófano 118 (J-PHE o J-TRP). La numeración única IMGT proporciona una delimitación estándar 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
40 regiones de determinación de complementariedad: CDRI-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 y CDR3-IMGT: 105 a 117. Ya que los espacios representan posiciones no ocupadas, las longitudes CDR-IMGT (que se muestran entre [cuadrados] y separadas por puntos, por ejemplo [8.8.13]) devienen información crucial. La numeración única IMGT se emplea 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
45 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)].

- Existen CDR de tres cadenas pesadas y CDR de 3 cadenas ligeras. Los términos CDR o CDRs se utilizan en la presente memoria para indicar, de acuerdo con el caso, una de las regiones o varias o incluso todas estas
50 regiones que contienen la mayoría de los residuos aminoácidos responsables por el enlace por afinidad del anticuerpo para el antígeno o el epítipo que reconoce.

- Por "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, se pretende en la presente memoria indicar un porcentaje de nucleótidos o de residuos aminoácidos idénticos entre las dos
55 secuencias a comparar, obtenidos después del mejor alineamiento (alineamiento óptimo), este porcentaje es solamente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen al azar y sobre toda la longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, se llevan a cabo tradicionalmente al comparar estas secuencias después de haberlas alineado en una forma óptima, la comparación es capaz de llevarse a cabo por segmento o por "ventana de comparación". El alineamiento óptimo
60 de las secuencias para la comparación puede llevarse a cabo además de manualmente, 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], mediante soporte lógico de computadora utilizando estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package,
65 Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o de otra forma por el programa para comparación BLAST N o BLAST P).

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, se determina al comparar estas dos secuencias alineadas en una forma óptima y en donde la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos a comparar, puede comprender adiciones o deleciones respecto a la secuencia de referencia para un alineamiento óptimo entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula al determinar el número de posiciones idénticas para las cuales el residuo nucleótido o aminoácido es idéntico entre las dos secuencias, al dividir este número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y al multiplicar el resultado obtenido por 100, a fin de obtener el por ciento de identidad entre estas dos secuencias.

Por ejemplo, es posible utilizar el programa BLAST, "BLAST 2 sequences" (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) disponible en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, los parámetros empleados son aquellos dados por valor predefinido (en particular para los parámetros "open gap penalty": 5, y "extension gap penalty": 2; la matriz seleccionada por ejemplo, es la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa), el porcentaje de identidad entre las dos secuencias a comparar se calcula directamente por el programa.

Por secuencia de aminoácidos que tienen al menos 80%, de preferencia 85%, 90%, 95% y 98% de identidad con una secuencia de aminoácido de referencia, aquellos que tienen con respecto a la secuencia de referencia, ciertas modificaciones, en particular una deleción, adición o sustitución de al menos un aminoácido, un truncado o una elongación, se prefieren. En el caso de una sustitución de uno o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos, se prefieren las sustituciones en donde los aminoácidos sustituidos se reemplazan por aminoácidos "equivalentes". La expresión "aminoácidos equivalentes" se utiliza en la presente memoria para indicar cualquier aminoácido capaz de sustituirse con uno de los aminoácidos de la estructura base, sin embargo, sin que modifique esencialmente las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes y como se definirá posteriormente, en especial en los ejemplos. Estos aminoácidos equivalentes pueden determinar ya sea al basarse en su homología estructural con los aminoácidos que reemplazan, o a los resultados de pruebas comparativas de actividad biológica entre los diferentes anticuerpos capaces de llevarse a cabo.

A título de ejemplo, se hace mención de las posibilidades de sustitución capaz de llevarse a cabo sin resultar en una modificación profunda de la actividad biológica del anticuerpo modificado correspondiente.

Como ejemplo no limitativo, la siguiente tabla 1 proporciona posibilidades de sustitución concebibles con una conservación de la actividad biológica del anticuerpo modificado. Las sustituciones inversas también por supuesto son posibles en las mismas condiciones.

Tabla 1

Residuo original	Sustitución
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
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, 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

De acuerdo con un primer enfoque, el anticuerpo se definirá por su secuencia de cadena pesada. Más particularmente, el **presente** anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, se caracteriza porque comprende una cadena pesada que comprende cuando menos un CDR seleccionado de CDRs que comprenden las secuencias de aminoácidos SEC ID Nos. 1 a 9 y 56 a 58.

Las secuencias mencionadas son las siguientes:

5 SEC ID No. 1: GYIFTAYT
 SEC ID No. 2: IKPNNGLA
 SEC ID No. 3: ARSEITTEFDY
 SEC ID No. 4: GYSFTDYT
 SEC ID No. 5: INPYNGGT
 SEC ID No. 6: AREEITKDFDF
 10 SEC ID No. 7: GYTFTDYN
 SEC ID No. 8: INPNNGGT
 SEC ID No. 9: ARGRYVGYYYAMDY
 SEC ID No. 56: GYTFTSYW
 SEC ID No. 57: INPTTGST
 15 SEC ID No. 58: AIGGYGSWFAY

Las CDR de la cadena pesada pueden seleccionarse al azar en las secuencias previas, es decir SEC ID Nos. 1 a 9 y 56 a 58.

20 Según un aspecto preferido, el presente anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena pesada que comprende cuando menos un CDR seleccionado de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde:

- CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 1, 4, 7 o 56,
- 25 - CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 2, 5, 8 o 57 y
- CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 3, 6, 9 o 58.

Según una primera forma de realización de dicho aspecto, el presente anticuerpo o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde
 30 CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 1, CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 2 y CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 3.

Más particularmente, dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos o derivados funcionales de acuerdo con esta primera forma de realización, comprende una cadena pesada de secuencia que comprende la secuencia de
 35 aminoácidos SEC ID No. 18.

SEC ID No. 18:
 EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYIFTAYTMHWVRQSLGESLDWIGGIKPNNGLANYNQKFKGKATLTVDKS
 40 SSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCARSEITTEFDYWGQGTLTSS

Según una segunda forma de realización de dicho aspecto, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 4, CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 5 y CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 6.
 45

El anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, según dicha segunda forma de realización comprenderá preferentemente una cadena pesada de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 19.

50 SEC ID No. 19:
 EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTFDYTLNHWKQSHGKLEWIGLINPYNGGTTYNQKFKGKATLTVDKS
 SSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAREEITKDFDFWGQGTTLTSS

Según una tercera forma de realización de dicho aspecto, el presente anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde
 55 CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 7, CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 8 y CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 9.

El anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, según dicha tercera forma de realización comprenderá preferentemente una cadena pesada de secuencias que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 20.
 60

SEC ID No. 20:
 EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGMSLEWIGDINPNNGGTIFNQKFKGKATLTVDKS
 65 SSTAYMELRSLTSEDVAVYYCARGRYVGYYYAMDYWGQGTSVTVSS

Según una cuarta forma de realización de dicho aspecto, el presente anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 56, CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 57 y CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 58.

El anticuerpo o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, según dicha cuarta forma de realización comprenderá preferentemente una cadena pesada de secuencias que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 62.

SEC ID No. 62:
QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPGQGLEWIGYINPTTGSTDYNQKLKDKATLTAD
KSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAIGGYGSWFAYWGQGTLVTVSA

En un segundo enfoque, el anticuerpo se definirá a continuación por su secuencia de cadena ligera. Más particularmente, según un segundo aspecto particular, el presente anticuerpo o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, se caracteriza por que comprende una cadena ligera que comprende al menos un CDR seleccionado de CDRs que comprende las secuencias aminoácidos SEC ID Nos. 10 a 17 y 59 a 61.

Las secuencias mencionadas son las siguientes:

SEC ID No. 10: ESVDSYANSF
SEC ID No. 11: RAS
SEC ID No. 12: QQSKEDPLT
SEC ID No. 13: ESIDTYGNSF
SEC ID No. 14: QQSNEPFT
SEC ID No. 15: ENIYSN
SEC ID No. 16: AAT
SEC ID No. 17: QHFWGPPYT
SEC ID No. 59: SSVSSTY
SEC ID No. 60: TTS
SEC ID No. 61: Hqwssypft

Las CDR de la cadena ligera pueden seleccionarse al azar en las secuencias previas, es decir SEC ID Nos. 10 a 17 y 59 a 61.

Según otro aspecto preferido, el presente anticuerpo o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena ligera que comprende al menos una CDR seleccionada de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde:

- CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 10, 13, 15 o 59,
- CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 11, 16 o 60, y
- CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 12, 14, 17 o 61.

Según una primera forma de realización de dicho otro aspecto, el presente anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 10, CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 11 y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 12.

Más particularmente, dicho anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, según una primera forma de realización comprende una cadena ligera de secuencias que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 21.

SEC ID No. 21:
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYANSFMHWYQQKPGQPPLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFT
LTINPVEADDVATYYCQQSKE DPLTFGSGTKLEMK

Según una segunda forma de realización de dicho otro aspecto, el presente anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 13, CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 11 y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 14.

El anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, según dicha segunda forma de realización comprenderá preferentemente una cadena ligera de secuencias que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 22.

SEC ID No. 22:

GIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRVSESIDTYGNSFIHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLSESGIPARFSGSGSRTDFTL
TINPVEADDSATYYCQQSNEDPF TFGSGTKLEMK

5 Según una tercera forma de realización de dicho otro aspecto, el presente anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 15, CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 16 y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 17.

10 El anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, según dicha tercera forma de realización comprenderá preferentemente una cadena ligera de secuencias que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 23.

SEC ID No. 23:

15 DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQKQKSPQLLVYAATNLVDGVPSRFSGSGSGTQYSLKI
NSLQSEDFGSYYCQHFHWGPPYTF GGGTKLEIK

20 Según una cuarta forma de realización de dicho otro aspecto, el presente anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 59, CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 60 y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 61.

25 El anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, según dicha tercera forma de realización comprenderá preferentemente una cadena ligera de secuencias que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 63.

SEC ID No. 63:

QIVLTQSPAIMASASPGEKVTLTCSASSSVSSTLYWYQQKPGSSPKLWIYTTILASGVPARFSGSGSGTSYSLTIS
SMETEDAASYFCHQWSSYPFTFGSGTKLDIK

30 Según un tercer enfoque, el anticuerpo que se definirá a continuación tanto por su secuencia de cadenas ligeras como su secuencia de cadenas pesadas. El presente anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, se caracteriza por que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 18, 19, 20 ó 62 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 21, 22, 23 ó 63.

35 Más particularmente, un anticuerpo preferido, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, denominado 224G11, comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprende respectivamente la secuencia de aminoácidos SEC ID Nos. 1, 2 y 3; y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID Nos. 10, 11 y 12.

40 En otro aspecto de la invención, el anticuerpo 224G11 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 18 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 21.

45 Otro anticuerpo preferido, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, denominado 227H1, comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprende respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID Nos. 4, 5 y 6; y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprende respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID Nos. 13, 11 y 14.

50 En otro aspecto, el anticuerpo 227H1 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 19 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 22.

55 Todavía otro anticuerpo preferido, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, denominado 223C4, comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprende respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID Nos. 7, 8 y 9; y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprende respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID Nos. 15, 16 y 17.

60 En otro aspecto, el anticuerpo 223C4 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 20 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 23.

65 Todavía otro anticuerpo preferido, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales denominado 11E1, comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, que comprende respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID Nos. 56, 57 y 58; y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, que comprende respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID Nos. 59, 60 y 61.

En otro aspecto, el anticuerpo 11E1 comprende una cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos

SEC ID No. 62 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 63.

Otro aspecto se refiere a hibridoma murino capaz de secretar los presentes anticuerpos monoclonales, en especial hibridoma de origen murino tal como el depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM, Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) (Institut Pasteur, París, Francia).

Los anticuerpos monoclonales, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, están caracterizados por que dichos anticuerpos son secretados por el hibridoma depositado en la CNCM en 03/14/2007 bajo los números CNCM 1-3724 (correspondiente a 11E1), 1-3731 (correspondiente a 224G11), 1-3732 (correspondiente a 227H1) y en 07/06/2007 bajo el número 1-3786 (correspondiente a 223C4). Estos hibridomas consisten en un hibridoma murino que resulta en la fusión celular de esplenocitos de ratón inmunizado con una línea celular de mieloma (Sp20 Ag14).

La siguiente tabla 2 reagrupa elementos referentes a los anticuerpos preferidos.

Tabla 2

	224G11 1-3731		227H1 1-3732		223C4 1-3786		11E1 1-3724	
	Prot. SEC ID	Nucl. SEC ID	Prot. SEC ID	Nucl. SEC ID	Prot. SEC ID	Nucl. SEC ID	Prot. SEC ID	Nucl. SEC ID
CDR-H1	1	24	4	27	7	30	56	64
CDR-H2	2	25	5	28	8	31	57	65
CDR-H3	3	26	6	29	9	32	58	66
Cadena H	18	41	19	42	20	43	62	70
CDR-L1	10	33	13	36	15	38	59	67
CDR-L2	11	34	11	34	16	39	60	68
CDR-L3	12	35	14	37	17	40	61	69
Cadena L	21	44	22	45	23	46	63	71

A partir de la tabla 2, es claro que CDR-L2 de los anticuerpos 227H1 y 224G11 es similar. Este ejemplo claramente soporta las reivindicaciones de la presente solicitud que cubre anticuerpos que comprende al menos una CDR seleccionada al azar a través de las secuencias CDR descritas.

De acuerdo con una forma de realización preferida, la divulgación se refiere a anticuerpos monoclonales.

El término "Anticuerpo Monoclonal" o se utiliza de acuerdo con su significado ordinario para denotar un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por mutaciones de origen natural posibles que pueden estar presentes en cantidades menores. En otras palabras, un anticuerpo monoclonal consiste en un anticuerpo homogéneo que resulta de la proliferación de un solo clon de células (por ejemplo, células de hibridoma, células hospedadoras eucarióticas transfectadas con ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, células hospedadoras procarióticas transformadas con ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, etc.), y que en general se caracteriza por cadenas pesadas de una sola clase y subclase, y cadenas ligeras de un solo tipo. Anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigidos contra un solo antígeno. Además, en contraste con preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes o epítipo, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno.

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

Un aspecto igualmente particular se refiere a un anticuerpo quimérico, o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque el anticuerpo aún más comprende las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada derivadas de un anticuerpo de una especie heteróloga al ratón, en especial hombres, y en una forma preferida en que las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada derivadas de un anticuerpo humano, respectivamente son la región kappa y gamma-1, gamma-2 o gamma-4.

En la presente solicitud, IgG1 se prefieren para obtener funciones efectoras y más preferiblemente ADCC y CDC.

El experto en la materia apreciará que funciones efectoras incluyen por ejemplo enlace C1q; citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); enlace receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; y regulación a la baja de receptores de superficie celular (por ejemplo receptor de célula B; BCR).

Los presentes anticuerpos son preferentemente anticuerpos monoclonales específicos, en especial de origen murino, quimérico o humanizado, que pueden obtenerse de acuerdo con métodos estándar bien conocidos por el experto en la materia.

En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos o derivados 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 la técnica de preparación a partir de hibridomas descrita por Kohler and Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

Los presentes anticuerpos monoclonales pueden obtenerse, por ejemplo a partir de células de animales inmunizadas contra c-Met, o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo específicamente reconocido por dichos anticuerpos monoclonales. c-Met o uno de sus fragmentos, puede producirse especialmente de acuerdo con los métodos de trabajo usuales, por recombinación genética partiendo con una secuencia de ácidos nucleicos contenida en la secuencia ADNc (cADN) que codifica por c-Met o por síntesis de péptido partiendo de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia de péptido de c-Met.

Los anticuerpos monoclonales, por ejemplo pueden purificarse en una columna de afinidad en la que c-Met o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo reconocido específicamente por los anticuerpos monoclonales, ha sido previamente inmovilizado. Más particularmente, los anticuerpos monoclonales pueden ser purificados por cromatografía en proteína A y/o G, seguido o no seguido por cromatografía de intercambio de iones dirigida a eliminar los contaminantes de proteína residuales así como ADN y los LPS, por sí mismos seguido o no seguido por cromatografía de exclusión en gel de Sepharose^{MR} a fin de eliminar los agregados potenciales debido a la presencia de dímeros o de otros multímeros. En una forma aún más preferida, todas estas técnicas pueden emplearse en forma simultánea o sucesiva.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados igualmente se incluyen en los presentes anticuerpos.

Por anticuerpo quimérico, se pretende indicar un anticuerpo que contiene una región variable natural (cadena ligera y cadena pesada), derivada de un anticuerpo de una especie determinada, en combinación con regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo de una especie heteróloga a la especie determinada (por ejemplo ratón, caballo, conejo, perro, vaca, pollo, etc.).

Los anticuerpos o sus fragmentos de tipo quimérico, pueden prepararse al utilizar las técnicas de recombinación genética. Por ejemplo, el anticuerpo quimérico puede producirse al clonar un ADN recombinante que contiene un promotor y una secuencia que codifica la región variable de un anticuerpo monoclonal no-humano, especialmente murino y una secuencia que codifica la región constante del anticuerpo humano. Un anticuerpo quimérico codificado por este gen recombinante, por ejemplo será una quimera ratón-humano, la especificidad de este anticuerpo se determina por la región variable derivada del ADN murino y su isotipo determinado por la región constante derivada del ADN humano. Para los métodos de preparación de anticuerpos quiméricos, es posible por ejemplo referirse al documento Verhoeven et al. (BioEssays, 8:74, 1988), Morrison et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6851-6855, 1984) o la patente US n° 4.816.567.

Por anticuerpo humanizado, se pretende hacer referencia a un anticuerpo que contiene regiones CDR derivadas de un anticuerpo de origen no humano, las otras partes de la molécula de anticuerpo se derivan de uno (o varios) anticuerpos humanos. Aún más, algunos de los residuos de los segmentos del esqueleto (denominado FR) pueden modificarse a fin de conservar la afinidad del enlace (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988).

Los anticuerpos humanizados o sus fragmentos, pueden prepararse por técnicas conocidas por el experto en la materia (tal como por ejemplo, aquellos descritos en los documentos de Singer et al., J. Immun. 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10: 1-142, 1992; o Bebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992).

Otros métodos de humanización se conocen por el experto en la materia, por ejemplo el método de "injerto de CDR" (CDR Grafting) por Protein Design Lab (PDL) en las solicitudes de patente EP 0 451261, EP 0 682 040, EP 0 9127, EP 0 566 647 o patentes US n° 5.530.101, 6.180.370, 5.585.089 y 5.693.761. Las siguientes patentes también pueden mencionarse: US n° 5.639.641; US n° 6.054.297; US n° 5.886.152 y US n° 5.877.293.

Por "fragmento funcional" de un anticuerpo, se pretende indicar en la presente memoria en particular un fragmento de anticuerpo, tal como Fv, scFv (sc para cadena sencilla), Fab, F(ab')₂, Fab', fragmentos o diacuerpos scFv-Fc, o cualquier fragmento del cual el tiempo de vida media se ha incrementado por modificación química, tal como la adición de poli(alquilen) glicol tal como poli(etilen) glicol ("modificación con polietilen glicol o PEG-ilación") (fragmentos modificados con polietilen glicol denominados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG o Fab'-PEG) ("PEG" por Poli(Etilen) Glicol), o por incorporación en un liposoma, los fragmentos tienen al menos una de las CDRs características de las secuencias SEC ID Nos. 1 a 17 y 56 a 61, y en especial porque es

capaz de ejercer de manera general, una actividad incluso parcial del anticuerpo del cual descende, tal como en particular la capacidad por reconocer y ligar a c-Met, y de ser necesario inhibir la actividad de c-Met.

Preferentemente, dichos fragmentos funcionales estarán constituidos o comprenderán una secuencia parcial de la cadena variable pesada o ligera del anticuerpo del cual se derivan, la secuencia parcial es suficiente para retener la misma especificidad de enlace que el anticuerpo del cual descende y una afinidad suficiente, de preferencia al menos igual a 1/100, en una forma más preferida de al menos 1/10, del anticuerpo del cual descende, con respecto a c-Met. Este fragmento funcional contendrá por lo menos 5 aminoácidos de preferencia 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 50 y 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia del anticuerpo del cual descende.

Preferentemente, estos fragmentos funcionales serán fragmentos del tipo Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc o diacuerpos, que en general tienen la misma especificidad de enlace que el anticuerpo del cual descenden. En una forma de realización más preferida, estos fragmentos se eligen entre fragmentos divalentes tales como fragmentos F(ab')₂. Los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse partiendo de anticuerpos tal como se describió anteriormente por métodos tales como digestión por enzimas, tales como pepsina o papaína y/o por rompimiento de los puentes disulfuro por reducción química. De otra manera, los fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse por técnicas de recombinación genética igualmente bien conocidas por el experto en la materia o de otra forma por síntesis de péptido mediante por ejemplo sintetizadores de péptido automáticos tales como aquellos suministrados por la compañía Applied Biosystems, etc.

Por "fragmento divalente", habrá de entenderse cualesquiera fragmentos de anticuerpo que comprenden dos brazos y más particularmente fragmentos F(ab')₂.

Más particularmente, la divulgación comprende los presentes anticuerpos, o sus fragmentos funcionales, en especial anticuerpos quiméricos o humanizados, obtenidos por recombinación genética o por síntesis química.

Por "derivados" de un anticuerpo, se entiende en la presente memoria una proteína de enlace que comprende un andamio o adaptador de proteína y al menos una de las CDRs seleccionadas del anticuerpo original, a fin de mantener la capacidad de enlace. Estos compuestos son bien conocidos por el experto en la materia y se describirán con mayor detalle en la siguiente especificación.

Más particularmente, el presente anticuerpo o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, se caracteriza porque dicho derivado consiste en una proteína de enlace que comprende un andamio o adaptador en el que al menos una CDR se ha insertado para la conservación de las propiedades de reconocimiento paratópicas del anticuerpo original.

Una o varias secuencias a través de las 6 secuencias CDR descritas en la presente memoria, pueden presentarse en un andamio o adaptador de proteína. En este caso, el andamio de proteína reproduce la estructura principal de proteína con plegado apropiado de las CDR(s) insertadas, de esta manera permitiéndole (o permitiéndoles) mantener sus propiedades de reconocimiento paratópicas de antígeno.

El experto en la materia sabe cómo seleccionar el andamio de proteína en el que puede injertarse al menos una CDR seleccionada del anticuerpo original. Más particularmente, se conoce que, para seleccionarse, este andamio deberá exhibir varias características como sigue (Skerra A., J. Mol. Recogn., 13, 2000, 167-187):

- buena conservación filogenética,
- arquitectura robusta con una organización molecular tri-dimensional bien conocida (tal como por ejemplo, cristalografía o RMN),
- tamaño pequeño,
- sin o solo bajo grado de modificaciones post-traducción,
- fácil de producir, expresar y purificar.

Este andamio de proteína puede ser, pero sin limitación, una estructura seleccionada del grupo que consiste de fibronectina y de preferencia el décimo dominio tipo fibronectina III (FNfn10), lipocalina, anticalina (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4):257-75), el derivado de proteína Z del dominio B de la proteína de estafilococo A, tioredoxina A o cualquier proteína con dominio repetido tal como "repetición de anquirina" (Kohl et al., PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705), "repetición armadillo", "repetición rica en leucina" o "repetición de tetratricopéptido".

También puede mencionarse derivado de andamio de toxinas (tal como por ejemplo, de toxinas de escorpión, de insectos, plantas o moluscos) o inhibidores de proteína de óxido nítrico sintasa neuronal (PIN).

Como un ejemplo no limitativo de estas construcciones híbridas, puede mencionarse la inserción del CDR-H1 (cadena pesada) de un anticuerpo anti-CD4, es decir el anticuerpo 13B8.2, en uno del bucle expuesto de PIN. Las propiedades de enlace de la proteína de enlace obtenida permanecen similares al anticuerpo original (Bes et al., BBRC 343, 2006, 334-344). También puede mencionarse el injerto de CDR-H3 (cadena pesada) de un anticuerpo anti-lizozima VHH en un bucle de neocarzinostatina (Nicaise et al., 2004).

En el presente caso, una CDR interesante para conservar puede ser, sin limitación la CDR-L2 como se conserva en dos anticuerpos descritos en la presente memoria, es decir 227H1 y 224G11.

Como se mencionó anteriormente, este andamio de proteína puede comprender de 1 a 6 CDR(s) del anticuerpo original. En una forma de realización preferida, pero sin limitación alguna, el experto en la materia seleccionará al menos una CDR de la cadena pesada, la cadena pesada se conoce particularmente implicada en la especificidad de anticuerpo. La selección de las CDR(s) de interés será evidente para el experto en la materia con métodos conocidos (BES et al, FEBS letters 508, 2001, 67-74).

Como una evidencia, estos ejemplos no son limitativos y cualquier otro andamio conocido o descrito, deberá ser incluido en la presente memoria.

De acuerdo con un nuevo aspecto, son descritos asimismo unos ácidos nucleicos aislados, caracterizado por que dicho ácido nucleico se selecciona de entre los siguientes ácidos nucleicos:

un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, como se describe en la presente memoria;

un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que se selecciona de entre el grupo que consiste en:

una secuencia nucleica que comprende las secuencias SEC ID nº 24, SEC ID nº 25, SEC ID nº 26 y las secuencias SEC ID nº 33, SEC ID nº 34 y SEC ID nº 35;

una secuencia nucleica que comprende las secuencias SEC ID nº 27, SEC ID nº 28, SEC ID nº 29 y las secuencias SEC ID nº 36, SEC ID nº 34 y SEC ID nº 37;

una secuencia nucleica que comprende las secuencias SEC ID nº 30, SEC ID nº 31, SEC ID nº 32 y las secuencias SEC ID nº 38, SEC ID nº 39 y SEC ID nº 40; y

una secuencia nucleica que comprende las secuencias SEC ID nº 64, SEC ID nº 65, SEC ID nº 66 y las secuencias SEC ID nº 67, SEC ID nº 68 y SEC ID nº 69;

un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que se selecciona de entre el grupo de secuencias que consiste en:

una secuencia nucleica que comprende las secuencias SEC ID nº 41 y SEC ID nº 44;

una secuencia nucleica que comprende las secuencias SEC ID nº 42 y SEC ID nº 45;

una secuencia nucleica que comprende las secuencias SEC ID nº 43 y SEC ID nº 46; y

una secuencia nucleica que comprende las secuencias SEC ID nº 70 y SEC ID nº 71;

los ácidos nucleicos de ARN correspondientes de los ácidos nucleicos como se define en b) o c);

los ácidos nucleicos complementarios de los ácidos nucleicos como se define en a), b) y c); y

un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos que puede hibridar en unas condiciones de elevada severidad con por lo menos una de las CDR de secuencia SEC ID nº 24 a 40 y 64 a 69.

Por ácido nucleico, secuencia nucleica o de ácido nucleico, polinucleótido, oligonucleótido, secuencia de polinucleótidos, secuencia de nucleótidos, términos que se emplearán en forma indiferente en la presente memoria, se pretende indicar un enlace de nucleótidos preciso que está o no modificado, permitiendo que se defina un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene o no contiene nucleótidos no naturales, y capaces de corresponder por igual a un ADN de doble hebra, un ADN de hebra sencilla a los productos de transcripción de los ADN.

También habrá de apreciarse en la presente memoria que las presentes secuencias nucleótidas no se encuentran en su ambiente cromosomal natural, es decir en el estado natural. Se refiere a secuencias que se

han aislado y/o purificado, es decir, que se han seleccionado en forma directa o indirecta por ejemplo por copia, su ambiente ha sido al menos parcialmente modificado. De esta manera igualmente se pretende que indique en la presente memoria los ácidos nucleicos aislados obtenidos por recombinación genética, por ejemplo mediante células hospedadoras obtenidas por síntesis química.

Una hibridización bajo condiciones de alta severidad, significa que se eligen las condiciones de temperatura y concentración iónica de manera tal que permitan el mantenimiento de la hibridización entre dos fragmentos de ADN complementario. A manera de ilustración, las condiciones de alta severidad de la etapa de hibridización para propósitos de definir los fragmentos polinucleótidos descritos anteriormente, son ventajosamente las siguientes.

La hibridización ADN-ADN o ADN-ARN se lleva a cabo en dos etapas: (1) prehibridización a 42 grados C por 3 horas en amortiguador fosfato (20 mM, pH 7.5) que contiene 5 x SSC (1 x SSC que corresponde a una solución de NaCl 0.15 M + citrato de sodio 0.015 M), 50% de formamida, 7% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 10 x Denhardt, 5% de dextran sulfato y 1% de ADN de esperma de salmón; (2) hibridización actual por 20 horas a una temperatura que depende del tamaño de la sonda (es decir: 42 grados C, para un tamaño de sonda > 100 nucleótidos) seguido por 2 lavados de 20 minutos a 20 grados C en 2 x SSC + 2% de SDS, 1 lavado de 20 minutos a 20 grados C en 0.1 x SSC + 0.1% de SDS. El último lavado se lleva a cabo en 0.1 x SSC + 0.1% de SDS por 30 minutos a 60 grados C para un tamaño de sonda > 100 nucleótidos. Las condiciones de hibridización de alta severidad descritas anteriormente para un polinucleótido de tamaño definido, pueden adaptarse por el experto en la materia para oligonucleótidos de tamaño mayor o menor, de acuerdo con las enseñanzas de Sambrook et al. (1989, Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor).

La presente divulgación igualmente se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico como se describe anteriormente.

La presente divulgación se refiere especialmente a vectores de expresión y/o clonación que contienen una secuencia de nucleótidos descrita anteriormente.

Los vectores contienen preferentemente elementos que permiten la expresión y/o secreción de las secuencias de nucleótidos en una célula hospedadora determinada. El vector por lo tanto debe contener un promotor, señales de inicio y terminación de traducción, así como regiones apropiadas de regulación de transcripción. Debe ser capaz de mantenerse en una forma estable en la célula hospedadora y opcionalmente tener señales particulares que especifican la secreción de la proteína traducida. Estos diferentes elementos se eligen y optimizan por el experto en la materia, como una función de la célula hospedadora empleada. Para este efecto, las secuencias de nucleótido pueden insertarse en vectores de replicación autónomos en el hospedador selecto o ser vectores integrales del hospedador selecto.

Estos vectores se preparan por métodos actualmente empleados por el experto en la materia, y los clones resultantes pueden introducirse en un hospedador apropiado por métodos estándar, tales como lipofección, electroporación, choque térmico, o métodos químicos.

Los presentes vectores por ejemplo son, vectores de origen plásmido o viral. Son útiles para transformar células hospedadoras a fin de clonar o expresar las secuencias de nucleótido descritas en la presente memoria.

La presente divulgación comprende asimismo las células hospedadoras transformadas por o que comprenden un vector como se describe anteriormente.

La célula hospedadora puede seleccionarse de sistemas procarióticos o eucarióticos, por ejemplo células bacterianas pero igualmente células de levadura o células de animales, en particular células de mamífero. Igualmente es posible utilizar células de insecto o células de plantas.

Son divulgados asimismo animales, excepto el hombre, que comprenden al menos una célula transformada como se describe en la presente memoria.

En otro aspecto, se proporciona en la presente memoria un proceso para producción de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales descrito anteriormente, estando dicho proceso caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

cultivo en un medio y condiciones de cultivo apropiadas de una célula hospedadora como se divulga en la presente memoria; y

la recuperación de los anticuerpos, o uno de sus fragmentos funcionales, producidos de esta manera, partiendo del medio de cultivo o las células cultivadas.

Las células transformadas como se describe anteriormente pueden utilizarse en procesos para preparación de

polipéptidos recombinantes divulgados en la presente memoria. Los procesos para preparación de dicho polipéptido, en forma recombinante, se caracterizan porque emplean un vector y/o una célula transformada por un vector como se describe anteriormente, los mismos son comprendidos en la presente invención. De preferencia, se recupera una célula transformada por dicho vector, se cultiva bajo condiciones que permiten la expresión del polipéptido y el péptido recombinante.

Como se ha dicho, la célula hospedadora puede seleccionarse de sistemas procarióticos o eucarióticos. En particular, es posible identificar secuencias nucleótido, facilitando la secreción en dicho sistema procariótico o eucariótico. Un vector que transporta dicha secuencia, por lo tanto puede ser empleado ventajosamente para la producción de proteínas recombinantes, pretendidas para secretarse. En efecto, 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 en el interior de las células hospedadoras.

Igualmente es posible preparar los presentes polipéptidos por síntesis química. Este proceso de preparación igualmente es un objeto de la divulgación. El experto en la materia conoce los procesos de síntesis química, por ejemplo las técnicas que emplean fases sólidas [Steward et al, 1984, Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed., (1984)] o técnicas que utilizan fases sólidas parciales, al condensar fragmentos o por síntesis clásica en solución. Los polipéptidos obtenidos por síntesis química y capaces de contener aminoácidos no naturales correspondientes, igualmente están comprendidos en la divulgación.

Los anticuerpos, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, capaces de obtenerse por un proceso descrito en la presente memoria están comprendidos asimismo en la presente divulgación.

La presente divulgación también se refiere al presente anticuerpo como un medicamento.

La presente divulgación se refiere asimismo a una composición farmacéutica que comprende a manera de principio activo, un compuesto que consiste en un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, descrito anteriormente, de preferencia en mezcla con un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otra forma de realización consiste en una composición tal como se describió anteriormente, que comprende aún más, como un producto de combinación para uso simultáneo, separado o secuencial, un anticuerpo antitumoral.

Más preferentemente, dicho segundo anticuerpo anti-tumoral puede seleccionarse a través de anti-IGF-IR, anti-EGFR, anti-HER2/neu, anti-VEGFR, anti-VEGF, etc., anticuerpos o cualesquiera otros anticuerpos anti-tumorales conocidos por el experto en la materia. Resulta evidente que la utilización, como segundo anticuerpo, de fragmentos o derivados funcionales de los anticuerpos anteriormente mencionados forma parte de la presente divulgación.

Como un anticuerpo más preferido, se eligen anticuerpos anti-EGFR tal como por ejemplo del anticuerpo C225 (Erbix).

"Uso simultáneo" se entiende que significa la administración de los dos compuestos de dicha composición es una forma farmacéutica sencilla e idéntica.

"Uso separado" se entiende que significa la administración, al mismo tiempo de los dos compuestos de dicha composición en formas farmacéuticas distintas.

"Uso secuencial" se entiende que significa la administración sucesiva de los dos compuestos de dicha composición, cada uno en una forma farmacéutica distinta.

De manera general, dicha composición aumenta considerablemente la eficacia del tratamiento de cáncer. En otras palabras, el efecto terapéutico de los presentes anticuerpos anti-c-Met, se potencia de manera inesperada por la administración de un agente citotóxico. Otra ventaja subsecuente mayor producida por dicha composición, se refiere a la posibilidad de utilizar dosis eficaces inferiores de principio activo, que permiten evitar o reducir los riesgos de aparición de efectos secundarios, en particular los efectos de agente citotóxico.

Además, esta composición permitirá que se alcance más rápidamente el efecto terapéutico esperado.

La presente composición también puede caracterizarse por que comprende, aún más, como un producto de combinación para uso simultáneo, separado o secuencial, un agente citotóxico/citostático.

Por "agentes terapéuticos anticancerígenos" o "agentes citotóxicos/citostáticos", se pretende una sustancia que cuando se administra a un sujeto, trata o evita el desarrollo de cáncer en el cuerpo del sujeto. Como ejemplos no limitantes de estos agentes, pueden mencionarse agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores mitóticos, inhibidores de función de cromatina, agentes antiangiogénesis, anti-estrógenos, antiandrógenos o inmunomoduladores.

Estos agentes por ejemplo se citan en la edición 2001 de VIDAL, en la página dedicada a los compuestos agregados a la columna de oncología y hematología "Citotóxicos" (Citotoxics), estos compuestos citotóxicos citados haciendo referencia a este documento, se mencionan en la presente memoria como agentes citotóxicos preferidos.

Más particularmente, resultan preferidos los agentes siguientes.

"Agente alquilante" se refiere a cualquier sustancia que puede entrelazar o alquilar cualquier molécula, de preferencia ácido nucleico (por ejemplo, ADN), dentro de una célula. Ejemplos de agentes alquilantes incluyen mostaza de nitrógeno, tales como mecloretamina, clorambucol, melfalán, clorhidrato, pipobromen, prednimustina, fosfato disódico o estramustina; oxazoforinas tales como ciclofosfamida, altretamina, trofosfamida, sulfofosfamida o ifosfamida; aziridinas o imino-etilenos tales como tiotepa, trietilenamina o altetramina; nitrosourea tal como carmustina, estreptozocina, fotemustina o lomustina; alquil-sulfonatos tales como busulfan, treosulfan o improsulfan; triazenos tales como dacarbazina; o complejos de platino tales como cis-platino, oxaliplatina y carboplatina.

"Antimetabolitos" se refiere a sustancias que bloquean el crecimiento celular y/o metabolismo, al interferir con ciertas actividades, usualmente síntesis de ADN. Ejemplos de antimetabolitos incluyen metotrexato, 5-fluoruracilo, floxuridina, 5-fluorodeoxiuridina, capecitabina, citarabina, fludarabina, citosina arabinosida, 6-mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG), clorodesoxiadenosina, 5-azacitidina, gemcitabina, cladribina, deoxicoformicina y pentostatina.

"Antibióticos antitumorales" se refieren a compuestos que pueden evitar o inhibir síntesis de ADN, ARN y/o de proteínas. Ejemplos de antibióticos antitumorales incluyen doxorubicina, daunorubicina, idarrubicina, valrubicina, mitoxantrona, dactinomicina, mitramicina, plicamicina, mitomicina C, bleomicina y procarbazona.

"Inhibidores mitóticos" evitan el avance normal del ciclo celular y mitosis. En general, inhibidores de microtúbulos o taxoides tales como paclitaxel y docetaxel, son capaces de inhibir la mitosis. Vinca alcaloides tales como vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina también son capaces de inhibir la mitosis.

"Inhibidores de función de cromatina" o "inhibidores de topoisomerasa" se refieren a sustancias que inhiben la función normal de proteínas que modelan cromatina tales como topoisomerasa I o topoisomerasa II. Ejemplos de inhibidores de función de cromatina incluyen para topoisomerasa I, camptotecina y sus derivados tales como topotecan o irinotecan, y para topoisomerasa II, etopósido, etopósido fosfato y tenipósido.

"Agente antiangiogénesis" se refiere a cualquier fármaco, compuesto, sustancia o agente que inhibe el crecimiento de vasos sanguíneos. Agentes antiangiogénesis incluyen, pero de ninguna manera están limitados a razoxina, marimastat, batimastat, prinomastat, tanomastat, ilomastat, CGS-27023A, halofuginon, COL-3, neovastat, BMS-275291, talidomida, CDC 501, DMXAA, L-651582, escualamina, endostatina, SU5416, SU6668, interferón-alfa, EMD121974, interleucina-12, IM862, angiostatina y vitaxina.

"Antiestrógeno" o "agente antiestrogénico" se refiere a cualquier sustancia que reduce, antagoniza o inhibe la acción de estrógeno. Ejemplos de agentes antiestrógenos son tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno, anastrozol, letrozol y exemestano.

"Antiandrógenos" o "agentes antiandrógenos" se refieren a cualquier sustancia que reduce, antagoniza o inhibe la acción de un andrógeno. Ejemplos de antiandrógenos son flutamida, nilutamida, bicalutamida, esprironolactona, ciproterona acetato, finasterida y cimitidina.

"Inmunomoduladores" son sustancias que estimulan el sistema inmunitario.

Los ejemplos de inmunomoduladores incluyen interferón, interleucina tales como aldesleucina, OCT-43, denileucina diflitox e interleucina-2, factores de necrosis tumoral tales como tasonermina u otros inmunomoduladores tales como lentinano, sizofirano, roquinimex, pidotimod, pegademase, timopentina, ácido poliinosínico-policitidílico (poly I:C) o levamisol en conjunto con 5- fluorouracilo.

Para más detalle, el experto en la materia puede referirse al manual editado por la "Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique" y con título "traite de chimie thérapeutique, vol. 6, Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, edición TEC & DOC, 2003".

También pueden mencionarse como agentes químicos o agentes citotóxicos, todos los inhibidores de cinasa tales como por ejemplo, gefitinib o erlotinib.

En una forma de realización particularmente preferida dicha composición como un producto de combinación se caracteriza por que el agente citotóxico se acopla químicamente al anticuerpo para uso simultáneo.

A fin de facilitar el acoplamiento entre el agente citotóxico y dicho anticuerpo descrito en la presente memoria, es especialmente posible introducir moléculas espaciadoras entre los dos compuestos a acoplar, tales como poli(alquilen) glicoles como polietilen glicol, o de otra forma aminoácidos o en otra modalidad, utilizar derivados activos de los agentes citotóxicos en los que se hubieran introducido funciones capaces de reaccionar con el anticuerpo. Estas técnicas de acoplamiento son bien conocidos por el experto en la materia y no serán desarrolladas en la presente descripción.

La presente divulgación se refiere en otro aspecto, a una composición caracterizada por que uno, al menos de los anticuerpos, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales se conjuga con una toxina celular y/o un radioelemento.

Preferentemente, dicha toxina o dicho radioelemento es capaz de inhibir al menos una actividad celular de células que expresan c-Met, en una forma más preferida capaz de evitar el crecimiento o la proliferación de la célula, especialmente de inactivar totalmente la célula.

Preferentemente asimismo, dicha toxina es una toxina enterobacteriana, en especial la exotoxina pseudomonas A.

Los radioelementos (o radioisótopos) de preferencia conjugados con los anticuerpos empleados para la terapia, son radioisótopos que emiten rayos gamma y de preferencia yodo¹³¹, itrio¹⁹⁹, paladio¹⁰⁰, cobre⁶⁷, bismuto²¹⁷ y antimonio²¹¹. Los radioisótopos que emiten rayos beta y alfa igualmente pueden emplearse para la terapia.

Por toxina o radioelemento conjugado con al menos un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, se pretende indicar cualesquiera medios que permitan que la toxina o el radioelemento se una al anticuerpo por lo menos, en especial por acoplamiento covalente entre los dos compuestos, con o sin introducción de una molécula de enlace.

Entre los agentes que permiten enlace en una forma química (covalente), electrostática o no covalente de todo o parte de los componentes del conjugado, puede hacerse particularmente mención de benzoquinona, carbodiimida y más particularmente EDC (hidrocloruro de 1-etil-3-[3-dimetil-aminopropil]-carbodiimida), dimaleimida, ácido ditiobis- nitrobenzoico (DTNB), N-succinimidil S-acetil tio-acetato (SATA), los agentes fuente que tienen uno o más grupos fenilazida que reaccionan con los ultravioletas (U.V.) y de preferencia N-[4-(azidosalicilamino)butil]-3'-(2'-piridilditio)-propionamida (APDP), N-succinimidil 3-(2'-piridilditio)propionato (SPDP), 6-hidrazino-nicotinamida (HYNIC).

Otra forma de acoplamiento, especialmente para los radioelementos, puede consistir en el uso de un quelante de ión bifuncional.

Entre estos quelatos, es posible mencionar los quelatos derivados de EDTA (ácido etilendiamintetraacético) o de DTPA (ácido dietilentriaminapentaacético) que se han desarrollado para ligar metales, en especial metales radioactivos, e inmunoglobulinas. De esta manera, DTPA y sus derivados pueden sustituirse por diferentes grupos en la cadena de carbonos, a fin de incrementar la estabilidad y la rigidez del complejo ligando-metal (Krejcarek et al. (1977); Brechbiel et al. (1991); Gansow (1991); patente US 4.831.175).

Por ejemplo el ácido dietilentriaminpentaacético (DTPA) y sus derivados, que se han empleado ampliamente en medicina y en biología durante un largo tiempo, ya sea en su forma libre o en la forma de un complejo con un ión metálico, tiene la característica notable de formar quelatos estables con iones metálicos y para acoplarse con proteínas de interés terapéutico o de diagnóstico tales como anticuerpos para el desarrollo de radioinmunoconjugados en terapia de cáncer (Meases et al., (1984); Gansow et al. (1990)).

Asimismo, preferentemente, dicho por lo menos un anticuerpo que forma dicho conjugado se selecciona de sus fragmentos funcionales, en especial los fragmentos amputados de su componente Fc tales como los fragmentos scFv.

Como se ha mencionado anteriormente, en una forma de realización, dicho agente citotóxico/citostático o la toxina y/o un radioelemento, se acopla químicamente a por lo menos uno de los elementos de la composición para uso simultáneo.

La presente divulgación comprende la composición descrita como un medicamento.

La presente divulgación comprende además la utilización de la presente composición para la preparación de un medicamento.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a la utilización de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, y/o de una composición como se describió anteriormente, para la preparación de un

medicamento pretendido para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células de tumor.

Otro aspecto consiste en el uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales y/o de una composición, como se describió anteriormente o el uso anteriormente mencionado, para la preparación de un medicamento pretendido para la prevención o para el tratamiento de cáncer.

Se describe asimismo en la presente memoria un método pretendido para inhibir el crecimiento y/o proliferación de células de tumor en un paciente, comprendiendo dicho método la administración a un paciente que lo requiere, de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales descrito anteriormente, un anticuerpo producido por un hibridoma descrito en la presente memoria o una composición descrita anteriormente.

La presente divulgación comprende además un método para la prevención o tratamiento de cáncer en un paciente que lo requiere, que comprende la administración al paciente de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales descrito anteriormente, un anticuerpo producido por un hibridoma descrito en la presente memoria o una composición descrita en la presente memoria.

En un aspecto particular preferido, el cáncer es un cáncer seleccionado de cáncer de próstata, osteosarcomas, cáncer pulmonar, cáncer de mama, cáncer endometrial, glioblastoma o cáncer de colon.

Como se explicó anteriormente, una ventaja de la invención es permitir el tratamiento de cánceres relacionados a activación de Met dependiente e independiente de HGF.

La presente divulgación, todavía en otro aspecto, comprende un método de diagnóstico *in vitro* de enfermedades inducidas por una sobreexpresión o una subexpresión del receptor c-Met partiendo de una muestra biológica en donde la presencia normal del receptor c-Met se sospecha, el método se caracteriza por que comprende la etapa en donde la muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo descrito en la presente memoria, siendo posible que el anticuerpo de ser necesario, esté marcado.

Preferentemente, dichas enfermedades conectadas con la presencia anormal del receptor c-Met en el método de diagnóstico, serán cánceres.

Dicho anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, puede estar presente en la forma de un inmunoconjugado o de un anticuerpo marcado para obtener una señal detectable y/o cuantificable.

Los anticuerpos marcados o sus fragmentos funcionales incluyen por ejemplo, anticuerpos denominados inmunoconjugados, que pueden conjugarse, por ejemplo con enzimas tales como peroxidasa, fosfatasa alcalina, beta-D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa amilasa, anhidrasa carbónica, acetilcolinesterasa, lisozima, malato dehidrogenasa o glucosa 6-fosfato dehidrogenasa o por una molécula tal como biotina, digoxigenina o 5-bromodeoxiuridina. Etiquetas fluorescentes igualmente pueden conjugarse en los anticuerpos o sus fragmentos funcionales descritos en la presente memoria y en especial incluyen fluoresceína y sus derivados, fluoróforo, rodamina y sus derivados, GFP (GFP por "Proteína Fluorescente Verde"), dansil, umbeliferona, etc. En estos conjugados, los anticuerpos pueden prepararse por métodos conocidos por la persona con destreza en la especialidad. Pueden acoplarse a las enzimas o a las etiquetas fluorescentes directamente o por intermedio de un grupo espaciador o de un grupo de enlace tal como un polialdehído, como glutaraldehído, ácido etilendiamintetraacético (EDTA), ácido dietilen-triaminopentaacético (DTPA), o en la presencia de agentes de acoplamiento tales como aquellos mencionados anteriormente para los conjugados terapéuticos. Los conjugados contienen etiquetas de tipo fluoresceína, pueden prepararse por reacción con un isotiocianato.

Otros conjugados igualmente pueden incluir etiquetas quimioluminiscentes tales como luminol y los dioxetanos, etiquetas bioluminiscentes tales como luciferasa y luciferina, o de otra forma etiquetas radioactivas tales como yodo¹²³, yodo¹²⁵, yodo¹²⁶, yodo¹³³, bromo⁷⁷, tecnecio^{99m}, indio¹¹¹, indio^{113m}, galio⁶⁷, galio⁶⁸, rutenio⁹⁵, rutenio⁹⁷, rutenio¹⁰³, rutenio¹⁰⁵, mercurio¹⁰⁷, mercurio²⁰³, renio^{99m}, renio¹⁰¹, renio¹⁰⁵, escandio⁴⁷, telurio^{121m}, telurio^{122m}, telurio^{125m}, tulio¹⁶⁵, tulio¹⁶⁷, tulio¹⁶⁸, flúor¹⁸, itrio¹⁹⁹, yodo¹³¹. Los métodos conocidos por el experto en la materia, existentes para acoplar los radioisótopos terapéuticos a los anticuerpos, ya sea directamente o por un agente quelante tal como EDTA, DTPA anteriormente mencionados, pueden emplearse para los radioelementos que pueden utilizarse en diagnóstico. Igualmente es posible mencionar marcado con Na¹²⁵ por el método de cloramina T [Hunter W.M. and Greenwood F. C. (1962) Nature 194:495] o de otra forma con tecnecio^{99m} por la técnica de Crockford et al. (patente US n° 4.424.200) o enlazado mediante DTPA como se describe por Hnatowich (patente US n° 4.479.930).

De esta manera, los presentes anticuerpos o sus fragmentos funcionales, pueden emplearse en un proceso para la detección y/o la cuantificación de una sobreexpresión o de una subexpresión, de preferencia una sobreexpresión del receptor c-Met en una muestra biológica, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

el contacto de la muestra biológica con un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, descrito en la

presente memoria; y

la demostración del complejo c-Met/anticuerpo posiblemente formado.

5 En una forma de realización particular, dichos anticuerpos o sus fragmentos funcionales, pueden emplearse en un proceso para la detección y/o la cuantificación del receptor c-Met en una muestra biológica, para la supervisión de la eficacia de un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de cáncer dependiente de c-Met.

10 Más generalmente, dichos anticuerpos o sus fragmentos funcionales pueden emplearse ventajosamente en cualquier situación en donde debe observarse la expresión del receptor c-Met en una forma cualitativa y/o cuantitativa.

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.

15 Cualquier procedimiento o prueba convencional puede emplearse a fin de llevar a cabo esta detección y/o dosis. La prueba puede ser una prueba de competencia o de emparejado, o cualquier prueba conocida por el experto en la materia dependiente de la formación de un complejo inmune de tipo anticuerpo-antígeno. Siguiendo las aplicaciones divulgadas en la presente memoria, el anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales, puede ser inmovilizado o marcado. Esta inmovilización puede llevarse a cabo en numerosos soportes conocidos por el experto en la materia. Estos soportes pueden incluir especialmente vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon o células naturales o modificadas. Estos soportes ya pueden ser solubles o insolubles.

20 A título de ejemplo, un método preferido pone en juego procesos inmunoenzimáticos de acuerdo con la técnica ELISA, por inmunofluorescencia o técnica de radioinmunoensayo (RIA) o equivalente.

Por lo tanto, la presente divulgación comprende asimismo los kits o conjuntos necesarios para llevar a cabo un método de diagnóstico de enfermedades inducido por una sobreexpresión o una subexpresión del receptor c-Met o para llevar a cabo un proceso para la detección y/o cuantificación de una sobreexpresión o de una subexpresión del receptor c-Met en una muestra biológica, de preferencia una sobreexpresión de dicho receptor, caracterizado por que el kit o conjunto comprende los siguientes elementos:

un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales descrito en la presente memoria;

35 opcionalmente, los reactivos para la formación del medio favorable para la reacción inmunológica;

opcionalmente, los reactivos que permiten la demostración de complejos c-Met/anticuerpo producidos por la reacción inmunológica.

40 Se describe asimismo en la presente memoria el uso de un anticuerpo o una composición de acuerdo con la invención, para la preparación de un medicamento pretendido para el blanco específico de un compuesto biológicamente activo a células que expresan o sobre-expresan el receptor c-Met.

45 En la presente memoria se pretende mediante compuestos biológicamente activos indicar cualquier compuesto capaz de modular, en especial de inhibir, actividad celular, en particular su crecimiento, su proliferación, transcripción o traducción de genes.

Se divulga asimismo un reactivo de diagnóstico *in vivo*, que comprende un anticuerpo como se describe en la presente memoria, o uno de sus fragmentos funcionales, de preferencia marcado, especialmente radiomarcado, y su uso en formación de imagen médica, en particular para la detección de cáncer conectado con la expresión o la sobreexpresión por una célula del receptor c-Met.

La divulgación se refiere asimismo a una composición como un producto de combinación o a un conjugado anti-c-Met/toxina o radioelemento, descrito en la presente memoria, como un medicamento.

55 Preferentemente, dicha composición, como un producto de combinación del conjugado de acuerdo con la invención se mezclará con un excipiente y/o un vehículo farmacéutico aceptable.

60 En la presente descripción, vehículo farmacéuticamente aceptable se pretende que indique un compuesto o combinación de compuestos que entran en una composición farmacéutica que no provoca reacciones secundarias y que permite, por ejemplo facilitar la administración del o de los compuestos activos, un aumento en su extensión de vida útil y/o su eficacia en el cuerpo, un aumento en su solubilidad en solución o de otra forma una mejora en su conservación. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y se adaptarán por el experto en la materia como una función de la naturaleza y del modo de administración del o de los compuestos activos seleccionados.

Preferentemente, estos compuestos se administrarán por la ruta sistémica, en particular por la ruta intravenosa, por la ruta intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea, o por la ruta oral. En una forma más preferida, la composición que comprende los anticuerpos descritos en la presente memoria se administrará varias veces, en una forma secuencial.

Sus modos de administración, dosis y formas farmacéuticas óptimas pueden determinarse de acuerdo con los criterios generalmente tomando en cuenta el establecimiento de un tratamiento adaptado a un paciente tal como por ejemplo, la edad o peso corporal del paciente, la seriedad de su condición general, la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios notados.

Otras características y ventajas de la invención aparecen en la continuación de la descripción, con los ejemplos y figuras en las que:

Figura 1: Ejemplos de perfiles FACS de los anticuerpos anti-c-Met selectos;

Figuras 2A y 2B: Inhibición *in vitro* de proliferación BXP3 por anticuerpos que dianizan c-Met;

Figura 3: Inhibición de dimerización de c-Met;

Figura 4: Reconocimiento de proteína por anticuerpos anti-c-Met;

Figuras 5A y 5B: "Cartografía de epítipo" de 11E1 y 5D5 por análisis BIAcore;

Figuras 6A y 6B: Efecto de MAbs en fosforilación de c-Met;

Figuras 7A y 7B: Desplazamiento de HGF radio-etiquetado por anticuerpos anti-c-Met;

Figura 8: Inhibición de invasión por anticuerpos anti-c-Met [en esta figura, SVF significa suero bovino fetal (FCS)];

Figura 9: Efecto de anticuerpos anti c-Met en sanación de heridas;

Figuras 10A y 10B: Ensayo de dispersión;

Figura 11: Ensayo de tubulogénesis tridimensional;

Figuras 12A y 12B: Efecto de anticuerpos en formación de esferoide;

Figura 13: Actividad *in vivo* de Mabs anti-c-Met en el modelo de xenoinjerto U87MG;

Figura 14: Expresión HGF por un conjunto de líneas celulares de tumor;

Figuras 15A y 15B: Caracterización de línea celular NCI-H441; con la Figura 15A que corresponde al análisis RT-PCR cuantitativo y la Figura 15B que corresponde a análisis FACS;

Figura 16: Actividad *in vivo* de anticuerpos anti-c-Met en modelo de xenoinjerto NCI-H441;

Figura 17A: Alineamiento de 224G11 VL con gen de célula germinal IGKV3-5*01 murina;

Figura 17B: Alineamiento de 224G11 VL con genes de células germinales IGKJ4*01 murina;

Figura 18A: Alineamiento de 224G11 VL con genes de células germinales IGKV3-11*01 y IGKV4-1*01 humanas;

Figura 18B: Alineamiento de 224G11 VL con gen de células germinales IGKJ4*02 humanas;

Figura 19A: IGKV3-11*01 versión humanizada basada en 224G11 VL con mutaciones mencionadas;

Figura 19B: IGKV4-1*01 versión humanizada basada en 224G11 VL con mutaciones mencionadas;

Figura 20A: Alineamiento de 224G11 VH con gen de células germinales IGHV1-18*01 murinas;

Figura 20B: Alineamiento de 224G11 VH con gen de células germinales IGHD2-4*01 murinas;

Figura 20C: Alineamiento de 224G11 VH con gen de células germinales IGHJ2*01 murinas;

Figura 21A: Alineamiento de 224G11 VH con gen de células germinales IGHV1-2*02 humanas;

Figura 21B: Alineamiento de 224G11 VH con gen de células germinales IGHJ4*01 humanas;

5 Figura 22: 224G11 VH humanizado con mutaciones mencionadas 224G11 VH;

Figura 23A: Alineamiento de 227H1 VL con gen de células germinales IGKV3-5*01 murinas;

10 Figura 23B: Alineamiento de 227H1 VL con gen de células germinales IGKJ4*01 murinas;

Figura 24A: Alineamiento de 227H1 VL con gen de células germinales IGKV3-11*01 y IGKV4-1*01 humanas;

Figura 24B: Alineamiento de 227H1 VL con gen de células germinales IGKJ4*02 humanas;

15 Figura 25A: Versión humanizada basada en IGKV3-11*01 de 227H1 VL con mutaciones mencionadas;

Figura 25B: versión humanizada basada en IGKV4-1*01 de 227H1 VL con mutaciones mencionadas;

20 Figura 26A: Alineamiento de 227H1 VH con gen de células germinales IGHV1-18*01 murinas;

Figura 26B: Alineamiento de 227H1 VH con un gen de células germinales IGHD1-1*02 murinas;

Figura 26C: Alineamiento de 227H1 VH con un gen de células germinales IGHJ2*01 murinas;

25 Figura 27A: Alineamiento de 227H1 VH con un gen de células germinales IGHV1-2*02 humanas;

Figura 27B: Alineamiento de 227H1 VH con un gen de células germinales IGHJ4*01 humanas;

30 Figura 28: Humanizado 227H1 VH con mutaciones mencionadas;

Figura 29A: Alineamiento de 223C4 VL con un gen de células germinales IGKV12-46*01 murinas;

Figura 29B: Alineamiento de 223C4 VL con un gen de células germinales IGKJ2*01 murinas;

35 Figura 30A: Alineamiento de 223C4 VL con un gen de células germinales IGKV1-NL1*01 humana;

Figura 30B: Alineamiento de 223C4 VL con un gen de células germinales IGKJ2*01 humana;

40 Figura 31: 223C4 VL humanizado con mutaciones mencionadas;

Figura 32A: Alineamiento de 223C4 VH con un gen de células germinales IGHV1-18*01 murinas;

Figura 32B: Alineamiento de 223C4 VH con un gen de células germinales IGHD6-3*01 murinas;

45 Figura 32C: Alineamiento de 223C4 VH con un gen de células germinales IGHJ4*01 murinas;

Figura 33A: Alineamiento de 223C4 VH con un gen de células germinales IGHV1-2*02 humanas;

50 Figura 33B: Alineamiento de 223C4 VH con un gen de células germinales IGHD1-26*01 humanas;

Figura 33C: Alineamiento de 223C4 VH con un gen de células germinales IGHJ6*01 humanas; y

Figura 34: 223C4 VH humanizado con mutaciones mencionadas;

55 Figura 35: Actividad antitumoral de 224G11 Mab murino solo o combinado con Navelbine® en el modelo de tumor NCI-H441 de xenoinjerto establecido;

Figura 36: Evaluación de Mabs anti-c-Met en proliferación de HUVEC;

60 Figura 37: Evaluación de Mabs anti-c-Met en formación de tubo HUVEC;

Figura 38A: Alineamiento de 11E1 VL con gen de células germinales IGKV4-79*01 murinas;

Figura 38B: Alineamiento de 11E1 VL con un gen de células germinales IGKJ4*01 murinas;

65 Figura 39A: Alineamiento de 11E1 VL con un gen de células germinales IGKV3D-7*01 humanas;

Figura 39B: Alineamiento de 11E1 VL con un gen de células germinales IGKJ4*02 humanas;

Figura 40: Versión humanizada de 11E1 VL con mutaciones mencionadas;

Figura 41A: Alineamiento de 11E1 VH con gen de células germinales IGHV1-7*01 murinas;

Figura 41B: Alineamiento de 11E1 VH con gen de células germinales IGHD4-I*01 murinas;

Figura 41C: Alineamiento de 11E1 VH con gen de células germinales IGHJ3*01 murinas;

Figura 42A: Alineamiento de 11E1 VH con genes de células germinales IGHV1-2*02 y IGHV1-46*01 humanas;

Figura 42B: Alineamiento de 11E1 VH con un gen de células germinales IGHJ4*03 humanas;

Figura 43: 11E1 VH humanizado con mutaciones mencionadas;

Figuras 44A y 44B: Ensayo de fosforilación c-Met en células A549. Evaluación de Mabs purificados 11E1 y 224G11, en ausencia o en presencia de HGF, ya sea a 30 µg/ml (Figura 44A) o dentro de un intervalo de dosis de 0.0015 a 30 µg/ml a fin de determinar valores EC₅₀ (Figura 44B);

Figura 45: Combinación *in vivo* de 224G11 Mab con Navelbine® en el modelo de xenoinjerto NSCLC NCI-H441;

Figura 46: Combinación *in vivo* de 224G11 Mab con Doxorubicina en el modelo de xenoinjerto NSCLC NCI-H441;

Figura 47: Combinación *in vivo* de 224G11 Mab con Docetaxel en el modelo de xenoinjerto NSCLC NCI-H441;

Figura 48: Combinación *in vivo* de 224G11 Mab con Temozolomida en el modelo de xenoinjerto NSCLC NCI-H441;

Figuras 49A, 49B, 49C y 49D: Efecto de Mabs anti-c-Met en crecimiento de esferoide U87-MG;

Figuras 50A y 50B: Actividad *in vitro* de formas quimérica y humanizada de 224G11 en el ensayo fosfo-c-Met;

Figura 51: Ajustes de análisis Biacore;

Figura 52: Actividad *in vivo* de 224G11 en células MDA-MB-231 coimplantadas con células MRC5 como fuente HGF humana en ratones desnudos Atímicos;

Figura 53: Ensayo de enlace basado en ELISA a Fc-cMet. Actividad de enlace Anti-Fc-c-Met se mide en un ensayo basado en ELISA, en donde conjugados anti-murinos Fc se utilizan para detectar los anticuerpos monoclonales murinos purificados 11E1, 224G11 y 227H1. Actividades de enlace dependientes de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico se miden a 450 nm;

Figura 54: Ensayo de competencia HGF-cMet. En este ensayo basado en ELISA, enlace residual Fc-cMET recombinante con HGF revestido con plástico en la presencia de anticuerpos monoclonales murinos purificados 11E1, 224G11 y 227H1 se detecta con conjugado FC antimurino y mide a 450 nm;

Figura 55: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de dominio VH recombinante derivados de 227H1. La secuencia de aminoácidos 227H1 VH se alinea con las secuencias marco receptoras humanas seleccionadas, con solo mencionados de los aminoácidos que se encontraron diferentes de la secuencia 227H1 VH murina. Secuencias 227H1 HZ1, HZ2 y HZ3 VH corresponden a versiones humanizadas implementadas del dominio VH murino 227H1, con residuos murino restantes en negrita. En HZ3, 10 residuos (*) se cambiaron automáticamente por sus contras partes humanas. En HZ2, los siete residuos del tercer grupo (3) se han estudiado. En HZ1VH, los nueve residuos del segundo grupo (2) se han mutado en sus contrapartes humanas, solo los seis residuos del primer grupo (1) permanecen murinos;

Figura 56: ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet de anticuerpos 227H1 recombinantes. La actividad de enlace anti-Fc-cMet se midió en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc antihumano se midieron en el ensayo basado en ELISA en donde Fc antihumano se emplearon para detectar anticuerpos recombinantes derivados 227-H1 quiméricos y humanizados. Actividades de enlace dependientes de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico de anticuerpos 227H1 derivado de

dominios VH humanizados, se midieron a 450 nm y después compararon con aquellos del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 57: ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet de anticuerpos derivados 227H1-recombinantes. La actividad de enlace anti-Fc-cMet se mide en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc antihumanos se emplean para detectar anticuerpos recombinantes derivados 227-H1 quiméricos y humanizados. La actividad de enlace dependiente de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico de anticuerpo 227H1 derivado HZ4VH humanizado se midió a 450 nm y después comparó con aquellos del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 58: ensayo de competencia HGF-cMet de anticuerpos recombinantes y murinos 227H1. En este ensayo basado en ELISA, enlace residual Fc-cMet recombinante con HGF revestido con plástico en la presencia de las diferentes formas del anticuerpo 227H1, se detecta con un anticuerpo anti-cMet no relacionado biotinilado. Anticuerpo monoclonal 227H1 murino purificado, anticuerpos recombinantes derivados 227H1 humanizados derivados de HZ4VH y quiméricos se probaron y compararon por sus habilidades para competir con enlace de HGF-cMet cuando se mide a 450 nm;

Figura 59: secuencia de dominio variable humanizado 227H1-HZ VH. *, corresponde a aminoácidos cambiados de facto a sus contrapartes humanas; †, corresponde a aminoácidos humanizados durante la implementación HZ3 a HZ1; §, corresponde a aminoácidos humanizados en la secuencia 227H1-HZ VH final;

Figura 60: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de dominios VH recombinantes derivados de 11E1. La secuencia de aminoácidos 11E1 VH se alinea con la secuencia marco receptora humana seleccionada, con solo los aminoácidos mencionados que se encontraron diferentes de la secuencia 11E1 VH murina. Secuencias 11E1 HZ VH1, VH2 y VH3 corresponden a versiones humanizadas implementadas del dominio VH murino 11E1, con residuos murinos restantes en negritas. En HZ VH3, siete residuos (*) se cambiaron automáticamente por sus contrapartes humanas. En HZ VH2, los siete residuos del tercer grupo (3) se han estudiado. En HZ VH1, los cinco residuos del segundo grupo (2) se han mutado a sus contrapartes humanas, solo los cinco residuos del primer grupo (1) permanecen murinos;

Figura 61: ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet de anticuerpos 11E1 recombinantes. Actividad de enlace anti-Fc-cMet se midió en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc anti-humanos se emplearon para detectar anticuerpos recombinantes derivados de 11E1 quiméricos y humanizados. Actividades de enlace dependientes de dosis sobre Fc-cMet recombinante revestido con plástico de anticuerpos 11E1 derivados de dominios VH humanizados se midieron a 450 nm y después compararon con aquellos del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 62: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de dominios de VL recombinantes derivados de 11E1. La secuencia de aminoácidos 11E1 VL se alinea con la secuencia marco receptora humana seleccionada, con solo los aminoácidos mencionados que se encontraron diferentes de la secuencia 11E1 VL murina. Secuencias 11E1 HZ VL1, VL2 y VL3 corresponden a versiones humanizadas implementadas del dominio VL murino 11E1, con residuos murinos restantes en negritas. En HZ VL3, diez residuos (*) se cambiaron automáticamente por sus contrapartes humanas. En HZ VL2, los ocho residuos del tercer grupo (3) se han estudiado. En HZ VL1, los ocho residuos del segundo grupo (2) se han mutado a sus contrapartes humanas, solo los cuatro residuos del primer grupo (1) permanecen murinos;

Figura 63: ensayo de enlace basado en ELISA a Fc-cMet de anticuerpos 11E1 recombinantes. Actividad de enlace anti-Fc-cMet se mide en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc anti-humanos se emplean para detectar anticuerpos recombinantes derivados de 11E1 quiméricos y humanizados. Actividades de enlace dependientes de dosis sobre Fc-cMet recombinante revestido con plástico de anticuerpos 11E1 derivados de dominios VL humanizados, se miden a 450 nm y después comparan con aquellos del anticuerpo quimérico a referencia/paternal;

Figura 64: ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet de anticuerpos 11E1 recombinantes. Actividad de enlace anti-Fc-cMet se midió en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc anti-humano se emplean para detectar anticuerpos recombinantes derivados de 11E1 humanizados y quiméricos. Actividades de enlace dependientes de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico de anticuerpos 11E1 derivados de dominios humanizados dobles se miden a 450 nm y después comparan con aquellas del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 65: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de secuencia de dominio 224G11 VH. La secuencia aminoácidos 224G11 VH se alinea con la secuencia de 227H1 VH (subrayados son residuos no homólogos) y con la secuencia marco receptora humana selecta, con solo los aminoácidos mencionados que se encontraron diferentes de la secuencia 224G11 VH murina. La secuencia 224G11 HZ VH0 corresponde a la versión humanizada "IMGT completa/basada en 227H1" del dominio VH murino 224G11. En esta secuencia, ningún residuo externo-IMGT-CDRs permanece murino;

Figura 66: ensayo de enlace basado en ELISA a Fc-cMet de anticuerpos 224G11 recombinantes. Actividad de enlace anti-Fc-cMet se mide en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc anti-humano se emplearon para detectar anticuerpos recombinantes derivados 224G11 humanizados derivados de HZVH0 y quiméricos. Actividad de enlace dependiente de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico del anticuerpo 224G11 derivado de VH11 humanizado HZVH0 "IMGT completo" se midió a 224G11 después comparó con aquellos del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 67: ensayo de competencia HGF-cMet de anticuerpos recombinantes y murinos 224G11. En este ensayo basado en ELISA, enlace residual Fc-cMet recombinante a HGF revestido con plástico en la presencia de formas diferentes del anticuerpo 224G11, se detecta con un anticuerpo anti-cMet no relacionado biotinilado. Anticuerpo monoclonal 224G11 murino purificado, anticuerpos recombinantes derivados 224G11 humanizados derivados de HZVH0 y quiméricos se probaron y compararon por sus capacidades para competir con enlace HGF-cMet cuando se miden a 450 nm;

Figura 68: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de secuencia de dominio 224G11 VL. La secuencia de aminoácidos 24G11 VL se alinea con las dos secuencias de marco receptor humano selectas, con solo los aminoácidos mencionados que se encontraron diferentes de la secuencia 224G11 VL murina. La secuencia 224G11 HZ VL3 corresponde a la versión humanizada "CDR1 más corto" del dominio VH murino 224G11 mientras que HZ VL6 corresponde a la versión "CDR1 más largo", con los residuos murinos restantes en negrita. Para ambas versiones humanizadas básicas, los residuos murino restantes están clasificados para adicional proceso de humanización en donde * corresponde a aminoácidos en las versiones básicas y 3, 2 y 1 corresponden a los grupos de residuos para el diseño de las versiones humanizadas implementadas;

Figura 69: ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet de anticuerpos 224G11 recombinantes. La actividad de enlace anti-Fc-cMet se mide en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc antihumano se utilizan para detectar anticuerpos recombinantes derivados 22G11 humanizados y quiméricos. Actividades de enlace dependientes de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico de anticuerpos 224G11 derivados de dominios VL3 y VL6 humanizados, se miden a 450 nm y después comparan con aquellos del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 70: ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet de anticuerpos 224G11 recombinantes. Actividad de enlace anti-Fc-cMet se mide en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc antihumanos se utilizan para detectar anticuerpos recombinantes derivados 224G11 quiméricos y humanizados. Actividades de enlace dependientes de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico de anticuerpos 224G11 derivados de dominios VL humanizados se miden a 450 nm y después comparan con aquellos del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 71: ensayo de competencia HGF-cMet de anticuerpos recombinantes y murinos 224G11. En este ensayo basado en ELISA, enlace residual Fc-cMet recombinante a HGF revestido con plástico en la presencia de las formas diferentes del anticuerpo 224G11, se detecta con un anticuerpo anti-cMet no relacionado biotinilado. Anticuerpo monoclonal 224G11 murino purificado, anticuerpos recombinantes derivados 224G11 humanizados derivados de HZVL4 y quiméricos, se probaron y compararon por sus habilidades para competir con enlace de HGF-cMet cuando se miden a 450 nm;

Figura 72: Secuencias de aminoácidos de la secuencia de dominio 224G11 VL. *, corresponde a aminoácidos cambiados de facto a sus contrapartes humanas en la versión HZ VL6 básica; !, corresponde a aminoácidos humanizados durante la implementación HZ VL6 a HZ VL4; §, corresponde a aminoácidos humanizados que permanecen murinos en la secuencia 224G11-HZ VL4;

Figura 73: ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet de anticuerpos 224G11 recombinantes. Actividad de enlace anti-Fc-cMet se mide en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc antihumano se utilizan para detectar anticuerpos recombinantes derivados de 22G11 humanizados y quiméricos. Actividades de enlace dependientes de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico de anticuerpos 224G11 derivados de dominios humanizados dobles se miden a 450 nm y después comparan con aquellos del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 74: ensayo de competencia HGF-cMet de anticuerpos recombinantes y murinos 224G11. En este ensayo basado en ELISA, enlace residual Fc-cMet recombinante con HGF revestido con plástico en la presencia de las formas diferentes del anticuerpo 224G11, se detecta con un anticuerpo anti-cMet no relacionado biotinilado. Anticuerpo monoclonal 224G11 murino purificado, anticuerpos recombinantes derivados 224G11 quiméricos y totalmente humanizados se probaron y compararon por sus habilidades para competir con enlace de HGF-cMet cuando se miden a 450 nm;

Figura 75: ensayo de enlace basado en ELISA a Fc-cMet de anticuerpos 224G11 recombinantes. Actividad de enlace anti-Fc-cMet se mide en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc antihumanos se

utilizan para detectar anticuerpos recombinantes derivados 22G11 quiméricos y humanizados. Actividades de enlace dependientes de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico de mutantes sencillos de anticuerpos 224G11 totalmente humanizados derivados de VL4, se miden a 450 nm y después comparan con aquellos del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 76: ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet de anticuerpos 224G11 recombinantes. Actividad de enlace anti-Fc-cMet se mide en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc antihumano se utilizan para detectar anticuerpos recombinantes derivados de 22G11 quiméricos y humanizados. Actividades de enlace dependientes de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico y mutantes sencillos y múltiples de los anticuerpos 224G11 humanizados totalmente derivados de VL4, se miden a 450 nm y después comparan con aquellos del anticuerpo quimérico de referencia/paternal; y

Figura 77: Ensayo de competencia HGF-cMet de anticuerpos recombinantes y murinos 224G11. En este ensayo basado en ELISA, enlace residual Fc-cMet recombinante con HGF revestido con plástico en la presencia de las diferentes formas de anticuerpo 224G11, se detecta con un anticuerpo anti-cMet no relacionado biotinilado. Anticuerpo monoclonal 224G11 murino purificado, mutantes quiméricas y sencillas o múltiples de los anticuerpos recombinantes 224G11 totalmente humanizados derivados de VL4, se probaron y compararon por sus habilidades para competir con enlace de HGF-cMet cuando se mide a 450nm.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos contra c-Met

Para generar anticuerpos anti-c-Met, ratones BALB/c de 8 semanas de edad se inmunizaron ya sea 3 a 5 veces en forma subcutánea con una línea celular transfectada CHO que expresa c-Met en su membrana de plasma (20×10^6 células/dosis/ratón) o 2 a 3 veces con una proteína de fusión de dominio extracelular c-Met (10-15 µg/dosis/ratón) (R&D Systems, Catálogo # 358MT) o fragmentos de esta proteína recombinante en mezcla con adyuvante completo de Freund, para la primer inmunización y adyuvante Freund incompleto para las siguientes. Protocolos mixtos en donde los ratones recibieron tanto células CHO-cMet como proteínas recombinantes también se realizaron. Tres días antes de la fusión celular, los ratones se reforzaron i.p. o i.v. con la proteína recombinante o fragmentos. Los bazos de los ratones se recolectaron y fusionaron a células de mieloma SP2/O-Ag14 (ATCC) y sometieron a selección HAT. Cuatro fusiones se realizaron. 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 y Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

Los hibridomas obtenidos inicialmente se cribaron por ELISA en la proteína recombinante c-Met y después por análisis FACS en líneas celulares A549 NSCLC, pancreáticas BxPC3 y U87-MG de glioblastoma (perfiles representativos se presentan en la Figura 1) para asegurarse que los anticuerpos producidos eran capaces de reconocer también el receptor nativo en las células de tumor. Reactores positivos en estas 2 pruebas se amplificaron, clonaron y un conjunto de hibridomas se recuperó, purificó y cribó por su habilidad para inhibir proliferación de células *in vitro* en el modelo BxPC3.

Para ese propósito, 50 000 células de BxPC3 se revistieron en placas de 96 pocillos en medio RPMI, L. Glutamina 2 mM, sin SVF. 24 horas después de revestir, los anticuerpos a probar se agregaron a una concentración final en el intervalo de 0.0097 a 40 µg/ml 60 min antes de adición de 100 ng/ml de hHGF. Después de 3 días, las células se pulsaron con 0.5 µCi de [³H]timidina por 16 horas. La magnitud de [³H]timidina incorporada en ADN insoluble en ácido tricloroacético se cuantificó por conteo de centelleo en medio líquido. Los resultados se expresan como datos en crudo para realmente evaluar el efecto agonístico intrínseco de cada Mab (Figuras 2A y 2B).

Después, anticuerpos que inhiben al menos 50% de proliferación celular se evaluaron como sobrenadantes por análisis BRET en células transfectadas c-Met. Para este propósito, líneas celulares estables CHO que expresan C-Met-Rluc o C-Met-Rluc y C-Met-K1100A-YFP se generaron. Las células se distribuyeron en microplacas de 96 pocillos blancas en DMEM-F 12/FBS 5% de medio de cultivo, uno o dos días antes de experimentos BRET. Las células primero se cultivaron a 37 grados C con CO₂ al 5%, a fin de permitir conexión celular a la placa. Las células después se ayunaron con 200 µl de DMEM/pozo durante la noche. Inmediatamente antes del experimento, DMEM se retiró y las células rápidamente se lavaron con PBS. Las células se incubaron en PBS en la presencia o ausencia de anticuerpos para probarse o compuestos de referencia, 10 minutos a 37 grados C antes de la adición de coelenterazina, con o sin HGF, en un volumen final de 50 µl. Después de incubación por 10 minutos más a 37 grados C, la adquisición de emisión de luz a 485 nm y 530 nm se inició, utilizando el luminómetro Mithras (Berthold) (1s/longitud de onda/pozo repetido 15 veces).

La proporción BRET se ha definido previamente [Angers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:3684-3689] como: [(emisión a 530 nm)-(emisión a 485 nm) X Cf]/[(emisión a 485 nm)], en donde Cf corresponde a (emisión a 530 nm)/(emisión a 485 nm) para células que expresan la proteína de fusión Rluc sola en las mismas condiciones experimentales. Simplificando esta ecuación muestra que la proporción BRET corresponde a la

proporción 530/485 nm que se obtiene cuando los dos socios estuvieron presentes, corregido por una proporción 530/485 nm que se obtiene bajo las mismas condiciones experimentales, cuando solo el socio fusionado a R. reniformis luciferasa se presenta en el ensayo. Por razones de legibilidad, los resultados se expresan en unidades milliBRET (mBU); mBU corresponde a la proporción BRET multiplicada por 1000.

Después de esta segunda prueba *in vitro*, se seleccionaron 4 anticuerpos i) sin actividad intrínseca como una molécula entera en la prueba funcional de proliferación, ii) que inhiben significativamente la proliferación BxPC3 (Figuras 2A y 2B) y iii) que inhiben la dimerización de c-Met (Figura 3). Estos 3 anticuerpos del isotipo IgG1 kappa se describieron como 11E1, 224G11, 223C4 y 227H1. En los experimentos, el 5D5 Mab, generado por Genentech, y disponible en ATCC, se agregó como un control para la actividad antagonista intrínseca.

Las Figuras 2A y 2B demuestran que 11E1, 224G11, 223C4 y 227H1 estuvieron sin ninguna actividad agonista en contraste con 5D5 que induce un estímulo dependiente de dosis de proliferación celular en ausencia de ligando. Una inhibición significativa de proliferación celular se observó con los 4 anticuerpos selectos. 5D5 está sin efecto en proliferación celular inducida por HGF en esta prueba.

Cuando se evalúa para bloqueo de dimerización, se observaron significativos efectos que llegan a 32, 55, 69 y 52% de inhibición de dimerización para 224G11, 223C4, 11E1 y 227H1, respectivamente. Comparado con señales basales en los experimentos respectivos, el anticuerpo 5D5 está sin efecto en este modelo de dimerización.

Ejemplo 2: Reconocimiento de proteína por anticuerpos anti-c-Met

Para caracterizar el patrón de reconocimiento de 3 anticuerpos selectos, se han configurado 3 ELISA con la proteína c-Met recombinante, su fragmento monomérico (que se obtiene por rotura de la proteína c-Met-Fc recombinante y el dominio SEMA recombinante).

Los resultados presentados en la Figura 4, demuestran que los 4 anticuerpos reconocen tanto proteínas dimericas como monoméricas. Para realizar este ELISA, la proteína c-Met dimerica humana (R&D systems, cat# 358MT) se reviste a concentración de 0.7 µg/ml en PBS durante la noche a 4 grados C. Después de saturación de las placas (Costar #3690) con una solución de gelatina al 0.5%, 2 horas a 37 grados C, se incuban sobrenadantes de hibridoma por 1 hora a 37 grados C. Una vez enjuagado con PBS, el anticuerpo HRP anti-ratón (Jackson ImmunoResearch, # de catálogo 115-035-164) se agrega a cada pozo a una dilución de 1/5000 en amortiguador ELISA (gelatina al 0.1%/Tween 20 al 0.05% en PBS) y las placas se incubaron por 1 hora a 37 grados C. Después de 3 lavados en PBS, la actividad de la peroxidasa se revela por la adición de 50 µl de sustrato TMB (Uptima). La reacción se deja que ocurra por 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene por la adición de 50 µl/pozo de una solución H₂SO₄ 1 M y lee en un lector de placas a 450 nm. El mismo tipo de protocolo se realizó en el dominio SEMA y c-Met monomérico pero en esos casos, las proteínas se revistieron a 5 y 3 µg/ml respectivamente.

El 5D5 Mab introducido como un control positivo reconoce como se espera la proteína SEMA. 224G11, 227H1 y 223C4 no ligan al dominio SEMA. 11E1 es capaz de unirse a SEMA.

Para determinar si 11E1 y 5D5, ambos que reconocen el dominio SEMA compiten para epítopos super-puestos, se realizó análisis BIAcore. El sistema BIAcore basado en el fenómeno de resonancia Plasmon de Superficie suministra datos al supervisar eventos de enlace en tiempo real. Es entonces útil para agrupar anticuerpos en los así denominados experimentos de "cartografía de epítipo". Un par de anticuerpos incapaces de ligar al mismo tiempo en la molécula de antígeno, se clasifican en el mismo grupo (sitios de enlace idénticos o vecinos). Al contrario, cuando sus sitios de enlace respectivos están suficientemente distantes para permitir un enlace simultáneo de ambos anticuerpos, estos últimos se clasifican en dos grupos diferentes. En estos experimentos, el antígeno se emplea comúnmente como el ligando (inmovilizado en el chip-sensor) y los anticuerpos se utilizan sin marcado alguno como analitos (fase de solución).

Todos los experimentos descritos se han realizado en un instrumento BIAcore X (GE Healthcare Europe GmbH). Un chip-sensor CM5 (BIAcore) activado por un anti-Tag-6His Mab de ratón (R&D System ref. MAB050) se ha preparado siguiendo las instrucciones del fabricante al utilizar el equipo de acoplamiento amina (BIAcore). El amortiguador de corrida (HBS-EP) y el amortiguador de regeneración (Glicina, HCl) son de BIAcore. Una versión soluble recombinante del receptor HGF humano producida como una molécula quimérica c-Met-Fc-Tag His fue de R&D systems (ref. 358-MT-CF). Los experimentos se realizaron a 25 grados C, a un gasto de flujo de 30 µl/min. Una solución de 10 µg/ml de c-Met en amortiguador de corrida se inyecta durante un minuto en la célula de flujo 2 (fc2) típicamente 270 RU de la forma soluble de c-Met se capturaron. La célula de flujo (fc1) se emplea como una referencia para verificar cualquier enlace no específico de los anticuerpos a la matriz de chip-sensor.

Se realizaron unas inyecciones secuenciales de anticuerpos que deben someterse a prueba. Un anticuerpo se inyectó en ambas células de flujo durante 2 minutos. Un segundo anticuerpo (o el mismo) se inyectó después en las mismas condiciones. Si no se observa enlace significativo, se realiza una tercera inyección con otro

anticuerpo. El chip-sensor después se regenera por una sola inyección de 30 s del amortiguador de regeneración. Ya sea anticuerpos y c-Met-Fc se descargaron en esta etapa.

Análisis de los resultados:

La capacidad de un anticuerpo "A" para bloquear el enlace de un anticuerpo "B" se calcula por la proporción $BIA/C = (R2A/B/R1B) \times 100$: en donde R2A/B es la respuesta correspondiente al enlace de MAb "B" cuando se inyecta después de Mab "A" y R1B es la respuesta correspondiente al enlace de MAb "B" cuando se inyecta primero. Un BIA/C inferior a 20% significa que A es capaz de bloquear el enlace de B, de manera tal que A y B tienen sitios de enlace vecinos.

La cartografía de epítipo se ha realizado con 2 Mabs, 11E1 y 5D5.

Tabla 3

2° Ab (B) 1° Ab (A)	11E1	5d5
11E1	6,5%	84,2%
5D5	98,4%	11,0%

La visualización del enlace alrededor de 270RU de c-Met-Fc capturado por las inyecciones secuenciales de 2 minutos de Mabs 5D5 (primero), 5D5 (segundo) y 11E1 (tercero) a una concentración de 10 µg/ml, cada una demostró que 5D5 y 11E1 ligan claramente a dos sitios distantes (Figura 5A). Esta observación se confirma por la secuencia recíproca del anticuerpo (Figura 5B).

La Tabla 3 resume la proporción de cálculo obtenida con las diferentes secuencias de estos 2 anticuerpos. Valores negros (más de 75%) significan que Mab A no bloquea el enlace de Mab B. Valores en negrita/italicas (inferiores a 20%) significan que los sitios de enlace de ambos anticuerpos (A y B) son idénticos o suficientemente cercanos para inhabilitar un enlace simultáneo.

Ejemplo 3: Efecto de Mabs en fosforilación c-Met

Para determinar la actividad de anticuerpos anti-c-Met en fosforilación c-Met, un ensayo ELISA fosfo c-Met se configuró. Brevemente 500 000 células A549 se sembraron en cada pozo de placas de 6-pozos en medio F12K + FCS 10%. 16 horas antes de adición de HGF (100 ng/ml), las células se ayunaron y cada anticuerpo a probar se agregó a una concentración final de 30 µg/ml, 15 minutos antes de estímulo de ligando. 15 Minutos después de adición de HGF, amortiguador de lisis en frío se agrega, las células se rasparon y los lisados celulares se recolectaron y centrifugaron a 13 000 rpm por 10 minutos a 4 grados C. Sobrenadantes se cuantificaron con un equipo BCA (Pierce) y almacenaron a -20 grados C. Para ensayo ELISA, un anticuerpo cabra anti-c-Met (R&D ref. AF276) se utiliza como un anticuerpo de captura (revestimiento durante la noche a 4 grados C) y después de una etapa de saturación (1 h a RT) con un amortiguador TBS-BSA al 5%, 25 µg de proteína de los diferentes lisados celulares, se agregan a cada pozo de la placa de 96 pocillos. Después de un tiempo de incubación de 90 minutos a RT, las placas se lavaron cuatro veces y se agrega un anticuerpo anti-fosfo-c-Met (conejo anti-pY1230-1234-1235 c-Met). Después de 1 hora adicional de tiempo de incubación y 4 lavados, se agrega un anti-conejo-HRP (anti-rabbit-HRP) (Biosource) por 1 hora a RT y el sustrato de Luminol se agrega antes de evaluación de la luminiscencia con un dispositivo Mithras. Resultados presentados en la Figura 6B demuestran que 11E1, 224G11, 223C4 y 227H1 inhiben fosforilación c-Met por 68, 54, 80 y 65% respectivamente en comparación con 5D5 Mab que exhibe una inhibición más débil de fosforilación c-Met (42%). En esta prueba, un efecto basal débil (menor a 20%) se observa con los 4 anticuerpos candidato (Figura 6A). Como se describe en los diversos ejemplos presentados en esta patente, este efecto basal débil no tuvo consecuencias en la actividad de anticuerpos en otras pruebas *in vitro* e *in vivo*. El 5D5 empleado como control exhibió, en esta prueba un efecto basal significativo.

Ejemplo 4: Desplazamiento de HGF radio-etiquetado por anticuerpos anti-c-Met

Para determinar si los anticuerpos anti-c-Met fueron capaces de desplazar HGF, se organizaron experimentos de enlace. Brevemente, microplacas de 96 pocillos FlashPlate de proteína A (Perkin Elmer), se saturaron con gelatina al 0.5% en PBS (200 µl/pozo, 2 h a temperatura ambiente) antes de agregar c-Met-Fc recombinante (R&D Systems) como una proteína de revestimiento. Dos mil µl de una solución de 1 µg/ml de c-Met-Fc en PBS, se agregaron a cada pozo. Las placas después se incubaron durante la noche a 4 grados C. Sitios de proteína A residuales libres, se saturaron adicionalmente con hlgG no relevante (0.5 µg/pozo en PBS) por 2 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS después de cada etapa.

Para ensayos de competencia, enlace de [¹²⁵I]-HGF (actividad específica ~ 2,000 Ci/mmol) a 200 pM a c-Met inmovilizado, se midió en la presencia de concentraciones variantes de los anticuerpos monoclonales anti-c-Met 11E1, 224G11, 223C4, 227H1 o HGF (R&D Systems) en el intervalo de 0.1 pM a 1 µM en PBS pH 7.4. Las

placas se incubaron a temperatura ambiente por 6 h, después contaron en un contador de Centelleo de Microplacas - Packard Top Count Microplate Scintillation Counter. Enlace no específico se determina en la presencia de 1 μ M de HGF. El anticuerpo monoclonal 9G4, que no se dirige a c-Met pero reconoce específicamente una proteína de *E. coli*, se utiliza como control de isotipo IgG1 ratón.

El por ciento de total de enlace [125 I]-HGF específico se marcó como una función de concentración de ligando en gráficas semilog. Concentraciones de los diversos inhibidores requeridas para inhibir el enlace radioligando en 50% (IC₅₀), se determinaron gráficamente a partir de las curvas de competencia sigmoide obtenidas (Figuras 7A y 7B).

Como se esperó, HGF no radiomarcado fue capaz de desplazar completamente el enlace [125 I]-HGF a c-Met inmovilizado, mientras que el anticuerpo de control 9G4 no muestra ninguna actividad de bloqueo HGF (Figuras 7A y 7B). Anticuerpos anti-c-Met monoclonales 11E1, 224G11, 223C4 y 227H1 fueron capaces de inhibir enlace [125 I]-HGF a c-Met inmovilizado, con valores IC₅₀ de 20 nM, 3 nM, 2.7 nM y 5.8 nM, respectivamente. Los valores IC₅₀ determinados para los anticuerpos 224G11, 223C4 y 227H1 fueron comparables con el valor IC₅₀ determinado para HGF no radiomarcado, que está comprendido entre 3 y 5 nM, mientras que el anticuerpo 11E1 exhibió un valor IC₅₀ superior.

Ejemplo 5: Inhibición de invasión por anticuerpos anti-c-Met

Para evaluar el efecto inhibitorio de los anticuerpos anti-c-Met en el proceso de invasión, células A549 se revistieron en la cámara superior de cámaras de invasión BD BioCoat™ Matrigel™ (pozos con diámetro de 6.5 mm con membranas de policarbonato con pre-tamaño de 8- μ m). Células A549 se ayunaron 24 horas antes de realizar el ensayo de invasión. Después, 500 000 células A549 se revistieron en amortiguador de quimiotaxia (medio DMEM, BSA 0.1%, Hepes 12 mM) en el pozo superior de cada cámara, sobre el revestimiento de Matrigel, ya sea con o sin el anticuerpo a probar (concentración Mab final 10 μ g/ml). Después de 1 hora de incubación de las placas a 37 grados C con CO₂ al 5%, las cámaras inferiores se llenaron, ya sea con medio de crecimiento que contiene 400 ng/ml de rhHGF o con medio de crecimiento solo. Las cámaras se incubaron por 48 horas adicionales a 37 grados C con CO₂ al 5%. Al final de este tiempo de incubación, células que permanecen en la superficie superior del filtro se retiraron suavemente con una torunda de algodón, células que migraron a la superficie inferior del filtro se lisaron, tiñeron con amortiguador de tinción CyQuant GR (Invitrogen) y contaron utilizando un lector de fluorescencia Berthold Mithras LB940. Todas las condiciones se probaron como triplicados.

Como se esperó HGF induce una invasión significativa de células de tumor, comparables con la observada con FCS al 10% introducido como un control positivo (Figura 8). El IgG1 9G4 murino introducido como un control de isotipo no tiene efecto significativo en invasión inducida HGF o basal, cuando se compara con células revestidas sin IgG. No se notó efecto agonista con 11E1, 224G11, 223C4 y 227H1 cuando se agregan solos y una inhibición significativa y comparable de la invasión inducida por HGF se observa con los 3 Mabs.

Ejemplo 6: Inhibición de sanación de heridas por anticuerpos anti-c-Met

HGF estimula la movilidad. Para determinar si los anticuerpos anti-HGF fueron capaces de inhibir migración, células NCI-H441 se desarrollaron a alta densidad y se introdujo un espacio con una punta de pipeta P200. Las células después se estimularon para migrar a través del espacio con HGF (100 ng/ml), en presencia o ausencia de 11E1. pocillos con 11E1 solos, fueron también evaluados. Cada condición de prueba se evaluó como un sextuplicado y 3 experimentos independientes se realizaron. Después de una incubación durante la noche, las células se visualizaron con una Axio Vision Camera (objetivo x4).

HGF induce una migración significativa resultando en un cierre completo del espacio dentro de una noche (Figura 9). IgG1 irrelevante 9G4 empleado como un control de isotipo no tiene efecto alguno en migración celular. Como se esperó, se observó un efecto agonista con 5D5 cuando se agrega solo pero una inhibición significativa de migración celular se observa con este anticuerpo en presencia de HGF en la porción del espacio que permanece abierto. El fragmento Fab de 5D5 está sin efecto agonista cuando se agrega solo. Sin embargo, no se observa actividad de este fragmento en la presencia de HGF. Como se observa con el control de isotipo 9G4, MAb 11E1 no tuvo efecto agonista cuando se agrega solo y se comporta como un antagonista completo en la presencia de HGF.

Ejemplo 7: Ensayo de Dispersión

Células SK-HEP-1 se sembraron a baja densidad (1.10⁴ células/pozo) en una placa de 24-pozos en DMEM con FCS al 10% y desarrollan por 24 horas antes de adición, al mismo tiempo, de HGF (100 ng/ml) y los anticuerpos a probar (10 μ g/ml). Después de 72 horas de incubación, se fijaron y tiñeron colonias con violeta cristal al 0.2% en metanol y estimaron por dispersión visualmente. Cada condición probada se probó en triplicado y se realizaron 3 experimentos independientes.

La adición de HGF a células SK-HEP-1 induce una dispersión significativa de células (Figuras 10A y 10B). El anticuerpo 9G4 introducido como un control de isotipo no tiene efecto ni solo o en la presencia de HGF. Como se espera, el anticuerpo 5D5 exhibe un efecto agonista significativo solo y no se observa efecto inhibitorio cuando se agrega 5D5 con HGF (Figura 10A). No se observa efecto agonista ni con 11E1 (Figura 10A) ni con 224G11 (Figura 10B) agregados solos. Un efecto inhibitorio muy significativo de estos anticuerpos se demuestra en la presencia de HGF (Figuras 10A y 10B).

Ejemplo 8: Ensayo de Tubulogénesis Tri-dimensional

Células SK-HEP-1 se sembraron a 1.10^4 células/pozo en una placa de 24 pocillos en DMEM con FCS al 10%/Matrigel (50/50) e incubaron por 30 minutos antes de adición, al mismo tiempo, de HGF (100 ng/ml) y los anticuerpos a probar (10 µg/ml). Después de 7 días de incubación, las células se estimaron visualmente por formación de tubos. Cada condición probada se realizó como un triplicado y se efectuaron 3 experimentos independientes.

La adición de HGF induce una formación de tubo SK-HEP-1 significativa (Figura 11). El anticuerpo 9G4 introducido como un control de isotipo no tuvo efecto ni solo ni en la presencia de HGF. Como se espera, el anticuerpo 5D5 exhibe un efecto agonista significativo solo y no se observa efecto inhibitorio cuando 5D5 se agrega con HGF. No se observa efecto agonista con 11E1, 223C4 y 224G11 agregados solos y un efecto inhibitorio completo se demuestra tanto con 11E1 como 223C4, en la presencia de HGF. Una inhibición parcial pero significativa se observa con 224G11Mab.

Ejemplo 9: Formación de Esferoide

Para evaluar la capacidad de anticuerpos anti-c-Met para inhibir el crecimiento de tumor *in vitro*, en un modelo cercano a una situación *in vivo*, se generaron esferoides de células de glioblastoma humano U-87MG (ATCC # HTB-14). Las células desarrolladas como una monocapa se desprendieron con tripsina-EDTA y resuspenden en medio de cultivo celular completo (DMEM) suplementado con FBS al 10%. Se iniciaron esferoides al inocular 625 células en pocillos sencillos de fondo redondo, 96 placas en DMEM-FCS al 10%. Para impedir adhesión celular a un sustrato, las placas se prerrevistieron con polyHEMA en etanol al 95% y secaron al aire a temperatura ambiente. Las placas se incubaron bajo condiciones de cultivo celular estándar a 37 grados C, CO₂ al 5% en incubadoras humidificadas. Anticuerpos monoclonales purificados (10 µg/ml) se agregaron después de 3 y 7 días de cultivo de esferoide. HGF (400 ng/ml) se agrega una vez después de 4 días de cultivo. Los esferoides se mantienen en cultivo por al menos 10 días. Después, se supervisa crecimiento de esferoides al medir el área de esferoides utilizando un módulo de auto-medición del soporte lógico o programa axiovision. El área se expresa en µm². 8-16 esferoides se evaluaron por cada condición.

Las figuras 12A y 12B mostraron que en la presencia de FCS al 10%, no se observó estímulo cuando HGF se agrega al medio completo. Como se espera, el control de isotipo 9G4 no tiene efecto en crecimiento de esferoides. 11E1 y 223C4 reducen significativamente el crecimiento de esferoides tanto en la presencia como en la ausencia de HGF. No se observó efecto con el fragmento 5D5 Fab.

Ejemplo 10: Actividad *in vivo* de Mabs anti-c-Met en el modelo de xenoinjerto U87MG

Ratones atímicos de seis a ocho semanas de edad se alojaron en jaulas con tapa de filtro esterilizado, que se mantienen en condiciones estériles y manipulan de acuerdo con las guías francesas y europeas. U87-MG, una línea celular de glioblastoma, expresa c-Met y autocrina para el ligando HGF se selecciona para evaluaciones *in vivo*. Se inyectaron ratones subcutáneamente con 5×10^6 células. Después, seis días después de implante celular, los tumores fueron medibles (aproximadamente 100 mm³), los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con un tamaño de tumor comparable y trataron dos veces a la semana con 1 mg/dosis de cada anticuerpo a probar. Los ratones fueron seguidos para la observación de velocidad de crecimiento de xenoinjerto y cambios en peso corporal. Volumen de tumor se calcula por la fórmula: $\pi (\text{Pi})/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$.

Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 13 y demuestran que todos los anticuerpos probados inhiben significativamente el crecimiento *in vivo* de células U87-MG. El uso de un anticuerpo anti-IGF-1R neutralizante (IgG1) en el panel A, demuestra que la inhibición *in vivo* observada, se relaciona específicamente con una modulación del eje HGF-cMet.

Ejemplo 11: Actividad *in vivo* de Mabs anti-c-Met en el modelo de xenoinjerto NCI-H441

NCI-H441 se deriva de adenocarcinoma pulmonar papilar, expresa altos niveles de c-Met y demuestra fosforilación constitutiva de c-Met RTK.

Para determinar si esta línea celular expresa altos niveles de c-Met y es capaz de producir HGF, se realizaron tanto RT-PCRs cuantitativos como FACS o ELISA (Quantikine HGF; R&D systems). Para RT-PCRs cuantitativos, HGF total o niveles de expresión de transcripción cMet en líneas celulares se estimaron por PCR cuantitativo

utilizando la técnica TaqMan^{MR} estándar. Nivel de transcripción c-Met o HGF se normalizaron a la proteína Ribosomal de gen doméstico o constitutivo, grande, P0 (RPL0) y los resultados se expresan como valores de expresión normalizados (método 2-ddCT).

5 Los conjuntos o juegos de cebador/sonda para RPL0 fueron directo, 5'-gaaactctgcattctcgcttcttg-3' (SEC ID No. 47); inverso, 5'-aggactcggttgaccggtga-3' (SEC ID No. 48); y sonda, 5'-(FAM)-tgcagattggctaccaactgttgca-(TAMRA)-3' (SEC ID No. 49). Los juegos cebador/sonda para HGF fueron directo, 5'-aacaatgcctctggttcc-3' (SEC ID No. 50); inverso, 5'-ctttagctgcgtcctttac-3' (SEC ID No. 51); y sonda, 5'-(FAM)-cctcaatagcatgtcaagtggagtga-(TAMRA)-3' (SEC ID No. 52). Los juegos cebador/sonda para cMet fueron delantero, 5'-cattaaaggagacctcaccatagcta-3' (SEC ID No. 53); inverso, 5'-cctgatcgagaaaccacaacct-3' (SEC ID No. 54); y sonda, 5'-(FAM)-catgaagcgaccctctgatgtcca-(TAMRA)-3' (SEC ID No. 55). El protocolo de termociclado consistió de fundir a 50 grados C por 2 minutos y 95 grados C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95 grados C por 15 segundos y 62 grados C por 1 minuto.

15 No se encontró ARNm para HGF en NCI-H441 (Figura 14) y HGF no es detectable por ELISA en sobrenadantes de NCI-H441. En estos experimentos U87-MG, una línea celular de glioblastoma conocida como una línea celular autocrina para HGF, se introduce como un control positivo. El análisis RT-PCR mostró un nivel significativo de ARNm de HGF en U87-MG y 1.9 ng de HGF/millón de células se detectan en el sobrenadante de células U87-MG. Tanto análisis cuantitativo RT-PCRs como FACS Figuras 15A y 15B, demostró que como se esperaba células NCI-H441 sobre expresan significativamente c-Met y que esta expresión fue dramáticamente superior a la observada para células U87-MG. En este experimento, la línea celular MCF-7 se introduce como un control negativo. Tomado en conjunto NCI-H441 aparece como una línea celular no autocrina activada en forma constitutiva, capaz de desarrollar independientemente de ligando HGF en donde una dimerización independiente de ligando de c-Met ocurre como una consecuencia de la sobreexpresión del receptor.

25 La evaluación de anticuerpos anti-c-Met en la actividad *in vivo* de esta línea celular no autocrina puede dar lugar a ciertas percepciones respecto a su potencia para impactar en dimerización de c-Met.

30 La Figura 16 demuestra que 224G11, 11E1 y 227H1 inhiben significativamente el crecimiento *in vivo* de NCI-H441, sugiriendo que además de inhibición dependiente de ligando, estos anticuerpos capaces de inhibir dimerización, son también capaces de hacer blanco a una inhibición independiente de ligando de c-Met. Como se mencionó anteriormente, en la memoria, con esa última propiedad 224G11, 11E1 y 227H1 se muestran diferentes del anticuerpo anti-c-Met 5D5 de un brazo (OA-5D5).

35 **Ejemplo 12: Proceso de humanización por injerto-CDR del anticuerpo 224G11**

I - Humanización del dominio variable de cadena ligera

Comparación de la secuencia de nucleótidos de 224G11VL con genes de células germinales murinos

40 Como una etapa preliminar, la secuencia de nucleotídica de 224G11 VL se comparó con las secuencias de genes de células germinales bovinas parte de la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

45 Los genes de células germinales IGKV3-5*01 y IGKJ4*01 murinos con una identidad de secuencia de 99.31% para la región V y 94.28% para la región J, respectivamente, se han identificado. Respecto a la identidad obtenida, se ha decidido utilizar directamente las secuencias 224G11VL para buscar homologías humanas.

Estos alineamientos se representan en las Figuras 17A para el gen V y 17B para el gen J.

Comparación de la secuencia de nucleótidos de 224G11VL con los genes de células germinales humanas

50 A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, se ha buscado el gen de células germinales humanas que exhibe la mejor identidad con 224G11VL. Para este objetivo, la secuencia de nucleótidos de 224G11VL se ha alineado con las secuencias de genes de células germinales humanas parte de la base de datos IMGT. Para optimización de la selección, alineamientos entre las secuencias de proteína se realizaron para buscar mejores homologías.

55 Estos dos métodos complementarios llevaron a la identificación de dos secuencias V humanas receptoras posibles para las 224G11 VL CDRs murinas. Alineamiento de nucleótidos da a los genes de células germinales IGKV3- 11*01 humanas con una identidad de secuencia de 75.99% mientras que el alineamiento de proteína da a los genes de células germinales IGKV4-1*01 humanas con una identidad de secuencia de 67.30%. Debe apreciarse que en ambos casos, los dos genes de células germinales más cercanos y las secuencias analizadas muestran diferentes longitudes de aminoácidos CDR1 (10 aminoácidos en 224G11 VL; 6 aminoácidos en IGKV3-11*01; 12 aminoácidos en IGKV4-1*01).

65 Para la región J, la mejor calificación de homología se obtuvo primero con IGKJ3*01 humano que muestra una

identidad de secuencia de 80%. Pero un número superior de nucleótidos idénticos consecutivos y mejor ajuste de aminoácidos se ha encontrado en el alineamiento con el gen de células germinales IGKJ4*02 humanas (identidad de secuencia de 77.14%). De esta manera, se elige el gen de células germinales IGKJ4*02 que recibe la región J humana para los 11E1 VL CDRs murinos.

5

Los alineamientos se representan en las Figuras 18A para la región V y 18B para la región J.

Versión humanizada de 224G11 VL

10 Dada la posibilidad de dos regiones V humanas receptoras para las 224G11 VL CDRs murinas, dos versiones humanizadas del dominio 224G11 se describirán. La primera corresponde a una prueba inicial para un marco humano con una longitud CDR1 más corta (IGKV3-11*01), la segunda con una longitud de CDR1 más larga (IGKV4-1*01).

15 a) Versión humanizada basada en IGKV3-11*01 de 224G11 VL

Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en enlazar las secuencias de genes de células germinales selectas IGKV3-11*01 y IGKJ4*02 y también las CDR de 224G11 VL murino con los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

20

Como se ilustra en la Figura 19A, los residuos en negrita en la secuencia 224G11 VL corresponden a los veinticinco aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio de 224G11 VL y los fragmentos humanos selectos (FR humano, es decir IGKV3-11*01 y IGKJ4*02).

25 Respecto a los varios criterios tales como su participación conocida en la interfase VH/VL, en enlace de antígeno o en la estructura CDR, la clase de aminoácidos cambia entre los residuos murinos y humanos, localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, tres de los veinticinco residuos diferentes se han identificado para mutar eventualmente. Estos tres residuos definidos más importantes y mutaciones en sus contra-partes humanas son M39 murino en L humano, H40 en A y R84 en G. Estos residuos con rango uno se muestran en la
30 Figura 19a, como residuos en negrita en la secuencia 224G11 HZIVL en donde permanecen murinos.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse no se limitan pero deben considerarse como mutaciones preferidas.

35 Con el auxilio de un modelo molecular, otras mutaciones pueden ser identificadas. Pueden mencionarse los siguientes residuos con rango dos, es decir los residuos 15 (L/P), 49 (P/A), 67 (L/R), 68 (E/A), 93 (P/S) y 99 (V/F) en los que las mutaciones también pueden concebirse en otra forma de realización preferida.

40 Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse eventualmente, no se limitan pero deben considerarse como mutaciones preferidas. En otra forma de realización preferida, todos los otros dieciséis residuos rango tres entre los veinticinco diferentes aminoácidos, pueden ser reconsiderados.

Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se probarán individualmente o de acuerdo con diversas combinaciones.

45

La Figura 19A representa el 224G11 VL humanizado con base en IGKV3-11*01 implementado con las mutaciones anteriormente mencionadas claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará la mutación.

50 b) Versión humanizada basada en IGKV4-1*01 de 224G11 VL

Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en enlazar las secuencias de genes de células germinales selectas IGKV4-1*01 y IGKJ4*02 y también las CDR de la 224G11 VL murina a los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

55

Como se ilustra en la Figura 19B, los residuos en negrita en la secuencia 224G11 VL corresponden a veintidós aminoácidos que encontraron diferentes entre el dominio de 224G11 VL y los fragmentos humanos selectos (FR humano, es decir IGKV4-1*01 y IGKJ4*02).

60 Respecto a los varios criterios tales como su participación conocida en la interfase VH/VL, el enlace de antígeno o en estructura CDR, la clase de aminoácidos cambia entre los residuos murinos y humanos, la localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, cuatro de los veintidós residuos diferentes se han identificado eventualmente mutados. Estos cuatro residuos definidos más importantes y mutaciones en sus contra-partes humanas son el L4 murino en M humano, M39 en L, H40 en A y R84 en G. Estos residuos de rango uno se muestran en la Figura 19B como residuos en negrita en la secuencia 224G11 HZ2VL en donde permanecen murinos.
65

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse, no se limitan pero deben considerarse como mutaciones preferidas.

- 5 Con el auxilio de un modelo molecular, pueden identificarse otras mutaciones. Pueden mencionarse los siguientes residuos rango dos, es decir residuos 25 (A/S), 66 (N/T), 67 (L/R), y 93 (P/S) en donde mutaciones también pueden ser concebidas en otra forma de realización preferida.

- 10 Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse eventualmente no se limitan pero deben considerarse como mutaciones preferidas. En otra forma de realización preferida, todos los otros catorce residuos rango tres entre los veintidós diferentes aminoácidos pueden ser reconsiderados.

- 15 Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se probarán individualmente o de acuerdo con diversas combinaciones.

La Figura 19B representa la 224G11 VL humanizada con base en IGKV4-1*01, con las mutaciones anteriormente mencionadas previamente identificadas con mutaciones anteriormente mencionadas claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará dicha mutación.

20 II - Humanización del dominio variable de cadena pesada

Comparación de la secuencia de nucleótidos de 224G11 VH con genes de células germinales murinos

- 25 Como una etapa preliminar, la secuencia de nucleótidos de 224G11 VH se compara con las secuencias de genes de células germinales murinas parte de la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

- 30 Los genes de células germinales IGHV1-18*01, IGHD2-4*01 y IGHJ2*01 murinos con una identidad de secuencia de 92.70% para la región V, 75.00% para la región D y 89.36% para la región J, respectivamente, se han identificado. Respecto a la identidad obtenida, se ha decidido el utilizar directamente las secuencias 224G11 VH para buscar homologías humanas.

Estos alineamientos se representan en las Figuras 20A para el gen V, 20B para el gen D y 20C para el gen J.

Comparación de la secuencia de nucleótidos de 224G11 VH con los genes de células germinales humanas

- 35 A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, el gen de célula germinal humana que exhibe la mejor identidad con 224G11 VH se ha buscado. Para este objetivo, la secuencia de nucleótidos 224G11 VH se ha alineado con las secuencias de genes de células germinales humanas parte de la base de datos IMGT. Para optimización de la selección, se hicieron alineamientos entre las secuencias de proteína para buscar mejores homologías.

- 40 Estos dos métodos complementarios llevaron a la identificación de la misma secuencia IGHV1-2*02 V humana receptora para las 224G11 VH CDRs murinas con una identidad de secuencia de 75.00% al nivel de nucleótidos y 64.30% a nivel protéico.

- 45 Vale la pena apreciar que la región D pertenece estrictamente a la región CDR3 en el dominio VH. El proceso de humanización se basa en un enfoque de "injerto CDR". Análisis de los genes D humanos más cercanos no es útil en esta estrategia.

- 50 Buscando homologías para la región J lleva a la identificación del gen de célula germinal IGHJ4*04 humano con una identidad de secuencia de 78.72 %.

El gen de célula germinal IGHV1-2*02 V humano y el gen de célula germinal IGHJ4*01 J humano, de esta manera se han seleccionado como las secuencias humanas receptoras para las 224G11 VH CDRs murinas.

- 55 Los alineamientos se representan en las Figuras 21A para la región V y 21B para la región J.

Versión humanizada de 224G11 VH

- 60 Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en enlazar las secuencias de genes de células germinales selectas IGHV1-2*02 y IGHJ4*01 y también las CDRs del 224G11 VH murino con los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

- 65 Como se ilustra en la Figura 22, los residuos en negrita en la secuencia 224G11 VH corresponden a los treinta aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 224G11 VH y los fragmentos humanos selectos (RF humano, es decir IGHV1-2*02 y IGHJ4*01).

Respecto a los varios criterios tales como su conocida participación en la interfase VH/VL, en enlace de antígeno o en la estructura CDR, la clase de aminoácidos cambia entre residuos murinos y humanos, la localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, cuatro de los treinta diferentes residuos se han identificado mutados eventualmente. Estos cuatro residuos definidos más importantes y mutaciones en sus contra-partes humanas son D51 murino en E humano, G55 en W, V80 en R y K82 en T. Estos residuos rango uno se muestran en la Figura 22, como residuos en negrita en la secuencia 224G11 HZVH en donde permanecen murinos.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados que deben someterse a prueba no están limitados sino que deben ser considerados como mutaciones preferidas.

A partir de un modelo molecular, pueden identificarse otras mutaciones. Pueden mencionarse los siguientes residuos rango dos, es decir los residuos 25 (T/A), 48 (E/Q), 49 (S/G), 53 (I/M), 76 (A/V), 78 (L/M) y 90 (D/E), en donde mutaciones también pueden ser concebidas en otra forma de realización preferida.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados que deben someterse a prueba eventualmente, no están limitados pero deben considerarse como mutaciones preferidas. En otra forma de realización preferida, todos los otros diecinueve residuos rango tres entre los treinta diferentes aminoácidos pueden ser reconsiderados.

Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se probarán individualmente o de acuerdo con diversas combinaciones.

La Figura 22 representa la 224G11 VH humanizada con las mutaciones anteriormente mencionadas, claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará dicha mutación.

Ejemplo 13: Proceso de humanización por injerto CDR del anticuerpo 227H1

I - Humanización del dominio variable de cadena ligera

Comparación de la secuencia de nucleótidos de 227H1 VL con los genes de células germinales murinas.

Como una etapa preliminar, la secuencia de nucleótidos de 227H1 VL se comparó con las secuencias de genes de células germinales murinas parte de la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Los genes de células germinales IGKV3-5*01 y IGKJ4*01 murinas con una identidad de secuencia de 96.90% para la región V y 97.29% para la región J, respectivamente, se han identificado. Respecto a la identidad obtenida, se ha decidido emplear directamente las secuencias 227H1 VL para buscar homologías humanas.

Estos alineamientos se representan en las Figuras 23A para el gen V y 23B para el gen J.

Comparación de la secuencia de nucleótidos de 227H1 VL con los genes de células germinales humanas.

A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, se ha buscado el gen de célula germinal humano que exhibe la mejor identidad con 227H1 VL. Para este objetivo, la secuencia de nucleótidos de 227H1 VL se ha alineado con las secuencias de genes de células germinales humanas parte de la base de datos IMGT. Para optimización de la selección, se realizaron alineamientos entre secuencias de proteína para buscar mejores homologías.

Estos dos métodos complementarios llevaron a la identificación de dos secuencias V humanas receptoras posibles para las 227H1 VL CDRs murinas. Los alineamientos de nucleótidos proporcionan al gen de célula germinal IGKV3-11*01 humana con una identidad de secuencia de 74.91%, mientras que el alineamiento de proteína proporciona al gen de célula germinal IGKV4-1*01 humana con una identidad de secuencia de 64.00%. Debe apreciarse que en ambos casos, estos dos genes de células germinales más cercanos y las secuencias analizadas muestran diferentes longitudes de aminoácidos CDR1 (10 aminoácidos en 227H1 VL; 6 aminoácidos en IGKV3-11*01; 12 aminoácidos en IGKV4-1*01).

Para la región J, la mejor calificación de homología se obtuvo primero con el IGKJ3*01 humano que muestran una identidad de secuencia de 78.38%. Pero un número superior de nucleótidos idénticos consecutivos y un mejor ajuste de aminoácidos se han encontrado en el alineamiento con el gen de células germinales IGKJ4*02 humano (identidad de secuencia de 75.68%). De esta manera, el gen de células germinales IGKJ4*02 se selecciona como la región J humana receptora para las 227H1 VL CDRs murinas.

Los alineamientos se representan en las Figuras 24A para la región V y 24B para la región J.

Versión humanizada de 224G11 VL

Dada la posibilidad de dos regiones V humanas receptoras para las 227H1 VL CDRs murinas, se describirán dos versiones humanizadas del dominio 227H1 VL. La primera corresponde a una prueba inicial para un marco humano con una longitud CDR1 más corta (IGKV3-11*01), la segunda con una longitud CDR1 más larga (IGKV4-1*01).

a) Versión humanizada de 227H1 VL basada en IGKV3-11*01

Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en enlazar las secuencias de genes de células germinales selectas IGKV3-11*01 e IGKJ4*02 y también las CDRs del 227H1 VL murino con los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

Como se ilustra en la Figura 25A, los residuos en negrita en la secuencia 227H1 VL corresponden a los veintiséis aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 227H1 VL y los fragmentos humanos selectos (FR humano, es decir IGKV3-11*01 y IGKJ4*02).

Respecto a los varios criterios tales como su conocida participación en la interfase VH/VL, en enlace de antígeno o en estructura CDR, la clase de aminoácidos cambia entre los residuos murinos y humanos, localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, tres de los veintiséis residuos diferentes se han identificado como eventualmente mutados. Estos tres residuos más importantes definidos y mutaciones en sus contra-partes humanas son 139 murino en L humano, H40 en A y R84 en G. Estos residuos de rango uno se muestran en la Figura 25A como residuos en negrita en la secuencia 227H1 HZ1VL en donde permanecen murinos.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados que deben someterse a prueba no están limitados sino que deben considerarse como mutaciones preferidas.

Con el auxilio de un modelo molecular, pueden identificarse otras mutaciones. Pueden mencionarse los siguientes residuos rango dos, es decir residuos 15 (L/P), 25 (V/A), 49 (P/A), 67 (L/R), 68 (E/A), 93 (P/S) y 99 (S/F) en donde las mutaciones también pueden concebirse en otra forma de realización preferida.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados que deben someterse a prueba eventualmente, no están limitados sino que deben ser considerados como mutaciones preferidas. En otra forma de realización preferida, pueden reconsiderarse todos los otros dieciséis residuos rango tres entre los veinticinco diferentes aminoácidos.

Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se probarán en forma individual o de acuerdo con diversas combinaciones.

La Figura 25A representa el 227H1 V1 humanizado basado en IGKV3-11*01 implementado con las mutaciones anteriormente mencionadas claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará dicha mutación.

b) Versión humanizada de 227H1 VL basada en IGKV4-1*01

Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en ligar las secuencias de genes de células germinales selectas IGKV4-1*01 y IGKJ4*02 y también las CDR del 227H1 VL murino con los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

Como se ilustra en la Figura 25B, los residuos en negrita en la secuencia 227H1 VL corresponden a los veinticuatro aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 227H1 VL y los fragmentos humanos selectos (FR humano, es decir IGKV4-1*01 y IGKJ4*02).

Respecto a los varios criterios tales como su conocida participación en la interfase VH/VL, en enlace de antígeno o en la estructura CDR, la clase de aminoácidos cambia entre los residuos murinos y humanos, localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, cuatro de los veinticuatro diferentes residuos se han identificado mutados eventualmente. Estos cuatro residuos más importantes definidos y mutaciones en sus contra-partes humanas son L4 murino en M humano, 139 en L, H40 en A y R84 en G. Estos residuos rango uno se muestran en la Figura 25B como residuos en negrita en la secuencia 227H1 HZ2VL en donde permanecen murinos.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados que deben someterse a prueba no están limitados sino que deben ser considerados como mutaciones preferidas.

Con el auxilio de un modelo molecular, pueden identificarse otras mutaciones. Pueden mencionarse los siguientes residuos rango dos, es decir los residuos 25 (V/S), 66 (N/T), 67 (L/R) y 93 (P/S) en los que las mutaciones también pueden concebirse en otra forma de realización preferida.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados que van a someterse a prueba eventualmente no están limitados sino que deben ser considerados como mutaciones preferidas. En otra forma de realización preferida, todos los dieciséis otros residuos rango tres entre los veintidós aminoácidos diferentes pueden ser reconsiderados.

5 Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se probarán individualmente o de acuerdo con diversas combinaciones.

10 La Figura 25B representa el 227H1 VL humanizado con base en IGKV4-1*01 implementado con las mutaciones anteriormente mencionadas claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará dicha mutación.

II - Humanización del dominio variable de cadena pesada

15 Comparación de la secuencia de nucleótidos de 227H1 VH con los genes de células germinales murinas

Como una etapa preliminar, la secuencia de nucleótidos de 227H1 VH se compara con la secuencias de genes de células germinales murinas parte de la base de datos IMGT (<http://imgt.ciiies.fr>).

20 Genes de células germinales IGHV1-18*01, IGHD1-1*02 e IGHJ2*01 murinas con una identidad de secuencia de 92.70% para la región V, 63.63% para la región D y 91.48% para la región J, respectivamente, se han identificado. Respecto a la identidad obtenida, se ha decidido usar directamente las secuencias 227H1 VH para buscar homologías humanas.

25 Estos alineamientos se representan en las Figuras 26A para el gen V, 26B para el gen D y 26C para el gen J.

Comparación de la secuencia de nucleótidos de 227H1 VH con los genes de células germinales humanas

30 A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto de CDR, se ha buscado el gen de célula germinal humana que exhibe la mejor identidad con 224G11 VH. Para este objetivo, la secuencia de nucleótidos de 227H1 VH se ha alineado con las secuencias de genes de células germinales humanas parte de la base de datos IMGT. La secuencia IGHV1- 2*02 V humana receptora para las 224G11 VH CDRs murinas con una identidad de secuencia de 72.92% de esta manera se identificó.

35 Debe apreciarse que la región D pertenece estrictamente a la región CDR3 en el dominio VH. El proceso de humanización se basa en un enfoque de "injerto CDR". El análisis de los genes D humanos más cercanos no es útil en esta estrategia.

40 Buscando homologías para la región J lleva a la identificación del gen de célula germinal IGHJ4*01 humana con una identidad de secuencia de 78.72%.

El gen de células germinales IGHV1-2*02 V humanas y el gen de células germinales IGHJ4*01 J humanas de esta manera se han seleccionado como las secuencias humanas receptoras para las 227H1 VH CDRs murinas.

45 Los alineamientos se representan en las Figuras 27A para la región V y 27B para la región J.

Para optimización de la selección, el experto en la materia también puede realizar alineamientos entre las secuencias de proteína a fin de ayudarles en la selección.

50 Versión humanizada de 227H1 VH

Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en enlazar las secuencias de genes de células germinales selectas IGHV1-2*02 y IGHJ4*01 y también las CDRs del 227H1 VH murino con los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

55 Como se ilustra en la Figura 28, los residuos en negrita en la secuencia 227H1 VH corresponden a los treinta y dos aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 227H1 VH y los fragmentos humanos selectos (FR humano, es decir IGHV1-2*02 y IGHJ4*01).

60 Respecto a los varios criterios tales como su participación conocida en la interfase VH/VL, en enlace de antígeno o en estructura CDR, la clase de aminoácidos cambia entre los residuos murinos y humanos, localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, seis de los treinta y dos residuos diferentes se han identificado mutados eventualmente. Estos seis residuos más importantes definidos y mutaciones en sus contra-partes humanas son L39 murino en M humano, N40 en H, L55 en W, T66 en N, V80 en R y K82 en T. Estos residuos rango uno, se muestran en la Figura 28 como residuos en negrita en la secuencia 227H1 HZVH en donde permanecen murinos.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse no están limitados sino deben considerarse como mutaciones preferidas.

5 Con el auxilio de un modelo molecular, pueden identificarse otras mutaciones. Pueden mencionarse los siguientes residuos rango dos, es decir los residuos 48 (K/Q), 49 (T/G), 53 (I/M), 76 (A/V) y 78 (L/M) en donde las mutaciones también pueden conceptuarse en otra forma de realización preferida.

10 Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados que deben someterse a prueba eventualmente no están limitados sino que deben ser considerados como mutaciones preferidas. En otra forma de realización preferida, todos los veintidós otros residuos rango tres entre los treinta diferentes aminoácidos pueden ser reconsiderados.

15 Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se someten a prueba individualmente o de acuerdo con diversas combinaciones.

La Figura 28 representa el 227H1 VH humanizado con las mutaciones anteriormente mencionadas, claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará dicha mutación.

20 **Ejemplo 14: Proceso de humanización por injerto CDR del anticuerpo 223C4**

I - Humanización del dominio variable de cadena ligera

Comparación de la secuencia de nucleótidos de 223C4 VL con los genes de células germinales murinas

25 Como una etapa preliminar, la secuencia de nucleótidos de 223C4 VL, se comparó con las secuencias de genes de células germinales murinas parte de la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr>) .

30 Los genes de células germinales IGKV12-46*01 y IGKJ2*01 murinas con una identidad de secuencia de 99.64% para la región V y 94.59% para la región J, respectivamente, se han identificado. Respecto a la identidad obtenida, se ha decidido el utilizar directamente las secuencias 223C4 VL para buscar homologías humanas.

Estos alineamientos se representan en las Figuras 29A para el gen V y 29B para el gen J.

35 Comparación de la secuencia de nucleótidos de 223C4 VL con genes de células germinales humanas

A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, se ha buscado el gen de célula germinal humana que exhibe la mejor identidad con 223C4 VL. Para este objetivo, la secuencia de nucleótidos de 223C4 VL se ha alineado con las secuencias de genes de células germinales humanas parte de la base de datos IMGT.

40 Los genes de células germinales IGKV1-NL1*01 y IGKJ2*01 humanas con identidad de secuencia de 78.49% para la región V y 81.08% para la región J, respectivamente se han identificado. Los genes de células germinales IGKV1-NL1*01 para la región V y IGKJ2*01 para la región J de esta manera se han seleccionado como secuencias humanas receptoras para las 223C4 VL CDRs murinas.

45 Los alineamientos se representan en las Figuras 30A para la región V y 30B para la región J.

Para optimización de la selección, el experto en la materia también puede realizar alineamientos entre las secuencias de proteína a fin de ayudarle en la selección.

50 Versión humanizada de 223C4 VL

Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en enlazar las secuencias de genes de células germinales selectas IGKV1-NL1*01 y IGKJ2*01 y también las CDRs de 223C4 VL murinos a los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

55 En esta etapa de proceso, un modelo molecular de dominios Fv murinos 223C4 puede desarrollarse y es útil en la selección de los residuos murinos que deben conservarse debido a sus papeles en el mantenimiento de la estructura tri-dimensional de la molécula o en el sitio de enlace y función de antígeno. Más particularmente, 9 residuos que deben mutar, eventualmente se han identificado.

En una primera etapa, se someten a prueba los residuos involucrados en las anclas CDR o estructura. Estos residuos son el residuo 66 (R/N) y el residuo 68 (E/V).

65 En una segunda etapa, los residuos expuestos a solvente, y como tales que pueden involucrar inmunogenicidad, también se someten a prueba. Estos son los residuos 49 (A/S), 51 (K/Q), 69 (S/D), 86 (D/Q) y 92 (S/N).

Después, en una tercera etapa, los residuos involucrados en estructura/plegamiento de dominio variable también pueden mutarse. Estos residuos son el residuo 46 (P/Q) y el residuo 96 (P/S).

- 5 Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados que deben someterse a prueba no están limitados pero deben considerarse como mutaciones preferidas.

10 Con el auxilio de un modelo molecular, otras mutaciones pueden ser identificadas. Pueden mencionarse los siguientes residuos, es decir los residuos 9 (S/A), 13 (A/V), 17 (D/E), 18 (R/T), 54 (L/V), 88 (T/S), 90 (T/K), 100 (A/G) y 101 (T/S), en los que las mutaciones también pueden concebirse en otra forma de realización preferida.

Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se someten a prueba individualmente o de acuerdo con diversas combinaciones.

- 15 La Figura 31 representa 223C4 VL humanizado con las mutaciones anteriormente mencionadas claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el que se realizará la mutación.

II - Humanización del dominio variable de cadena pesada

20 Comparación de la secuencia de nucleótidos de 223C4 VH con genes de células germinales murinas

Como una etapa preliminar, la secuencia de nucleótidos de 223C4 VH se comparó con las secuencias de genes de células germinales murinas parte de la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

- 25 Los genes de células germinales IGHV1-18*01, IGHD6-3*01 y IGHJ4*01 murinas con una identidad de secuencia de 98.95% para la región V, 72.72% para la región D y 98.11% para la región J, respectivamente, se han identificado. Respecto a la identidad obtenida, se ha decidido el utilizar directamente las secuencias 223C4 VH para buscar homologías humanas.

- 30 Estos alineamientos se representan en las Figuras 32A para el gen V, 32B para el gen D y 32C para el gen J.

Comparación de la secuencia de nucleótidos de 223C4 VH con los genes de células germinales humanas

- 35 A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, el gen de célula germinal humana que exhibe la mejor identidad con 223C4 VH se ha buscado. Para este objetivo, la secuencia de nucleótidos de 223C4 VH se ha alineado con las secuencias de genes de células germinales humanas parte de la base de datos IMGT.

- 40 Los genes de células germinales IGHV1-2*02, IGHD1-26*01 y IGHJ6*01 humanas con una identidad de secuencia de 76.38% para la región V, 75.00% para la región D y 77.41% para la región J, respectivamente, se han identificado. Los genes de células germinales IGHV1-2*02 para la región V y IGHJ6*01 para la región J, de esta manera se han seleccionado que reciben las secuencias humanas para las 223C4 VH CDRs murinas.

- 45 Los alineamientos se representan en las Figuras 33A para la región V, 33B para la región D y 33C para la región J.

Para optimización de la selección, el experto en la materia también puede hacer alineamientos entre las secuencias de proteína a fin de ayudarse en la selección.

Versión humanizada de 223C4 VH

- 50 Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en enlazar las secuencias de genes de células germinales selectas IGHV1-2*02 y IGHJ6*01 y también las CDR de 223C4 VH murino a los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

- 55 En esta etapa del proceso, un modelo molecular de los dominios Fv murinos 223C4 puede desarrollarse y es útil en la selección de los residuos murinos que deben conservarse debido a sus papeles en el mantenimiento de la estructura tri-dimensional de la molécula o en la función y sitio de enlace de antígeno. Más particularmente, se han identificado 14 residuos que deben mutar eventualmente.

- 60 En una primera etapa, se probarán residuos involucrados en la estructura o anclas CDR. Estos residuos son los residuos 40 (H/D), 45 (A/S), 55 (W/D), 66 (N/I) y 67 (Y/F).

En una segunda etapa, residuos expuestos a solvente, y como tal que pueden involucrar inmunogenicidad, también se someten a prueba. Estos son los residuos 1 (Q/E), 3 (Q/L), 5 (V/Q), 48 (Q/M) y 80 (R/V).

- 65 Después, en una tercera etapa, residuos involucrados en estructura/plegamiento de dominio variable también

pueden mutarse. Estos son los residuos 9 (A/P), 13 (K/V), 22 (S/P) y 46 (P/H).

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados que se deben someter a prueba, no son limitados sino deben ser considerados como mutaciones preferidas.

Con el auxilio de un modelo molecular, pueden identificarse otras mutaciones. Pueden mencionarse los siguientes residuos, es decir los residuos 12 (V/L), 21 (V/I), 43 (R/K), 49 (G/S), 53 (M/I), 68 (A/N), 72 (Q/K), 75 (R/K), 76 (V/A), 78 (M/L), 82 (T/K), 84 (I/S), 92 (S/R), 93 (R/S), 95 (R/T) y 97 (D/E), en los cuales mutaciones también pueden concebirse en otra forma de realización preferida.

Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se someten a prueba individualmente o de acuerdo con diversas combinaciones.

La Figura 34 representa el 223C4 VH humanizado con las mutaciones anteriormente mencionadas claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará la mutación.

Ejemplo 15: Actividad anti-tumor de 224G11 MAb murina sola o combinada con el agente quimioterápico Navelbine® en el modelo de tumor NCI-H441 de xenoinjerto establecido

Los enfoques quimioterápicos exitosos dependen en parte de la respuesta celular a inductores apoptóticos y el balance entre las rutas pro- y anti-apoptótica dentro de la célula. El efecto protector de c-Met activado en supervivencia celular se ha documentado. Primordialmente resulta de una expresión incrementada de la proteína Bcl-2 y Bcl-x1 anti-apoptótica como consecuencia de señalización mediada por PI3-K que a su vez inhibe la apoptosis dependiente mitocondrial (caspasa 9). Sin duda, se concibe que el sistema HGF/c-Met con su efecto regulatorio marcado en proceso apoptótico también puede influenciar la quimiosensibilidad de células de cáncer. Esta hipótesis como se ha probado con Navelbine®, un agente quimioterápico comercializado utilizado para tratamiento de cáncer pulmonar (Aapro *et al.*, Crit.Rev.Oncol.Hematol. 2001, 40:251-263; Curran *et al.*, Drugs Aging. 2002, 19:695-697). El modelo NCI-H441 NSCLC de xenoinjerto se utiliza ya que se ha descrito previamente que esta línea celular es sensible tanto a Navelbine (Kraus-Berthier *et al.*, Clin.Cancer Res., 2000; 6:297-304) como a terapia que dianiza c-Met (Zou H. T. *et al.*, Cancer Res. 2007, 67: 4408-4417).

Brevemente, las células NCI-H441 de ATCC se cultivaron rutinariamente en medio RPMI 1640, FCS al 10% y L-Glutamina al 1%. Las células se dividieron dos días antes de inserción o injerto prendido, de manera tal que estuviera en la fase de crecimiento exponencial. Diez millones de células NCI-H441 se injertaron en PBS a ratones desnudos Swiss de 7 semanas de edad. Tres días después del implante, se midieron tumores y los animales se dividieron en 4 grupos de 6 ratones con tamaño de tumor comparable. Los ratones se trataron i.p. con una dosis de carga de 2 mg de 224G11/ratón y después dos veces por semana por 43 días, con 1 mg de anticuerpo/ratón. 9G4 MAb se utilizó como un control de isotipo.

El Navelbine® se suministró por inyecciones i.p. a una dosis de 8 mg/kg los días 5, 12, 19 post-inyección de célula. Para terapia combinada tanto 224G11 como Navelbine®, los dos compuestos se administraron por separado. En este experimento, los 2 compuestos se utilizaron en sus dosis óptimas. El volumen de tumor se midió dos veces a la semana y calculó por la fórmula: $p/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$.

La Figura 35 demuestra que 224G11 es tan eficiente como Navelbine® cuando se utiliza como una terapia de un agente solo. Un beneficio significativo de combinar ambas terapias se observa con regresiones completo de tumor observadas en 3 de 6 ratones al día 63.

Ejemplo 16: Inhibidores de c-Met y angiogénesis

Además de su papel directo en la regulación de una variedad de funciones de células de tumor, la activación de c-Met también se ha implicado en angiogénesis de tumor. Las células endoteliales expresan c-Met y HGF estimula el crecimiento celular endotelial, invasión y movilidad (Nakamura Y. *et al.*, Biochem. Biophys. Res., Commun. 1995, 215:483-488; Bussolino F. *et al.*, J. Cell Biol. 1992, 119:629-641). La regulación coordinada de crecimiento, invasión y movilidad en células endoteliales vasculares por HGF/c-Met, se ha demostrado que resulta en la formación de tubos endoteliales capilares 3D *in vitro* (Rosen E. M. *et al.*, Supplementum to Experientia 1991, 59:76-88).

Para determinar una interferencia potencial de Mabs anti-c-Met con angiogénesis inducida por HGF, dos juegos de experimentos se realizaron incluyendo i) la evaluación de MAb en proliferación HUVEC y ii) la prueba de MAb de formación de tubo HUVEC.

Para experimentos de proliferación, 7500 HUVEC se revistieron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos previamente revestida con laminina. Células se desarrollaron 24 horas del medio de ensayo EMB-2 suplementado con FBS 0.5% y heparina. Después, MAb a probar (0.15 a 40 µg/ml) se agregaron por 1 hora antes de adición de 20 ng/ml de HGF. Después de 24 horas adicionales, las células se pulsaron con 0.5 µCi de

[³H] Timidina. La magnitud de [³H] Timidina incorporada se cuantificó por conteo de centelleo de líquido. En este experimento, 9G4 MAb es un anticuerpo irrelevante empleado como un control de isotipo IgG1.

5 Los resultados expresados como datos en bruto en la Figura 36 demuestran que, como se esperó HGF es un inductor potencial de crecimiento celular HUVEC. Anticuerpos evaluados en la ausencia HGF no exhiben ninguna actividad proliferativa agonista en HUVEC cualquiera que sea la dosis probada. En presencia de HGF, una inhibición dependiente de dosis dramática se observa para ambas 11E1 y 224G11 MABs.

10 Para la evaluación de formación de tubo HUVEC, 25000 células incubadas 30 minutos con anticuerpos a probar, se revistieron en placas de 48 pocillos revestidas con matrigel. Después HGF 50 ng/ml se agrega y las placas se incubaron a 37 grados C. Medio después se recolecta y CMFDA 5 µM se agrega por 15 minutos antes de observar al microscopio.

15 Los resultados mostrados en la Figura 37 demuestran que como se espera HGF induce una formación de tubo significativa. El anticuerpo 9G4 introducido como un control de isotipo IgG1 no tuvo efecto alguno en formación de tubo inducida por HGF mientras que tanto 11E1 como 224G11 inhiben formación de tubo dramáticamente.

Ejemplo 17: Proceso de humanización por injerto CDR del anticuerpo 11E1

20 I - Humanización del dominio variable de cadena ligera

Comparación de la secuencia de nucleótidos de 11E1 VL con genes de células germinales murinas

25 Como una etapa preliminar, la secuencia de nucleótidos de 11E1 VL se comparó con la parte de secuencias de genes de células germinales murinas de la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

30 Los genes de células germinales IGKV4-79*01 y IGKJ4*01 murinas con una identidad de secuencia de 98.58% para la región V y 97.22% para la región J, respectivamente, se han identificado. Respecto a la identidad obtenida, se ha decidido utilizar directamente las secuencias 11E1 VL para buscar homologías humanas.

Estos alineamientos se representan en las Figuras 38A para el gen V y 38B para el gen J.

Comparación de la secuencia de nucleótidos de 11E1 VL con genes de células germinales humanas

35 A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, el gen de célula germinal humana que exhibe la mejor identidad con 11E1 VL, se ha buscado. Para este objetivo, la secuencia de nucleótidos de 11E1 VL se ha alineado con la parte de secuencias de genes de células germinales humanas de la base de datos IMGT.

40 IGKV3-7*02 y IGKV3D-7*01 humanas con una identidad de secuencia tanto para ambos genes de células germinales de 69.86% para la región V, se han identificado. El gen de célula germinal humana IGKV3-7*02 se conoce en la base de datos IMGT como un "ORF" que significa que esta secuencia se ha encontrado en el genoma humano pero puede presentar ciertos problemas de recombinación que llevan a anticuerpos naturales derivados de IGKV3-7*02 no funcionales. De esta manera, el gen de célula germinal IGKV3D-7*01 se selecciona que recibe la región V humana para las 11E1 VL CDRs murinas.

45 Para la región J, la mejor calificación de homología se obtuvo primero con humano, IGKJ3*01 humana que muestra una identidad de secuencia de 78.38%. Pero un número superior de nucleótidos idénticos consecutivos y un mejor ajuste de aminoácidos se ha encontrado en el alineamiento con el gen de célula germinal IGKJ4*02 humana (identidad de secuencia de 75.68%). De esta manera, el gen de célula germinal IGKJ4*02 se elige que recibe la región J humana para las 11E1 VL CDRs murinas.

Los alineamientos se representan en las Figuras 39A para la región V y 39B para la región J.

55 Para la optimización de la selección, el experto en la materia también puede hacer alineamientos entre las secuencias de proteína a fin de ayudarlo en la selección.

Versión humanizada de 11E1 VL

60 Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en enlazar las secuencias de genes de células germinales IGKV3D-7*01 y IGKJ4*02 y también las CDR de la 11E1 VL murina a los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

65 Como se ilustra en la Figura 40, los residuos en negrita en la secuencia 11E1 VL corresponden a los treinta aminoácidos que se encuentran diferentes entre el dominio 11E1 VL y los fragmentos humanos selectos (FR humano, es decir IGKV3D-7*01 y IGKJ4*02).

Respecto a los varios criterios tales como su participación conocida en la interfase VH/VL, en enlace de anticuerpo o en la estructura CDR, la clase de aminoácido cambia entre residuos murinos y humanos, la localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, cuatro de los treinta diferentes residuos se han identificado mutados eventualmente. Estos cuatro residuos definidos más importantes y mutaciones en sus

contra-partes humanas son murino L4 en humano M, Y40 en S, Y87 en F y T96 en P. Estos residuos de rango uno se ilustran en la Figura 40 como residuos en negrita en la secuencia 11E1 HZVL en donde permanecen murinos.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados que deben someterse a prueba no son limitados sino deben ser considerados con mutaciones preferidas.

Con el auxilio de un modelo molecular, otras mutaciones pueden ser identificadas. Pueden mencionarse los siguientes residuos rango dos, es decir los residuos 24 (S/R), 53 (W/L), 66 (I/T), 67 (L/R), 86 (S/D), 95 (Q/E), 99 (A/F) o 121 (E/D), en donde las mutaciones también pueden ser concebidas en otra forma de realización preferida.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados que deben someterse a prueba eventualmente no están limitados sino deben ser considerados como mutaciones preferidas. En otra forma de realización preferida, todos los otros dieciocho residuos rango tres entre los treinta diferentes aminoácidos pueden ser reconsiderados.

Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se probarán en forma individual o de acuerdo con diversas combinaciones.

La Figura 40 representa la 11E1 VL humanizada implementada con las mutaciones anteriormente mencionadas claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará la mutación.

II - Humanización del dominio variable de cadena pesada

Comparación de la secuencia de nucleótidos de 11E1 VH con genes de células germinales murinas

Como una etapa preliminar, la secuencia de nucleótidos de 11E1 VH se comparó con la parte de secuencias de genes de células germinales murinas de la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Los genes de células germinales IGHV1-7*01, IGHD4-1*01 e IGHJ3*01 murinas con una identidad de secuencia de 94.10% para la región V, 66.67% para la región D y 100% para la región J, respectivamente, se han identificado. Respecto a la identidad obtenida, se ha decidido utilizar directamente las secuencias 11E1 VH para buscar homologías humanas.

Estos alineamientos se representan en las Figuras 41A para el gen V, 41B para el gen D y 41C para el gen J.

Comparación de la secuencia de nucleótidos de 11E1 VH con genes de células germinales humanas

A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, se ha buscado el gen de célula germinal humana que exhibe la mejor identidad con 11E1 VH. Para este objetivo, la secuencia de nucleótidos de 11E1 VH se ha alineado con las secuencias de genes de células germinales humanas parte de la base de datos IMGT. Para optimización de la selección, se realizaron alineamientos entre las secuencias de proteína para buscar mejores homologías.

Estos dos métodos complementarios llevaron a la identificación de dos secuencias V humanas receptoras posibles para las 11E1 VH CDRs murinas. Alineamiento de nucleótidos da el gen de célula germinal IGHV1-2*02 humana con una identidad de secuencia de 75.69%, mientras que el alineamiento de proteína da el gen de célula germinal IGHV1-46* 01 humana con una identidad de secuencia de 71.10%.

Debe apreciarse que la region D pertenece estrictamente a la región CDR3 en el dominio VH. El proceso de humanización se basa en el enfoque de "injerto CDR". Análisis del gen D humano más cercano no es útil en esta estrategia.

Buscando homologías para la región J lleva a la identificación del gen de célula germinal IGHJ4*03 humana con una identidad de secuencia de 80.85%.

Buscando similitudes totales y alineamientos de secuencias, el gen de célula germinal IGHV1-46*01 V humana y el gen de célula germinal IGHJ4*03 J humana de esta manera se han seleccionado que reciben secuencias humanas para las 11E1 VH CDRs murinas.

Los alineamientos se representan en las Figuras 42A para la región V y 42B para la región J.

Versión humanizada de 11E1 VH

Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en enlazar las secuencias de genes de células germinales selectas IGHV1-46*01 e IGHJ4*03 y también las CDRs de la 11E1 VH murina a los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

Como se ilustra en la Figura 43, los residuos en negrita en la secuencia 11E1 VH, corresponden a los veintiséis aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 11E1 VH y los fragmentos humanos selectos (FR humano, es decir IGHV1-46*01 y IGHJ4*03).

Respecto a los varios criterios tales como su participación conocida en la interfase VH/VL, en enlace de antígeno o en estructura CDR, la clase de aminoácidos cambia entre residuos murinos y humanos, localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, cinco de los veintiséis diferentes residuos se han identificado mutados eventualmente. Estos cinco residuos definidos más importantes y mutaciones en sus contrapartes humanas son N40 murino en H humano, Y55 en I, D66 en S, A80 en R y K82 en T. Estos residuos rango uno se ilustran en la Figura 43 como residuos en negrita en la secuencia 11E1 HZVH en donde permanecen murinos.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados que deben someterse a prueba no están limitados sino que deben considerarse como mutaciones preferidas.

Con el auxilio de un modelo molecular, pueden identificarse otras mutaciones. Pueden mencionarse los siguientes residuos rango dos, es decir residuos 53 (I/M), 71 (L/F), 76 (A/V), 78 (L/M) y 87 (A/V) en los que las mutaciones también pueden concebirse en otra forma de realización preferida.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados que deben someterse a prueba eventualmente no están limitados sino que deben considerarse como mutaciones preferidas. En otra forma de realización preferida, todos los otros dieciséis residuos rango tres entre los veintiséis diferentes aminoácidos pueden ser reconsiderados.

Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se someten a prueba individualmente o de acuerdo con diversas combinaciones.

La Figura 43 representa la 11E1 VH humanizada implementada con las mutaciones anteriormente mencionadas claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará la mutación.

Ejemplo 18: Efecto de Mabs purificada en fosforilación c-Met

En el ejemplo 3, el efecto de Mabs anti-c-Met en fosforilación se estimó con sobrenadantes dosificados de cada hibridoma a evaluar. La prueba se ha realizado de nuevo con 11E1 y 224G11 Mabs purificadas que se han evaluado ya sea a una concentración final de 30 µg/ml (200 nM) o a un rango de dosis de 0.0015 a 30 µg/ml (0.01-200 nM) a fin de determinar la IC₅₀ de cada anticuerpo. El protocolo empleado es el mismo que aquel descrito en el ejemplo 3.

Los resultados de 3 experimentos independientes se presentan en la Figura 44 y demuestran que una vez purificadas 11E1 y 224G11 no exhiben efecto agonista cuando se agregan solas a células A549 y respectivamente 87 y 75% efecto antagonista en presencia de HGF. Como se espera 5D5 Mab introducido como un control positivo agonista mostró un significativo efecto agonista (58%) cuando se agrega sola y solo un efecto antagonista moderado (39%) en presencia de HGF. Respecto a cálculos de EC₅₀, tanto 11E1 como 224G11 tuvieron IC₅₀S nanomolares.

Ejemplo 19: Combinación *in vivo* de 224G11 y Navelbine® en modelo de xenoinjerto NCI-H441

las células NCI-H441 de ATCC se cultivaron rutinariamente en medio RPMI 1640, FCS al 10%, L-Glutamina al 1%. Las células se dividieron dos días antes de inserción estando en fase de crecimiento exponencial. Diez millones de células NCI-H441 se injertaron a ratones desnudos atímicos. Cinco días después de implante, los tumores se pudieron medir y los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con tamaño de tumor comparable. Los ratones se trataron i.p. ya sea con una dosis de carga de 2 mg de 224G11 Mab /ratón y después dos veces a la semana con 1 mg de anticuerpo/ratón hasta el día 38 o con 3 inyecciones de Navelbine® (D5, D12, D19) a 8 mg/kg. Un tercer grupo administrado con el tratamiento combinado también se incluyó. Navelbine® se suministró por inyecciones i.p. El volumen de tumor se midió dos veces a la semana y calculó por la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$ y los pesos de animales se supervisaron cada día sobre el periodo de tratamiento de Navelbine®. Análisis estadístico se realizó en cada tiempo medido utilizando ya sea una prueba t o una prueba Mann-Whitney. En este experimento, el volumen de tumor promedio de los grupos tratados de modalidad sencilla se reduce en 72%, 76% y 99.8% para 224G11, Navelbine® y Navelbine® + 224G11 respectivamente el día 41 post primera inyección. El día 41, la terapia combinada mejoró significativamente el

crecimiento de tumor en comparación con los tratamientos de terapia sencillos ($p \leq 0.041$ comparado con Navelbine® solo y $p \leq 0.002$ comparado con 224G11 solo el día 41), 4 de 6 ratones están sin tumor en el grupo de terapia combinada. Los resultados se representan en la Figura 45.

- 5 Estos resultados se confirmaron 50 días después del fin de los tratamientos (D88) en donde 66% de ratones que reciben el tratamiento combinado permanecieron libres de tumores.

Ejemplo 20: Combinación *in vivo* de 224G11 y Doxorubicina en modelo de xenoinjerto NCI-H441

- 10 Células NCI-H441 de ATCC se cultivaron rutinariamente en medio RPMI 1640, FCS al 10%, L-Glutamina al 1%. Las células se dividieron dos días antes de inserción en fase de crecimiento exponencial. Diez millones de células NCI-H441 se injertaron en ratones desnudos atímicos. Cinco días después de implante, los tumores se pudieron medir y los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con tamaño de tumor comparable. Los ratones se trataron i.p. ya sea con una dosis de carga de 2 mg de 224G11 Mab/ratón y después dos veces a la
- 15 semana con 1 mg de anticuerpo/ratón o con 4 inyecciones de Doxorubicina (D5, D12, D19, D26) a 5 mg/kg. Un tercer grupo administrado con el tratamiento combinado también se incluyó. Doxorubicina se suministró por inyecciones i.v. El volumen de tumor se midió dos veces a la semana y calculó por la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$ y los pesos de animales se supervisaron todos los días durante el periodo de tratamiento con Doxorubicina. Análisis estadístico se realizó en cada tiempo medido utilizando ya sea una prueba-t o una prueba
- 20 Mann-Whitney. Tanto terapias sencillas como tratamiento combinado exhiben significativa actividad anti-tumor comparada con el grupo de control ($p \leq 0.002$ de D11 a D39). Los resultados se representan en la Figura 46.

- El tratamiento combinado también demuestra una actividad de crecimiento antitumoral significativa en comparación con un tratamiento de modalidad sencilla entre D11 y D39 indicando que existe un beneficio en
- 25 combinar Doxorubicina con un tratamiento anti-c-Met.

Ejemplo 21: Combinación *in vivo* de 224G11 y Docetaxel en modelo de xenoinjerto NCI-H441

- 30 Las células NCI-H441 de ATCC se cultivaron rutinariamente en medio RPMI 1640, FCS al 10%, L-Glutamina al 1%. Las células se dividieron dos días antes de inserción en fase de crecimiento exponencial. Nueve millones de células NCI-H441 se injertaron en ratones desnudos atímicos. Cinco días después de implante, los tumores se pudieron medir y los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con tamaño de tumor comparables. Los ratones se trataron i.p. ya sea con una dosis de carga de 2 mg de 224G11 Mab/ratón y después dos veces a la semana con 1 mg de anticuerpo/ratón o con 4 inyecciones de Docetaxel (D5, D12, D19, D26) a 7.5 mg/kg. Un
- 35 tercer grupo administrado con el tratamiento combinado también se incluyó. Docetaxel se suministró por inyecciones i.p. Volumen de tumor se midió dos veces a la semana y calculó por la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$ y los pesos de animales se supervisaron cada día durante el periodo de tratamiento con Docetaxel. Análisis estadístico se realizó en cada tiempo medido utilizando ya sea una prueba-t o una prueba Mann-Whitney. Tanto terapias sencillas como tratamiento combinado exhibieron actividad antitumoral
- 40 significativa en comparación con el grupo de control ($p \leq 0.002$ de D11 a D35). Los resultados se representan en la Figura 47.

- El tratamiento combinado también demostró una actividad de crecimiento antitumoral significativa en comparación con tratamiento de modalidad sencilla entre D18 y D35 indicando que existe un beneficio en
- 45 combinar Docetaxel con un tratamiento anti-c-Met.

Ejemplo 22: Combinación *in vivo* de 224G11 y Temozolomida en modelo de xenoinjerto U87MG

- 50 Las células U87-MG de ATCC se cultivaron rutinariamente en medio DMEM, FCS al 10%, L-Glutamina al 1%. Las células se dividieron dos días antes de inserción en la fase de crecimiento exponencial. Cinco millones de células U87-MG se injertaron en ratones desnudos atímicos. Diecinueve días después de implante, los tumores se pudieron medir y los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con tamaño de tumor comparable. Los ratones se trataron i.p. ya sea con una dosis de carga de 2 mg de 224G11 Mab/ratón y después dos veces a la semana con 1 mg de anticuerpo/ratón o con 3 inyecciones de Temozolomida (D19, D26, D33) a 5 mg/kg.
- 55 También fue incluido un tercer grupo al que se le administró el tratamiento combinado. Temozolomida se suministra por inyecciones i.p. El volumen de tumor se midió dos veces a la semana y calculó por la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$ y los pesos de animales se supervisaron cada día durante el periodo de tratamiento con Temozolomida. Análisis estadístico se realizó en cada tiempo medido utilizando ya sea una prueba-t o una prueba Mann-Whitney. Tanto las terapias sencillas como el tratamiento combinado exhiben significativa actividad
- 60 antitumoral, en comparación con el grupo de control ($p \leq 0.002$ de D22 a D32 (en donde ratones de control se sometieron a eutanasia por razones éticas)). Los resultados se representan en la Figura 48.

- El tratamiento combinado también demuestra una actividad de crecimiento anti-tumor significativa en comparación con tratamientos de modalidad sencilla ($P \leq 0.002$ del día 22 al día 43 (en donde ratones de control se sometieron a eutanasia por razones de ética) para Temozolomida y del día 29 al día 53 (último día de
- 65 tratamiento) para 224G11. Tomados en conjunto, estos datos indican que existe un beneficio en combinar

Temozolomida con un tratamiento de anti-c-Met.

Ejemplo 23: Formación de esferoide

Como ya se describió en el Ejemplo 9 para otras Mabs, evaluamos la capacidad de 224G11 Mab para inhibir el crecimiento de tumor *in vitro* en el modelo de esferoide U87-MG. Para este propósito, células U87-MG desarrolladas como una monocapa se desprendieron con tripsina-EDTA y resuspendieron en medio de cultivo de células completas. Se iniciaron esferoides por inoculación de 625 células en pocillos sencillos de fondo redondo, 96 placas en DMEM-FCS al 2.5%. Para impedir adhesión celular a un sustrato, las placas fueron revestidas previamente con polyHEMA en etanol al 95% y secaron al aire a temperatura ambiente. Las capas se incubaron bajo condiciones de cultivo celular estándar a 37 grados C, CO₂ al 5% en incubadoras humidificadas. Anticuerpos monoclonales purificados (10 µg/ml) se agregaron después de 4 y 10 días de cultivo esferoide. Los esferoides se mantuvieron en cultivo por 17 días. Después, el crecimiento de esferoides se supervisa al medir el área de esferoides utilizando el módulo de automedida del programa axiovision. El área se expresó en µm². 8-16 esferoides se evaluaron por cada condición. El tamaño de esferoides se midió antes de adición de anticuerpos, después de 10 días de cultivo y después de 17 días de cultivo.

En estas condiciones, se obtuvieron esferoides homogéneos y no se observó diferencia estadística antes de adición de anticuerpos (Figura 49A).

Como se ilustra en las Figuras 49B-49D, el control de isotipo, 9G4 no afectó el crecimiento de esferoides después de 10 o 17 días de cultivo. Mientras que la adición de 5D5 no tuvo efecto mayor en tamaño de esferoide, la adición de cualquiera de 224G11 y 11E1 inhibió marcadamente el crecimiento de tumor.

Ejemplo 24: Actividad *in vitro* de formas quiméricas y humanizadas de 224G11 en el ensayo fosfo-c-Met

A fin de comparar la eficacia *in vitro* de formas murina, quimérica y humanizada en un ensayo funcional, sobrenadantes de cultivo que resultan de hibridoma 224G11 y células transfectadas HEK293 se dosificaron y probaron como se describe en el Ejemplo 3. Datos resumidos en la Figura 50, mostraron los resultados esperados para el anticuerpo murino no purificado como ya se describió en la Figura 6B. Tanto anticuerpos no purificados quiméricos como humanizados exhibieron una actividad comparable ya sea cuando se agregan solos (Figura 50A) o cuando se incuban en la presencia de HGF (Figura 50B).

Ejemplo 25: Determinación de constantes de afinidad (KD) de anticuerpos anti-c-Met por análisis de Biacore

La afinidad de enlace de anticuerpos 11E1 y 224G11 purificados se investigó por BIAcore X utilizando Dominio c-Met-Extra-Celular Recombinante (ECD) fusionado a un dominio IgG1 Fc humano (R&D Systems) como antígeno (MW = 129 kDa). Como ambas proteínas de fusión c-Met-Fc y anticuerpos son compuestos bivalentes, fragmentos Fab de mAbs 11E1 y 224G11 (MW = 50 kDa) se generaron por corte con papaína, purificaron y utilizaron en este ensayo para evitar interferencia con parámetro de avidéz. Para el ensayo, un anticuerpo de captura anti-Tag histidina se revistió en chips-sensores CM5. El amortiguador de corrida fue HBS-EP, el gasto de flujo fue 30 µl/min y la prueba se realizó a 25 grados C. Antígeno c- Met (ECD_M1)2-Fc-(HHHHHH)2 soluble se capturó en el chip-sensor (alrededor de 270 RU), y los anticuerpos a probar se utilizaron en solución como analitos. El chip-sensor se regeneró utilizando amortiguador Glicina, HCl pH 1.5 en ambas células de flujo por medio minuto.

La Figura 51 ilustra el principio de este análisis. Los parámetros cinéticos resultantes se resumen en la siguiente tabla 4. Indican que ambos anticuerpos 11E1 y 224G11 anti-c-Met ligan la proteína de fusión c-Met-Fc recombinante con afinidades comparables en el intervalo de aproximadamente 40 pM.

Tabla 4

	K_{on1} X 10 ⁻⁶ [1/M.s]	K_{on1} X 10 ⁻⁶ [1/M.s]	Vida media [h]	K [pM]
11E1 Fab	1,13 ± 0,01	4,68 ± 0,001	4,1	41,4 ± 0,5
224G11 Fab	2,04 ± 0,01	7,79 ± 0,40	2,5	34,8 ± 1,9

Ejemplo 26: Actividad *in vivo* de 224G11 en células MDA-MB-231 coimplantadas con células MRC5 como una fuente de HGF humano en ratones desnudos atímicos

Las células MDA-MB-213 y MRC5 de ATCC se cultivaron ambas en medio DMEM, FCS al 10%, L-Glutamina al 1%. Las células se dividieron dos días antes de inserción en la fase de crecimiento exponencial. Cinco millones de células MDA-MB-231 y 500 000 células MRC5 se co-inyectaron s.c. en ratones desnudos Atímicos. Doce días

después de implante, los tumores se pudieron medir y los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con tamaños de tumor comparable. Los ratones se trataron i.p. ya sea con una dosis de carga de 2 mg de 224G11 Mab/ratón y después dos veces a la semana con 1 mg de anticuerpo/ratón. Volumen de tumor se midió dos veces a la semana y calculó por la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$.

Los resultados descritos en la Figura 52 mostraron una diferencia significativa en crecimiento de tumores medios de ratones tratados con 224G11, en comparación con el grupo de control.

Ejemplo 27: Elementos complementarios en humanización de anticuerpos 227H1, 11E1 y 224G11

Procedimiento General

Humanización de los anticuerpos anti-cMet se realizó independientemente de cada cadena y secuencialmente respecto a los aminoácidos analizados en cada dominio variable. El proceso de humanización se evalúa en un primer intento en un ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet recombinante; las actividades de enlace de los anticuerpos humanizados se comparan con el anticuerpo quimérico recombinante. En un segundo intento, anticuerpos humanizados anti-cMet se evaluaron por sus habilidades para desplazar el enlace Fc-cMet en HGF recombinante revestido con plástico; este ensayo de competencia permite la comparación directa de versiones murina, quimérica y humanizada de los anticuerpos anti-cMet.

En las Figuras 53 y 54 se ejemplifican las actividades de enlace anti-cMet típicas de anticuerpos monoclonales murinos 227H1, 11E1 y 224G11.

La Figura 53 muestra actividades de enlace directo anti-cMet de anticuerpos murinos purificados detectados. En este ensayo, anticuerpos anti-cMet monoclonales murinos exhiben diferentes actividades de enlace anti-cMet diferentes pero todavía dependientes de dosis.

La Figura 54 muestra las actividades de competencia de enlace HGF-cMet de anticuerpos murinos purificados. El ensayo de competencia revela diferencias confiables entre estos anticuerpos monoclonales anti-cMet con una actividad moderada, no completa pero confiable competitiva para anticuerpo monoclonal 11E1, mientras que 224G11 y 227H1 murinos exhiben un patrón similar de actividades de competencia con un 100% de máximo de desplazamiento de enlace HGF a alta concentración de anticuerpo. El anticuerpo monoclonal 224G11 muestra el mejor valor IC_{50} .

Debe apreciarse que las actividades de enlace directo de los anticuerpos murinos no reflejan sus propiedades competitivas de enlace HGF intrínsecas.

Estos dos ensayos se emplearon para caracterizar las versiones quimérica y humanizada recombinantes de los anticuerpos anti-cMet murinos. Para este objetivo, brevemente, dominios variables anti-cMet, ya sean murinos o humanizados, se clonaron en las series de vectores de expresión pCONplus de LONZA y anticuerpos derivados IgG₁/k recombinantes se expresaron en células CHO. Sobrenadantes de cultivo de expresión se concentraron y dialisaron extensamente contra PBS y después dosificaron para concentraciones de anticuerpos expresados y directamente emplearon para estimar las actividades de enlace anti-cMet correspondientes. Se estimaron tanto ensayos de enlace directo como competencia de HGF para caracterizar mejor las versiones quiméricas o humanizadas recombinantes.

Ejemplo 27-1: Humanización de dominio variable de cadena pesada 227H1

A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, se ha buscado el gen de célula germinal humana que exhiben la mejor identidad con la secuencia murina 227H1 VH. Con el auxilio de la base de datos IMGT, el gen de célula germinal IGHV1-2*O2 V humana y el gen de célula germinal IGHJ4*01 J humana de esta manera se han seleccionado que reciben las secuencias humanas para las 227H1 VH CDRs murinas.

La Figura 55 representa un alineamiento de aminoácidos del dominio 227H1 VH murino con el marco humano selecto. En la fila de FR humano, solo se ilustra el aminoácido que se encuentra diferente del dominio VH murino 227H1. Las filas HZ3VH, HZ2VH y HZ1VH corresponden a versiones humanizadas implementadas del dominio 227H1 VH con las mutaciones anteriormente mencionadas (fila "cambiada") claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará dicha mutación.

En una primer serie de experimentos, construimos y analizamos las actividades de enlace anti-cMet de las tres primeras versiones humanizadas del dominio VH murino 227H1 cuando se expresan en combinación con la cadena ligera quimérica 227H1. Resultados obtenidos del ensayo de enlace directo anti-cMet se muestran en la Figura 56. En este experimento, no se observaron diferencias en las capacidades de enlace de los anticuerpos recombinantes parcialmente humanizados o quiméricos derivados 227H1 probados. En este punto, 26 de los 32 aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 227H1 VH murino y el marco humano selecto se han analizado y no se encontraron relevantes para actividad de enlace anti-cMet del dominio VH humanizado 227H1,

cuando se combinan con la cadena ligera quimérica.

En conjunto con un análisis de mutagénesis dirigida por sitio de los últimos seis residuos murinos en la versión humanizada HZ1VH del dominio 227H1 VH, construimos una versión original HZ4VH "totalmente humanizada-IMGT" y se probaron sus propiedades de enlace anti-cMet. Los resultados se proporcionan en la Figura 57 para el ensayo de enlace directo y en la Figura 58 para el ensayo de competencia de enlace HGF. Debe apreciarse que ambas versiones recombinantes quimérica y humanizada 227H1 exhiben una mejor actividad competitiva que el anticuerpo murino paternal.

Sin embargo, dados los datos experimentales obtenidos respecto a las propiedades de enlace anti-cMet del dominio 227H1 VH humanizado "completo-IMGT", la secuencia de aminoácidos resultante ilustrada en la Figura 59 se eligió y un análisis bioinformática se realizó para evaluar el nivel de calidad o "carácter humano" ("humaness") del dominio variable humanizado 227H1-HZ VH así denominado.

Para este objetivo, una comparación simple de las secuencias marco a la base de datos humana, se realizó utilizando las herramientas IMGT. Dado el nivel de humanización que alcanzamos durante este proceso, de los 89 aminoácidos analizados correspondientes a los residuos marco, 89 se encontraron confiables con un origen humano. Solo residuos de las CDRs pueden encontrarse diferentes, pero de ser así son diferentes del gen de célula germinal humana correspondiente, y evidentemente en posiciones hipervariables. Basándose en el sistema de numeración IMGT y las herramientas de análisis de homología, primero humanizamos totalmente un dominio variable de anticuerpo de origen murino.

Ejemplo 27-2: Humanización de anticuerpo monoclonal 11E1

I - Humanización de dominio variable de cadena pesada 11E1

A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto de CDR, el gen de línea celular germinal humana que exhibe la mejor identidad con la secuencia murina 11E1 VH se ha buscado. Con el auxilio de la base de datos IMGT, el gen de célula germinal IGHV1-46*01 V humano y gen de célula germinal IGHJ4*03 J humano de esta manera se han seleccionado como secuencias receptoras humanas para las 11E1 VH CDRs murinas.

La Figura 60 representa un alineamiento de aminoácidos del dominio 11E1 VH murino con el marco humano selecto. En la fila de FR humano, solo el aminoácido que se encontró diferente del dominio VH murino 11E1 se ilustra. Las filas HZ VH3, HZ VH2 y HZ VH1 corresponden a versiones humanizadas implementadas del dominio 11E1 VH con las mutaciones anteriormente mencionadas (fila "cambiada"), claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará dicha mutación.

En una primera serie de experimentos, construimos y analizamos las actividades de enlace anti-cMet de las tres primeras versiones humanizadas del dominio VH murino 11E1 cuando se expresan en combinación con la cadena ligera quimérica 11E1. Resultados obtenidos del ensayo de enlace directo anti-cMet se muestran en la Figura 61. En este experimento, se observó una capacidad de enlace similar de anticuerpos recombinantes parcialmente humanizados o quiméricos derivados de 11E1 probados. En este punto, 19 de los 24 aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 11E1 VH murino y el marco humano selecto, se han analizado y se han encontrado que no son relevantes para actividad de enlace anti-cMet del dominio VH humanizado 11E1 cuando se combinan con la cadena ligera quimérica.

II - Humanización de dominio variable de cadena ligera 11E1

A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, se ha buscado el gen de célula germinal humano que exhibe la mejor identidad con la secuencia murina 11E1 VL. Con el auxilio de la base de datos IMGT, el gen de célula germinal IGKV3D-7*01 V humano y el gen de célula germinal IGKJ4*01 J humano, de esta manera se han seleccionado como secuencias humanas receptoras para las 11E1 VL CDRs murinas.

La Figura 62 representa un alineamiento de aminoácidos del dominio 11E1 VL murino con el marco humano selecto. En la fila de FR humano, solo el aminoácido que se encuentra diferente del dominio VL murino 11E1 se ilustra. Las filas HZ VL3, HZ VL2 y HZ VL1 corresponden a versiones humanizadas implementadas del dominio 11E1 VL con las mutaciones anteriormente mencionadas (fila "cambiada") claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará la mutación.

En una primera serie de experimentos, se construyen y analizan las actividades de enlace anti-cMet de las tres primeras versiones humanizadas del dominio VL murino 11E1 cuando se expresa en combinación con la cadena pesada quimérica 11E1. Resultados obtenidos del ensayo de enlace directo anti-cMet se muestran en la Figura 63. En este experimento, observamos capacidades de enlace similares de los anticuerpos recombinantes parcialmente humanizados o quiméricos derivados de 11E1 probados. En este punto, 26 de los 30 aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 11E1 VL murino y el marco humano selecto, se han analizado y no se han encontrado relevantes para la actividad de enlace anti-cMet del dominio VL humanizado 11E1, cuando se

combinan con la cadena pesada quimérica.

III - Humanización de anticuerpo 11E1

En esta etapa de la humanización de anticuerpo monoclonal 11E1, la secuencia de anticuerpos humanizada resultante teórica contiene solo cinco residuos de CDRs externos que tienen un dominio VH murino paternal y cuatro residuos CDRs externos que provienen de la secuencia VL murina paternal (ver Figura 60, fila HZ VH1 y Figura 62, fila HZ VL1). Se ha decidido entonces caracterizar inmediatamente la versión humanizada de cadena pesada y ligera combinada resultante del anticuerpo 11E1. Los resultados se proporcionan en la Figura 64 para el ensayo de enlace directo anti-cMet.

En este experimento, se han observado capacidades de enlace similares para los anticuerpos recombinantes humanizados o quiméricos derivados de 11E1 probados. Análisis de las propiedades competitivas de enlace HGF y análisis de mutagénesis dirigida por sitio de la contribución de los nueve residuos murinos izquierdos restantes para realizarse independientemente o en combinación en esta versión VH1/VL1 "prehumanizada" del anticuerpo monoclonal 11E1.

Ejemplo 27-3: Humanización de anticuerpo monoclonal 224G11

I - Humanización de dominio variable de cadena pesada 224G11

A fin de identificar el mejor candidato humano para injerto CDR, se ha buscado el gen de célula germinal humana que exhibe la mejor identidad con la secuencia murina 224G11 VH.

Respecto a la homología de alta secuencia entre las secuencias de dominio 224G11 y 227H1 VH y como se confirma por el uso de las herramientas de la base de datos IMGT, el mismo gen de célula germinalIGHV1-2*02 V humano y el gen de célula germinalIGHJ4*01 J humano de esta manera se han seleccionado como las secuencias humanas receptoras para las 224G11 VH CDR murinas.

Basándose en esta alta homología, se ha decidido el transferir directamente las informaciones de humanización ganadas de la humanización de dominio 227H1 VH (ver Ejemplo 27) y diseñamos de esta manera una versión humanizada de "completa-IMGT" como se ilustra en la Figura 65, que representa un alineamiento de aminoácidos de los dominios 227H1 y 224G11 VH murinos con el marco humano selecto. En la fila de FR humano, solo se ilustra el aminoácido que se encuentra diferente del dominio VH murino 224G11. La fila HZVHO corresponde a la versión humanizada "completo-IMGT" del dominio 224G11 VH como se obtiene para el dominio 227H1 1 -HZVH "completo-IMGT".

La versión humanizada "completo-IMGT" del dominio VH murino 224G11 de esta manera se ha construido y sus actividades de enlace anti-cMet se analizaron, cuando se expresan en combinación con la cadena ligera quimérica 224G11. Resultados obtenidos del ensayo de enlace directo anti-cMet se muestran en la Figura 66, mientras que la Figura 67 ilustra el ensayo de competencia de enlace HGF. Dados los datos experimentales obtenidos respecto a las propiedades de enlace anti-cMet del dominio 224G11 VH humanizado "completo-IMGT", la secuencia de aminoácidos resultante como se ilustra en la Figura 65, se elige y se realiza entonces un análisis bioinformático para evaluar el nivel de "carácter humano" del dominio 224G11-HZ VHO así denominado.

Dada la estrategia de humanización aquí aplicada, debe de referirse al Ejemplo 27 para el análisis de calidad/carácter humano de la secuencia 224G11 HZ VHO. Como se describe para la humanización de dominio 227H1 VH, confirmamos la confiabilidad del sistema de numeración IMGT y las herramientas de análisis de homología y también se demuestra la posibilidad de transferir la estrategia de humanización entre anticuerpos bajo los límites de su homología intrínseca.

II - Humanización de dominio variable de cadena ligera 224G11

A fin de identificar el mejor candidato humano para injerto CDR, se ha buscado el gen de célula germinal humana que exhibe la mejor identidad con la secuencia murina 224G11 VL. Con el auxilio de las herramientas de análisis de la base de datos IMGT, se identificaron dos regiones V humanas receptoras para las 224G11 VL CDR murinas. De esta manera, dos estrategias de humanización se han planeado para el dominio 224G11 VL. La primera corresponde a una prueba inicial para un marco humano con una longitud CDR1 más corta (IGKV3-11*01), la segunda con una longitud CDR1 más larga (IGKV4-I*01).

La Figura 68 representa un alineamiento de aminoácidos del dominio 224G11 VL murino con los dos fragmentos humanos seleccionados. En ambas filas FR Hu-FR más corta y más larga, solo se ilustra el aminoácido que se encuentra diferente del dominio VL murino 224G11. Las filas HZ VL3 y HZ VL6 corresponden a versiones humanizadas básicas del dominio 224G11 VL con las mutaciones anteriormente mencionadas (fila de "rango") claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará dicha mutación cuando se elige el marco CDR1 básico "más corto" o "más largo".

En un primer conjunto de experimentos, las dos versiones humanizadas básicas del dominio VL murino 224G11 se construyeron y sus actividades de enlace anti-cMet se analizaron, cuando se expresan en combinación con la cadena pesada quimérica 224G11. Resultados obtenidos del ensayo de enlace directo anti-cMet se muestran en la Figura 69. En este experimento, una actividad de enlace anti-cMet similar se observa para la versión quimérica y HZ VL6 ("CDR1 más largo") mientras que casi no se detecta enlace para el anticuerpo derivado 224G11 recombinante HZ VL3 ("CDR1-más corto").

En un segundo juego de experimentos, construimos y analizamos las actividades de enlace anti-cMet de las versiones humanizadas implementadas del dominio 224G11 VH derivado de HZ VL6 cuando se expresa en combinación con la cadena pesada quimérica 224G11. Dos formas humanizadas adicionales se analizaron; en la versión HZ VL5, los siete residuos del tercer grupo (rango 3) son humanizados y en la versión HZ VL4, los cuatro residuos izquierdos del primer grupo (residuos rango 1) solo permanecieron murinos. Resultados obtenidos del ensayo de enlace directo anti-cMet se muestran en la Figura 70. En este experimento, no se observaron diferencias en las capacidades de enlace de los anticuerpos recombinantes parcialmente humanizados o quiméricos derivados de 224G11 probado. En este punto, 18 de los 22 aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 224G11 VL murino y el marco humano "CDR1-más largo" selecto se han analizado y no se han encontrado relevantes para la actividad de enlace anti-cMet del dominio VL humanizado 224G11, cuando se combinan con la cadena pesada quimérica.

Se ha probado la versión humanizada HZ VL4 del dominio 224G11 VL en el ensayo de competencia de enlace HGF. Como se muestra en la Figura 71, los resultados obtenidos demuestran la actividad competitiva similar de anticuerpos derivados de 224G11 humanizados HZ VL4 y quiméricos recombinantes y murinos.

En esta etapa de la humanización del dominio 224G11 VL, la secuencia resultante contiene solo cuatro residuos externos CDRs que provienen de la secuencia paternal murina. Como se muestra en la Figura 72, estos cuatro residuos marcados § son L4, M39, H40 y R84.

Basándose en el sistema de numeración IMGT y en las herramientas de análisis y homología, demostramos que el marco humano que exhibe diferencias estructurales en términos de longitud de CDR todavía puede ser adecuado en un proceso de humanización. Se ha decidido entonces el caracterizar las versiones humanizadas de cadena ligera y pesada resultantes del anticuerpo 224G11. El análisis de mutagénesis dirigida por sitio de la contribución de los cuatro residuos murinos restantes se realiza entonces cuando se expresa en combinación con la versión humanizada VHO de la cadena pesada.

III - Humanización de anticuerpo 224G11

En una primera serie de experimentos, construimos y analizamos las actividades de enlace anti-cMet de la versión totalmente humanizada del anticuerpo 224G11. Esta versión recombinante abarca ambos dominios VH y VL humanizados VH0 y VL4 respectivamente. Los resultados obtenidos del ensayo de enlace directo anti-cMet se muestran en la Figura 73. En este experimento, la actividad de enlace anti-cMet 224G11 totalmente humana, se encuentra similar a la de las versiones 224G11 recombinante quimérica y humanizada de "cadena sencilla".

Se ha probado entonces la versión totalmente humanizada del dominio 224G11 VL en el ensayo de competencia de enlace HGF. Los resultados obtenidos como se muestra en la Figura 74, demuestran la actividad competitiva similar de anticuerpos derivados 224G11 totalmente humanizados y quiméricos recombinantes y murinos paternos.

En esta etapa de la humanización de anticuerpo 224G11, la secuencia resultante contiene solo cuatro residuos CDRs externos que provienen de la secuencia de dominio variable de cadena ligera paternal murina. Analizamos entonces variantes sencillas de mutagénesis dirigida por sitio del dominio VL humanizado VL4 cuando se expresa en combinación con la versión humanizada VH0 de la cadena pesada. Como se ejemplifica en la Figura 75 para el ensayo de enlace directo, identificamos residuos relevantes potenciales entre los cuatro probados, que son M39 y H40.

Se ha decidido el analizar múltiples mutantes del dominio 224G11 VL humanizado HZ VL4 cuando se expresan en combinación con el dominio 224G11 VH humanizado HZ VH0. Como se muestra en la Figura 76 para el ensayo de enlace directo y en la Figura 77 para el ensayo de competencia de enlace HGF, múltiples mutantes aminoácidos del dominio variable VL4 se analizaron para identificar la mejor combinación humanizada. Basándose en el análisis de mutantes sencillo, se ha enfocado en mutantes dobles y triples que pueden exhibir las mejores actividades anti-cMet. El mutante VH0/VL4-2x corresponde al dominio VH humanizado HZ VH0 224G11 expresado con el dominio VL humanizado HZ VL4 224G11 con la doble mutación L4M/R84G. El mutante VH0/VL4-3x corresponde al dominio VH humanizado HZ VH0 224G11 expresado con el dominio VL humanizado HZ VL4 224G11 con la mutación triple L4M/M39L/R84G.

Dados los datos experimentales obtenidos respecto a las propiedades de enlace anti-cMet del anticuerpo

224G11 totalmente humanizado, el análisis bioinformático de ambas secuencias de dominios variables de cadena ligera y pesada, se realiza para evaluar el nivel de "calidad/carácter humano" de las versiones mejor humanizadas VH0/VL4-2x y VH0/VL4-3x. Se ha demostrado previamente la humanización "completa-IMGT" del dominio VH0 224G11 VH. Respecto al nivel de "calidad/carácter humano" de las versiones de dominio VL humanizadas VL4-2x y -3x 224G11, solo contienen residuos murinos M39 y/o H40. Estos dos residuos clave potenciales se ubican al final de CDR1, M39 es el ancla CDR N-terminal. Dado el problema de longitud de CDR que enfrentamos durante la humanización del dominio 224G11 VL, y considerando estas posiciones como parte de la definición Kabat de VL CDR1, el nivel de "calidad/carácter humano" del anticuerpo 224G11 totalmente humanizado deberá exhibir una fuerte inmunogenicidad reducida debido a los residuos murinos conservados mínimos.

Listado de secuencias

<110> Pierre Fabre Medicament GOETSCH, Liliane

<120> Nuevos anticuerpos que inhiben dimerización de c-Met, y sus utilizaciones

<130> D25728

<150> EP 07301231.2

<151> 2007-07-12

<150> US 60/929,789

<151> 2007-07-12

<150> US 61/020,639

<151> 2008-01-11

<160> 71

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 1

Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr Thr

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 2

Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala

1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 3

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 4

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Thr
1 5

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

10 <400> 5

Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr
1 5

15 <210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> mus musculus

20 <400> 6

Ala Arg Glu Glu Ile Thr Lys Asp Phe Asp Phe
1 5 10

25 <210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> mus musculus

30 <400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn
1 5

35 <210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 8

Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr
1 5

40 <210> 9
<211> 14
<212> PRT

45 <213> mus musculus

<400> 9

Ala Arg Gly Arg Tyr Val Gly Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

50 <210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> mus musculus

55 <400> 10

Glu Ser Val Asp Ser Tyr Ala Asn Ser Phe
1 5 10

60

<210> 11
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 5 <400> 11
 Arg Ala Ser
 1
 10 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 15 <400> 12
 Gln Gln Ser Lys Glu Asp Pro Leu Thr
 1 5
 20 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 25 <400> 13
 Glu Ser Ile Asp Thr Tyr Gly Asn Ser Phe
 1 5 10
 30 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 <400> 14
 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr
 35 1 5
 <210> 15
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 40 <400> 15
 Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 1 5
 45 <210> 16
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 50 <400> 16
 Ala Ala Thr
 1
 55 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 60 <400> 17

ES 2 686 335 T3

Gln His Phe Trp Gly Pro Pro Tyr Thr
1 5

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 18

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

<210> 19

<211> 118

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 19

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

<210> 20

<211> 121

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 20

ES 2 686 335 T3

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

<210> 21
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 21

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

<210> 22
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 22

Gly 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 Val Ser Glu Ser Ile Asp Thr Tyr
 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 Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
 100 105 110

<210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 23

ES 2 686 335 T3

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

5 <210> 24
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> mus musculus

 10 <400> 24
 ggatacatat tactgcata cacc 24

 15 <210> 25
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> mus musculus

 20 <400> 25
 attaaaccaa acaatggtct tgct 24

 25 <210> 26
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> mus musculus

 30 <400> 26
 gcaagatctg agattacgac ggaattgac tac 33

 35 <210> 27
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> mus musculus

 40 <400> 27
 ggattatcat tactgacta cacc 24

 45 <210> 28
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> mus musculus

 50 <400> 28
 attaatcctt acaatggtgg tact 24

 <210> 29
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> mus musculus

 <400> 29

	gcaagagagg aaattacgaa ggactttgat ttc	33
5	<210> 30 <211> 24 <212> ADN <213> mus musculus	
10	<400> 30 ggatacacat tcaactgacta caac	24
15	<210> 31 <211> 24 <212> ADN <213> mus musculus	
20	<400> 31 attaatccta acaatggtgg tact	24
25	<210> 32 <211> 42 <212> ADN <213> mus musculus	
30	<400> 32 gcaagaggga ggtatgttgg ttactactat gctatggact ac	42
35	<210> 33 <211> 30 <212> ADN <213> mus musculus	
40	<400> 33 gaaagtgttg atagtatgc caatagtttt	30
45	<210> 34 <211> 9 <212> ADN <213> mus musculus	
50	<400> 34 cgtgcatcc	9
55	<210> 35 <211> 27 <212> ADN <213> mus musculus	
60	<400> 35 cagcaaagta aggaggatcc tctcacg	27
65	<210> 36 <211> 30 <212> ADN <213> mus musculus	
	<400> 36 gaaagtattg atacttatgg caatagtttt	30

ES 2 686 335 T3

	<210> 37		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> mus musculus		
5	<400> 37		
	cagcaaagta atgaggatcc attcacg		27
10	<210> 38		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> mus musculus		
15	<400> 38		
	gagaatatatt acagtaat		18
20	<210> 39		
	<211> 9		
	<212> ADN		
	<213> mus musculus		
25	<400> 39		
	gctgcaaca		9
30	<210> 40		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> mus musculus		
	<400> 40		
35	caacattttt ggggtcctcc gtacacg		27
	<210> 41		
	<211> 354		
	<212> ADN		
40	<213> mus musculus		
	<400> 41		
	gagggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60		
	tcttgcaaga cttctggata catattcact gcatacacca tgcactgggt gaggcagagc 120		
	cttgagagaga gccttgactg gattggaggt attaaaccaa acaatggtct tgctaactac 180		
	aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240		
	atggacctcc gcagcctgac atctgaggat tctgcagtct attactgtgc aagatctgag 300		
	attacgaacgg aattttgacta ctggggccaa ggcaccgctc tcacagtctc ctca 354		
45	<210> 42		
	<211> 354		
	<212> ADN		
	<213> mus musculus		
50	<400> 42		
	gagggtccagc tgcaacagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagatt 60		
	tcttgcaagg cttctgggta ttcattcact gactacaccc tgaactgggt gaagcagagc 120		
	catggaaaga cccttgagtg gattggactt attaatcctt acaatggtgg tactacctac 180		
	aaccagaagt tcaagggcaa ggccacatta actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240		
	atggagctcc tcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagaggaa 300		
	attacgaagg actttgatth ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354		
55	<210> 43		
	<211> 363		

<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 43

5
gaggtcctgc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
ccctgcaagg cttctggata cacattcact gactacaaca tggactgggt gaagcagagc 120
catggaatga gccttgagtg gattggagat attaatccta acaatgggtg tactatcttc 180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
atggagctcc gcagcctgac atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagagggagg 300
tatgttggtt actactatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 44

<211> 333

10 <212> ADN
<213> mus musculus

<400> 44

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggtgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atatcctgca gagccagtga aagtgtgat agttatgcca atagttttat gcactggtac 120
cagcagaaac caggacagcc acccaaacct ctcactatc gtgcacccaa cctagaatct 180
gggatccctg ccagggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240
cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtaagga ggatcctctc 300
15 acgttcgggt cggggacaaa attggaaatg aaa 333

<210> 45

<211> 333

20 <212> ADN
<213> mus musculus

<400> 45

ggcattgtgt tgaccaatc tccagcttct ttggtgtgt ctctaggaca gagggccacc 60
atatcctgca gagtcagtga aagtattgat acttatggca atagttttat aactggtac 120
cagcagaaac caggacagcc acccaaacct ctcactatc gtgcacccaa cctagaatct 180
gggatccctg ccagggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240
cctgtggagg ctgatgatc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccattc 300
25 acgttcgggt cggggacaaa gttggaaatg aaa 333

<210> 46

<211> 321

30 <212> ADN
<213> mus musculus

<400> 46

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc 60
atcacatgtc gagcaagtga gaatatctac agtaatttag catggtatca gcagaaacag 120
ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgct gcaacaaact tagtagatgg tgtgccatca 180
aggttcagtg gcagtggtac aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct 240
gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttgggggc ctccgtacac gttcggaggg 300
35 gggaccaagc tggagataaa g 321

<210> 47

<211> 24

40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para gen doméstico proteína Ribosomal, grande, P0 (RPL0)

<400> 47

45 gaaactctgc attctgctt cctg

	<210> 48	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador para gen doméstico proteína Ribosomal, grande, P0 (RPL0)	
	<400> 48	
10	aggactcgtt tgtaccggt ga	22
	<210> 49	
	<211> 26	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para gen doméstico proteína Ribosomal, grande, P0 (RPL0)	
20	<400> 49	
	tgcagattgg ctacccaact gttgca	26
25	<210> 50	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador para HGF	
	<400> 50	
35	aacaatgcct ctggttcc	18
	<210> 51	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para HGF	
45	<400> 51	
	ctgttagctg cgtcctttac	20
	<210> 52	
50	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Sonda para HGF	
	<400> 52	
	ccttcaatag catgtcaagt ggagtga	27
60	<210> 53	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Cebador para c-Met	

	<400> 53 cattaaagga gacctcacca tagctaata	28
5	<210> 54 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador para c-Met <400> 54	
15	cctgatcgag aaaccacaac ct	22
20	<210> 55 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sonda para c-Met	
25	<400> 55 catgaagcga ccctctgatg tccca	25
30	<210> 56 <211> 8 <212> PRT <213> mus musculus <400> 56	
35	Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp 1 5	
40	<210> 57 <211> 8 <212> PRT <213> mus musculus <400> 57	
45	Ile Asn Pro Thr Thr Gly Ser Thr 1 5	
50	<210> 58 <211> 11 <212> PRT <213> mus musculus <400> 58	
55	Ala Ile Gly Gly Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr 1 5 10	
60	<210> 59 <211> 7 <212> PRT <213> mus musculus <400> 59	

ES 2 686 335 T3

Ser Ser Val Ser Ser Thr Tyr
 1 5
 <210> 60
 <211> 3
 5 <212> PRT
 <213> mus musculus
 <400> 60
 Thr Thr Ser
 10 1
 <210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> mus musculus
 <400> 61
 His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
 1 5
 20 <210> 62
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 25 <400> 62
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Thr Thr Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Leu
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Gly Gly Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115
 30 <210> 63
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 35 <400> 63
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45
 Ile Tyr Thr Thr Ser Ile Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80
 Thr Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
 100 105

	<210> 64	
	<211> 24	
	<212> ADN	
5	<213> mus musculus	
	<400> 64	
10	ggctacactt ttacttcta ctgg	24
	<210> 65	
	<211> 24	
	<212> ADN	
15	<213> mus musculus	
	<400> 65	
	attaacccta ccactgggtc tact	24
20	<210> 66	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> mus musculus	
25	<400> 66	
	gcaataggag gatatgggtc ctggttgct tac	33
30	<210> 67	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> mus musculus	
35	<400> 67	
	tcaagtgtaa gttcaccta c	21
40	<210> 68	
	<211> 9	
	<212> ADN	
	<213> mus musculus	
	<400> 68	
45	accacatcc	9
50	<210> 69	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> mus musculus	
	<400> 69	
55	catcagtgga gtagttaccc attcacg	27
60	<210> 70	
	<211> 354	
	<212> ADN	
	<213> mus musculus	
	<400> 70	

ES 2 686 335 T3

cagggtccagc	ttcagcagtc	tggggctgaa	ctggcaaaac	ctggggcctc	agtgaagatg	60
tcttgaagg	cttctggcta	cacttttact	tcttactgga	tgaactgggt	gaaacagagg	120
cctggacagg	gtctggaatg	gattggatac	attaacccta	ccactgggtc	tactgactac	180
aatcagaagt	taaaggacaa	ggccacattg	actgcagaca	aatcctccaa	cacagcctac	240
atgcaactga	gcagcctgac	atctgaggac	tctgcagtct	attactgtgc	aataggagga	300
tatgggtect	ggtttgctta	ctggggccaa	gggactctgg	tcactgtctc	tgca	354

<210> 71

<211> 324

5 <212> ADN

<213> mus musculus

<400> 71

caaattgttc	tcacccagtc	tccagcaatc	atgtctgcat	ctcctgggga	gaaggtcacc	60
ttgacctgca	gtgccagctc	aagtgttaagt	tccacctact	tgtactggta	ccagcagaag	120
ccaggatcct	ccccaaaact	ctggatttat	accacatcca	tcctggcttc	tggagtcctt	180
gctcgcttca	gtggcagtg	gtctgggacc	tcttactctc	tcacaatcag	cagcatggag	240
actgaagatg	ctgcctctta	tttctgccat	cagtggagta	gttaccatt	cacgttcggc	300
tcggggacaa	agttggacat	aaaa				324

10

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para seleccionar un anticuerpo anti-c-Met o fragmentos de unión a antígeno divalentes del mismo apto(s) para inhibir la activación dependiente de ligando e independiente de ligando de c-Met, comprendiendo dicho procedimiento:
 - i) cribar los anticuerpos generados y seleccionar los anticuerpos que pueden unirse específicamente a c-Met;
 - ii) evaluar *in vitro* los anticuerpos seleccionados en la etapa i) para la inhibición de la proliferación celular de BxPC3, que comprende las etapas de:
 - a) poner en contacto dichos anticuerpos seleccionados en la etapa i) con las células BxPC3;
 - b) medir la incorporación de [³H]timidina en las células de la etapa a); y
 - c) seleccionar los anticuerpos que conducen a una reducción de la incorporación de [³H]timidina de por lo menos 50%; y
 - iii) analizar los anticuerpos seleccionados de la etapa ii) y seleccionar los anticuerpos que pueden inhibir la dimerización de c-Met.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa iii) consiste en:
 - a) poner en contacto los anticuerpos de la etapa ii) con células que expresan una fusión de c-Met y luciferasa de Renilla (c-Met-RLuc) y una fusión de c-Met y proteína fluorescente amarilla (c-Met-YFP);
 - b) medir la señal de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET); y
 - c) seleccionar los anticuerpos para los que la señal de la etapa b) es $\leq 70\%$ de la señal de BRET de las células que expresan c-Met-RLuc y c-Met-YFP.

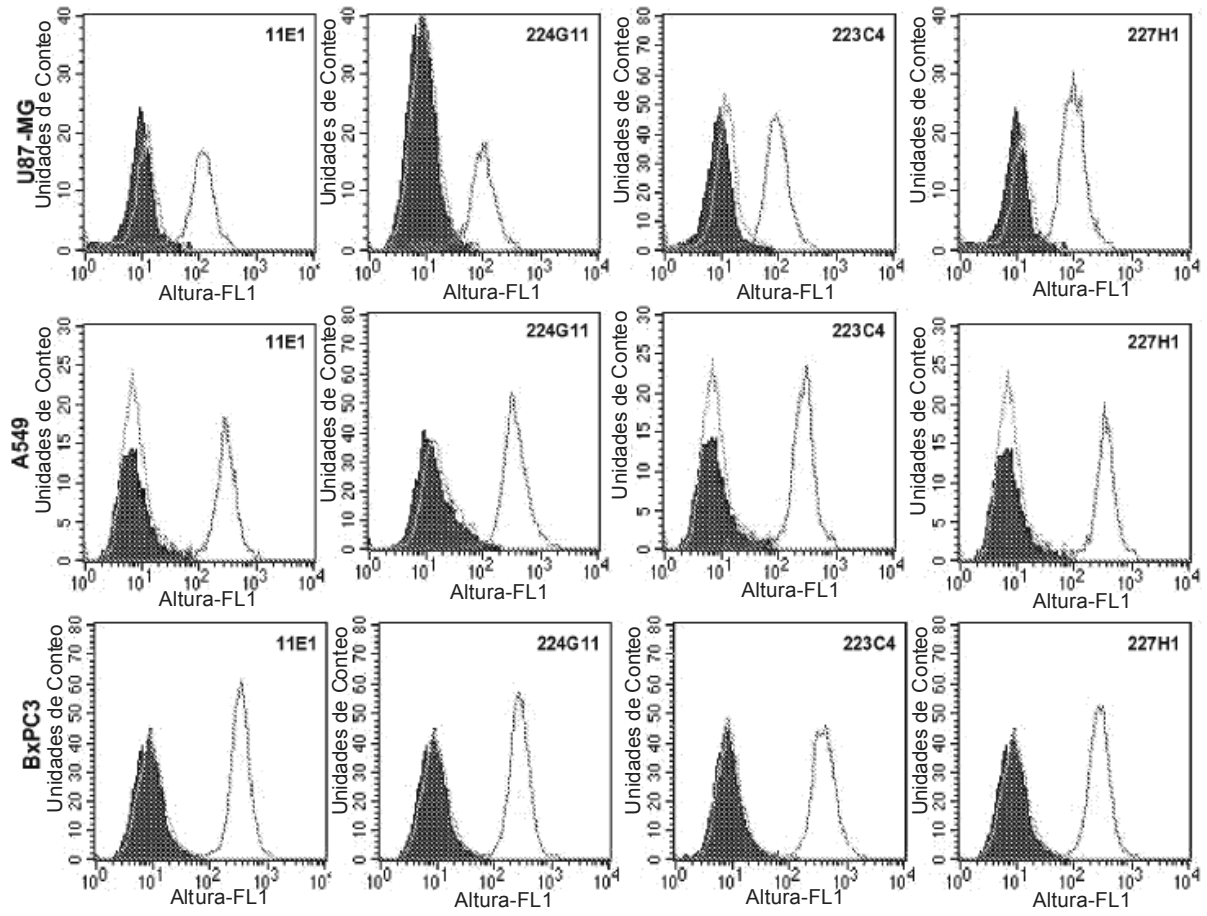


FIGURA 1

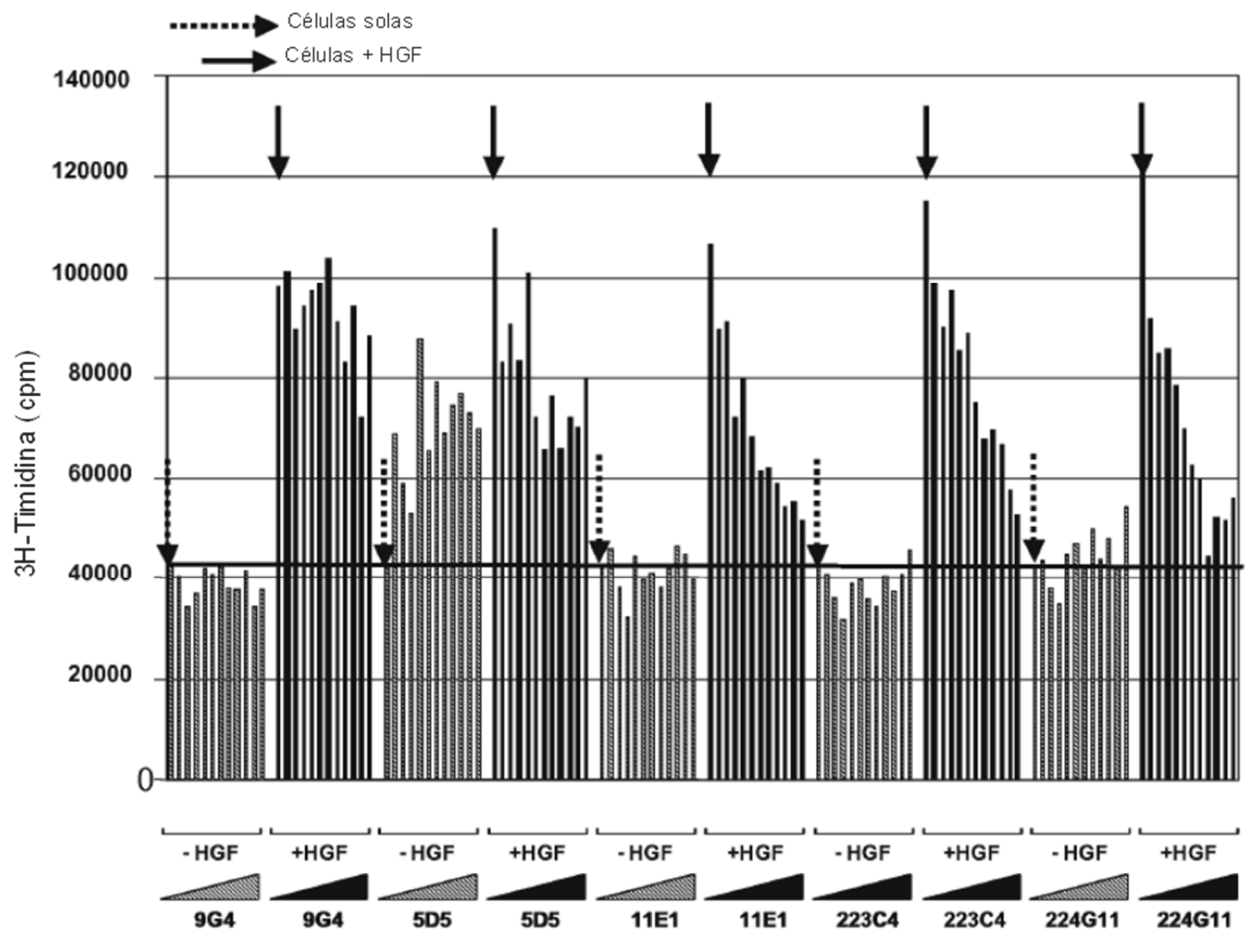


FIGURA 2A

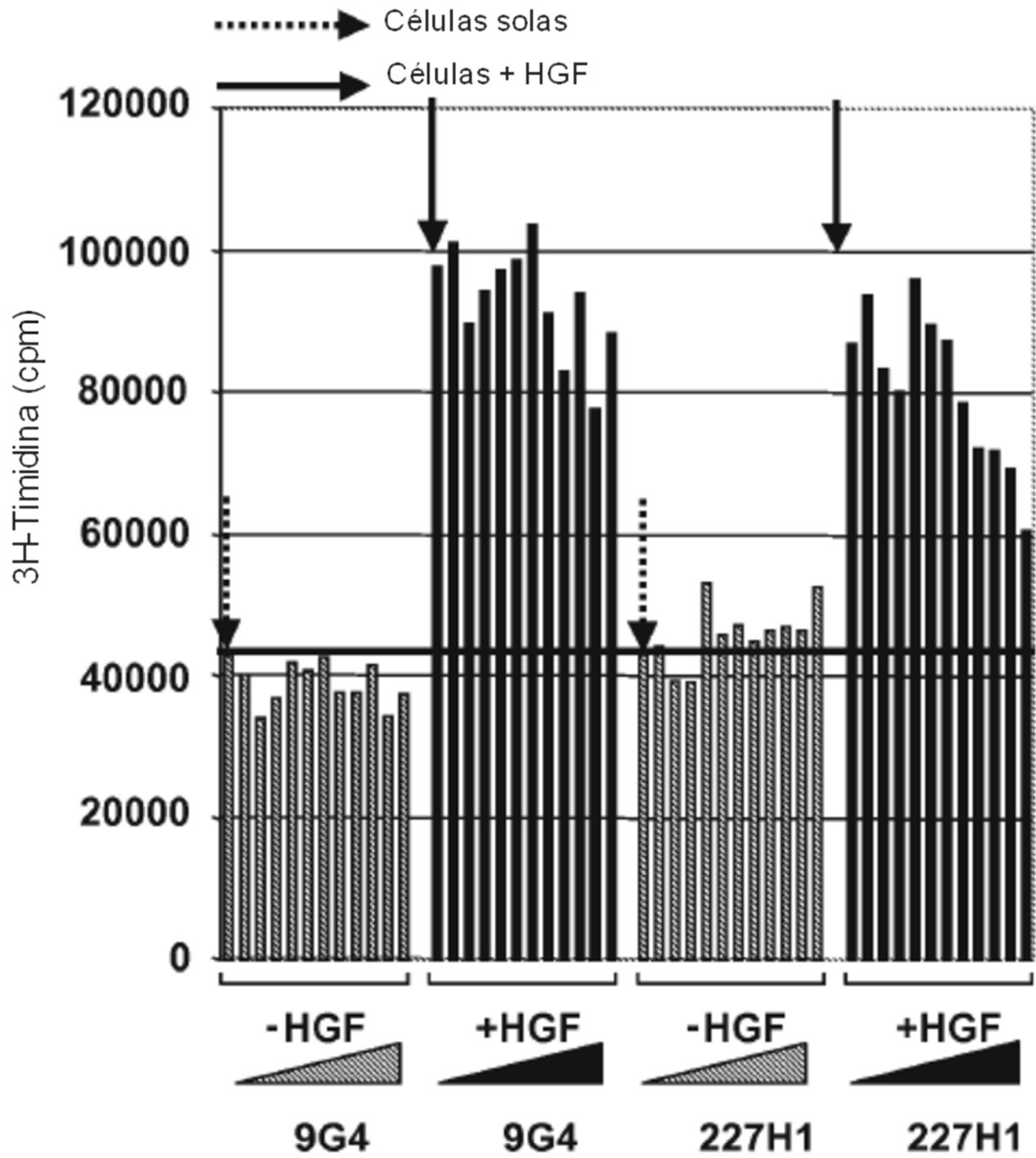


FIGURA 2B

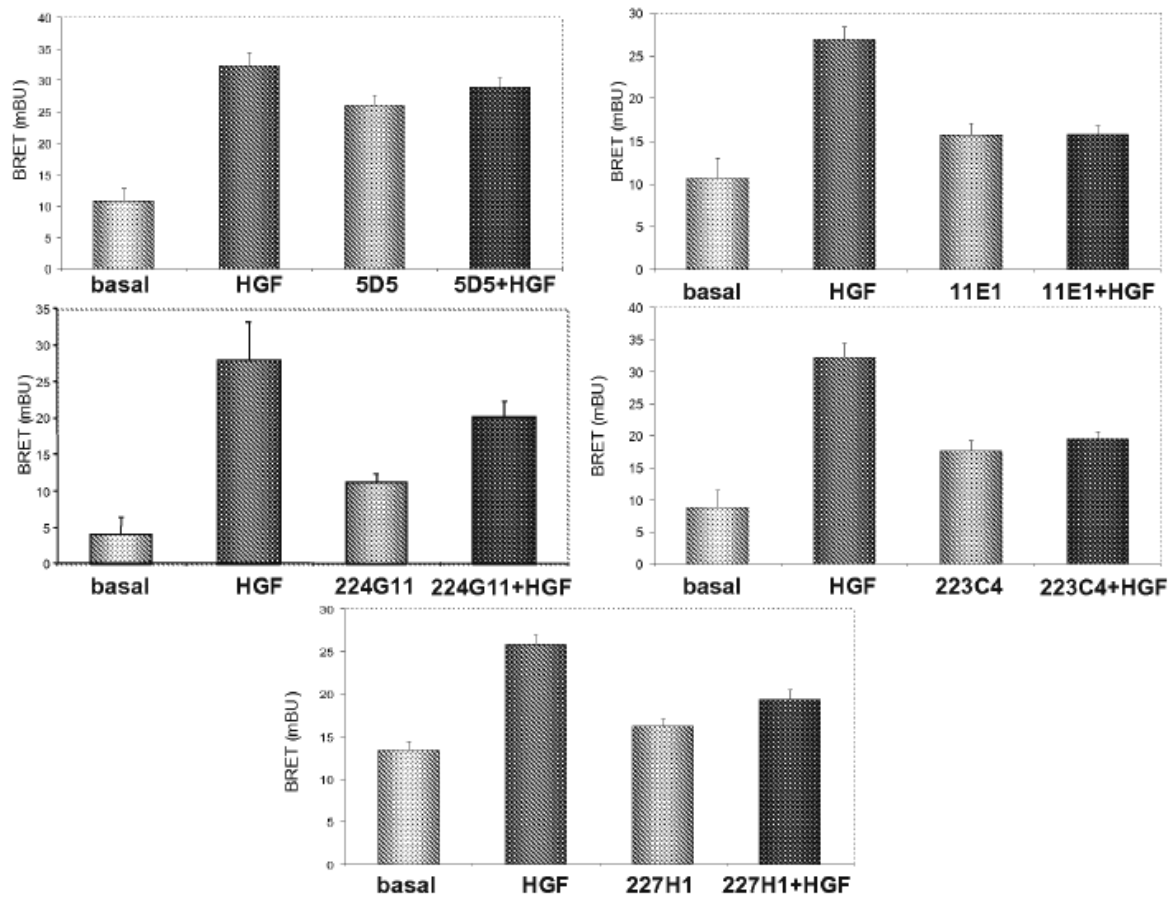


FIGURA 3

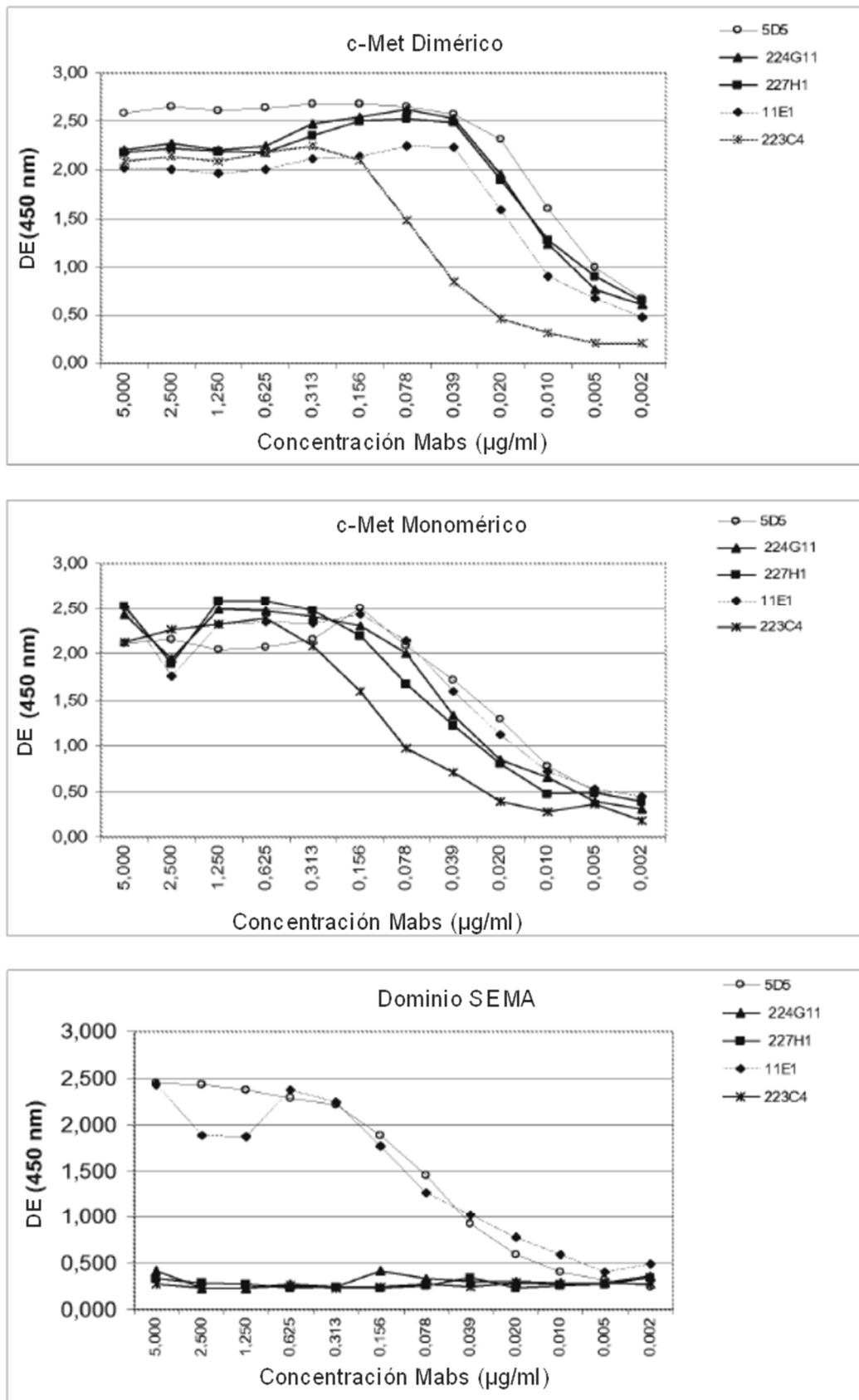


FIGURA 4

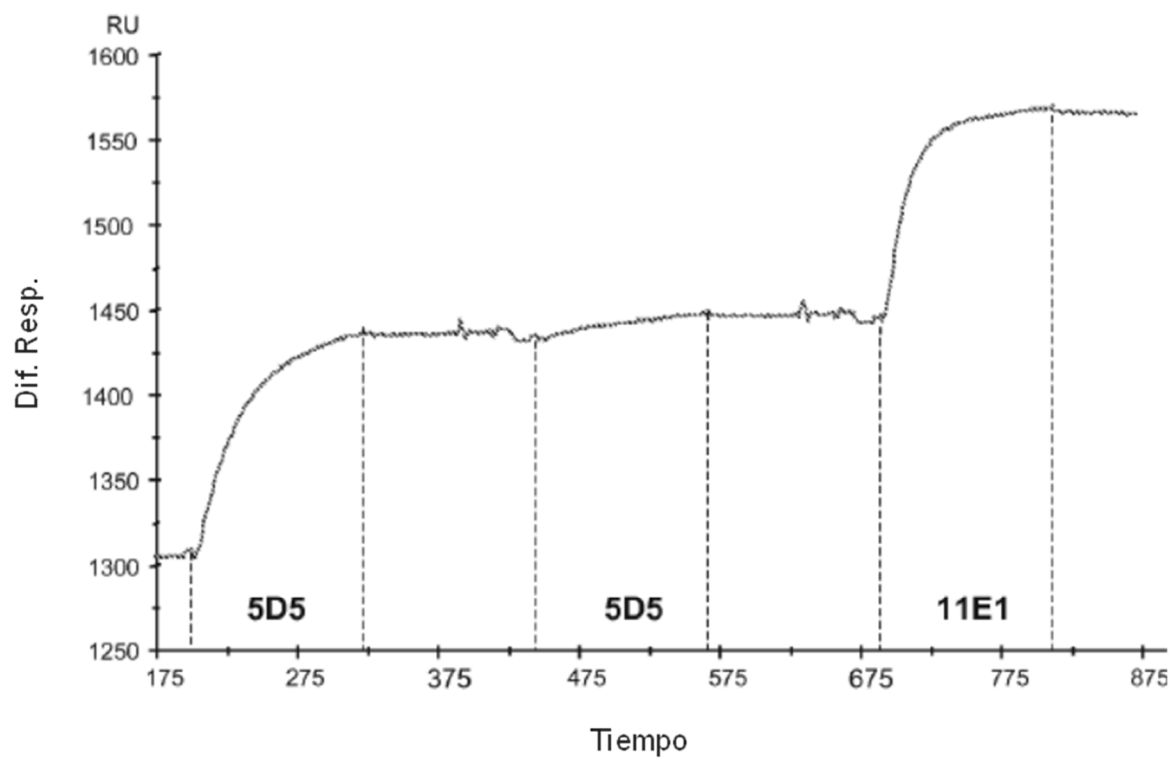


FIGURA 5A

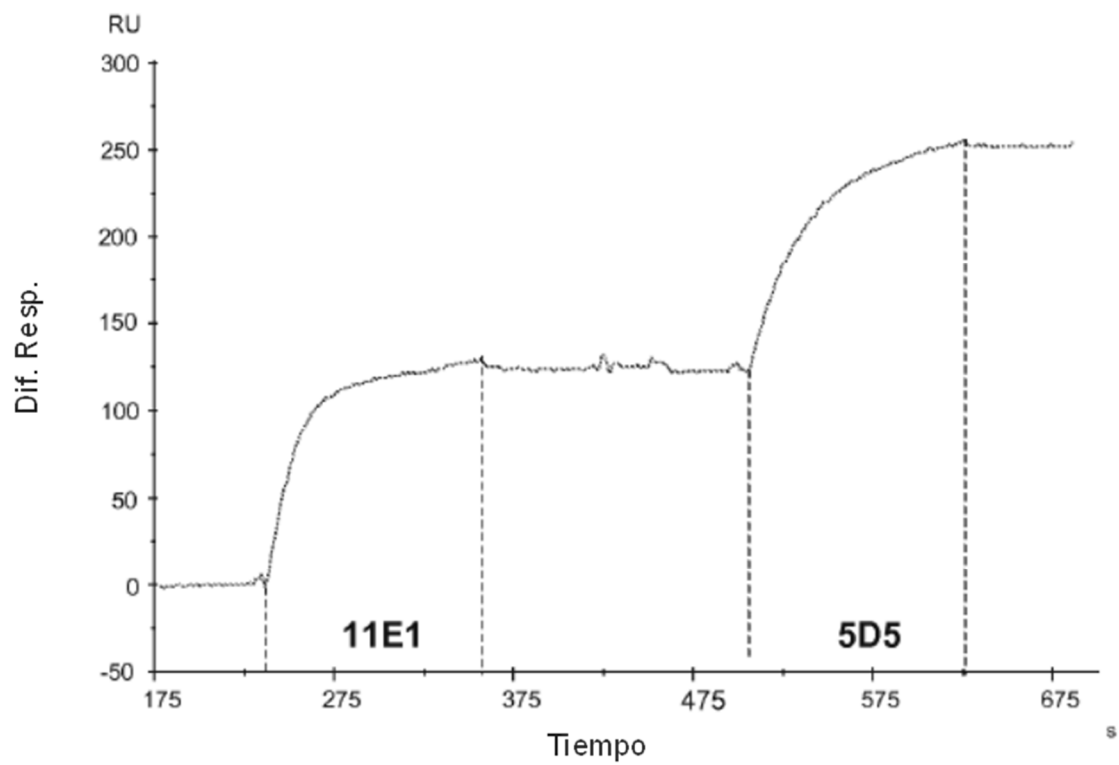


FIGURA 5B

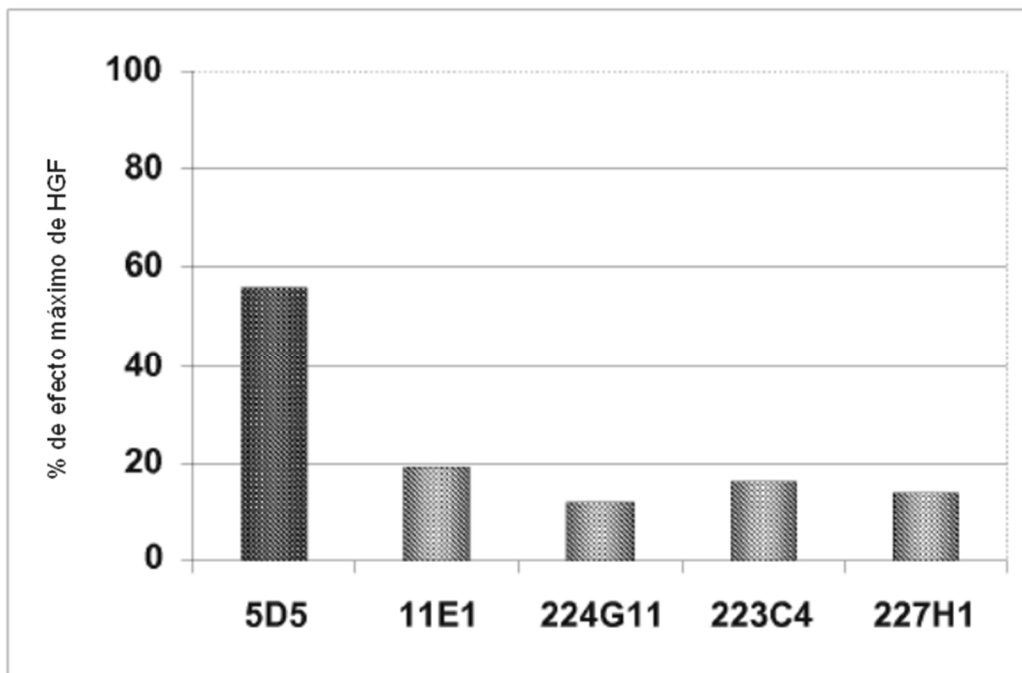


FIGURA 6A

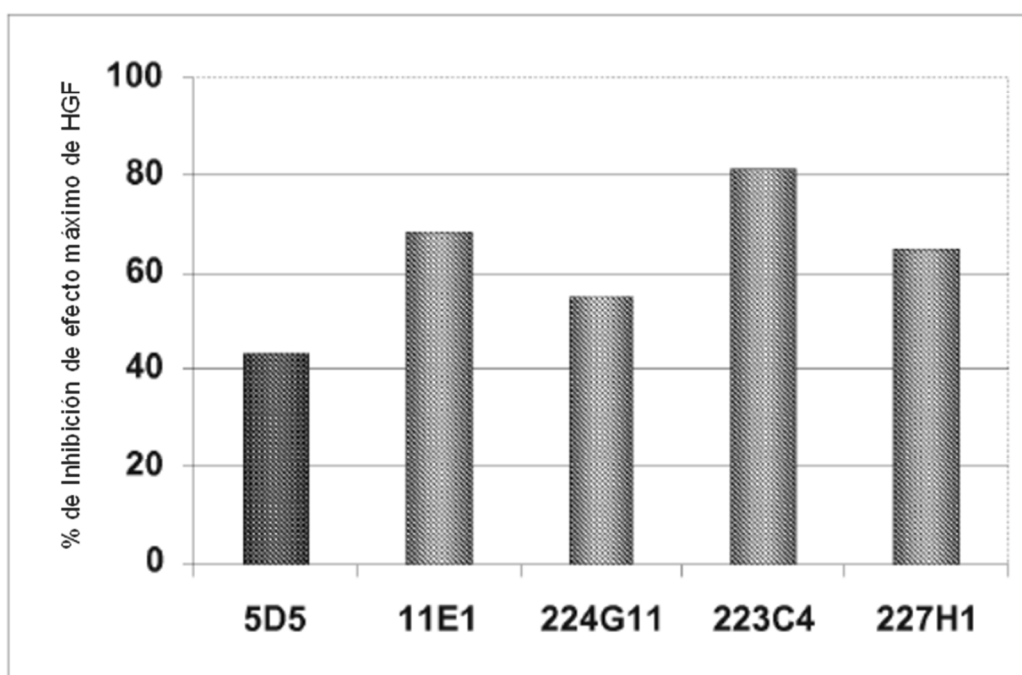


FIGURA 6B

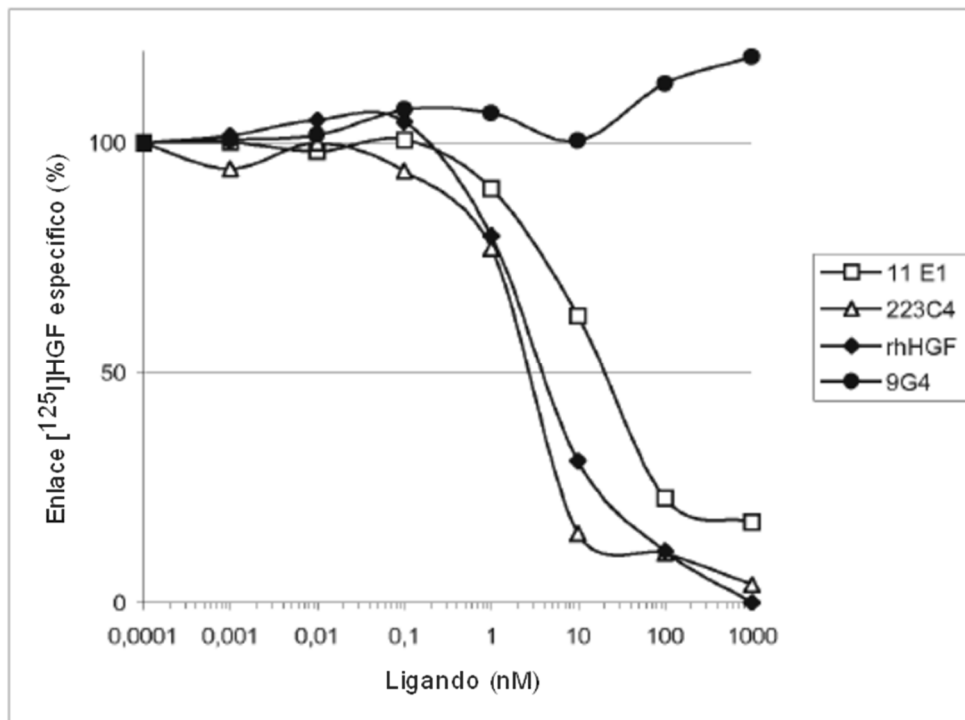


FIGURA 7A

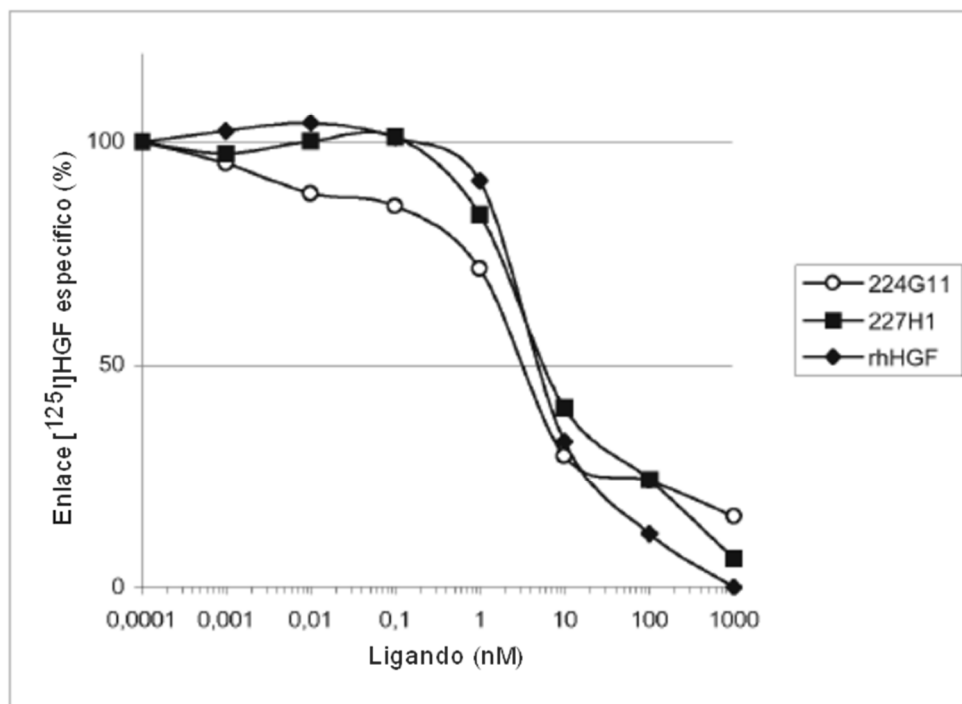


FIGURA 7B

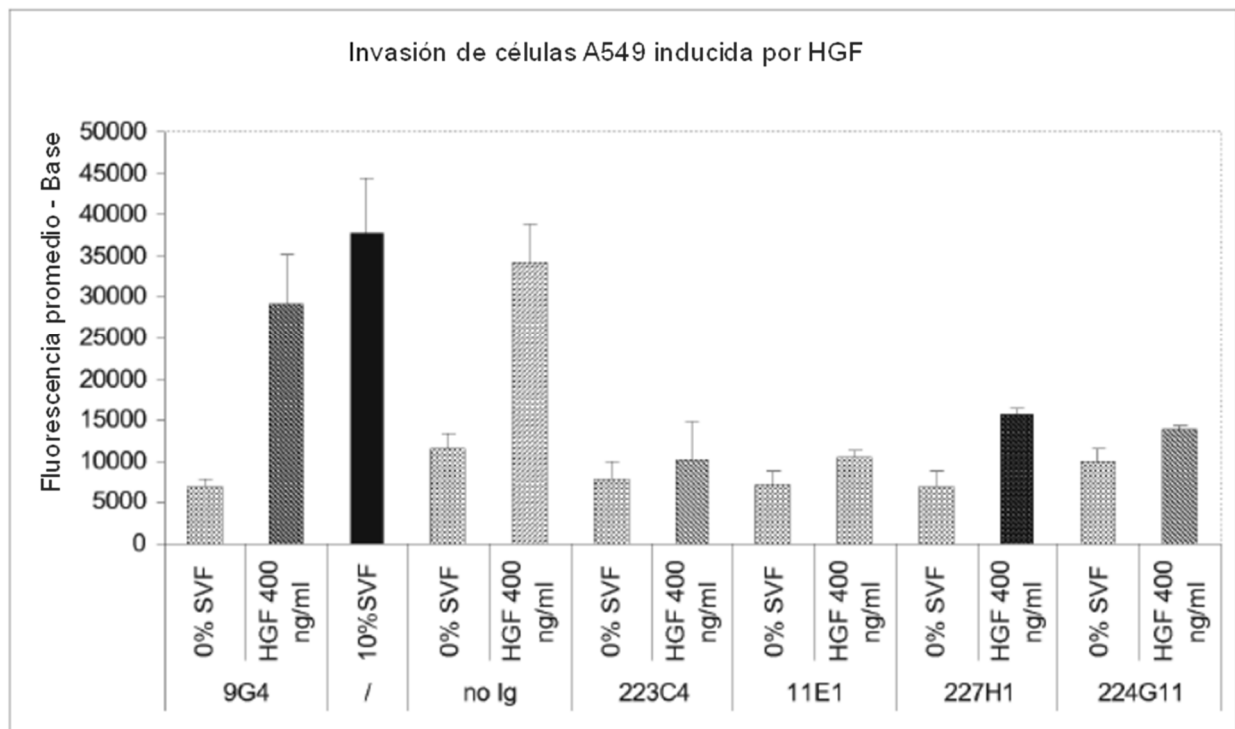


FIGURA 8

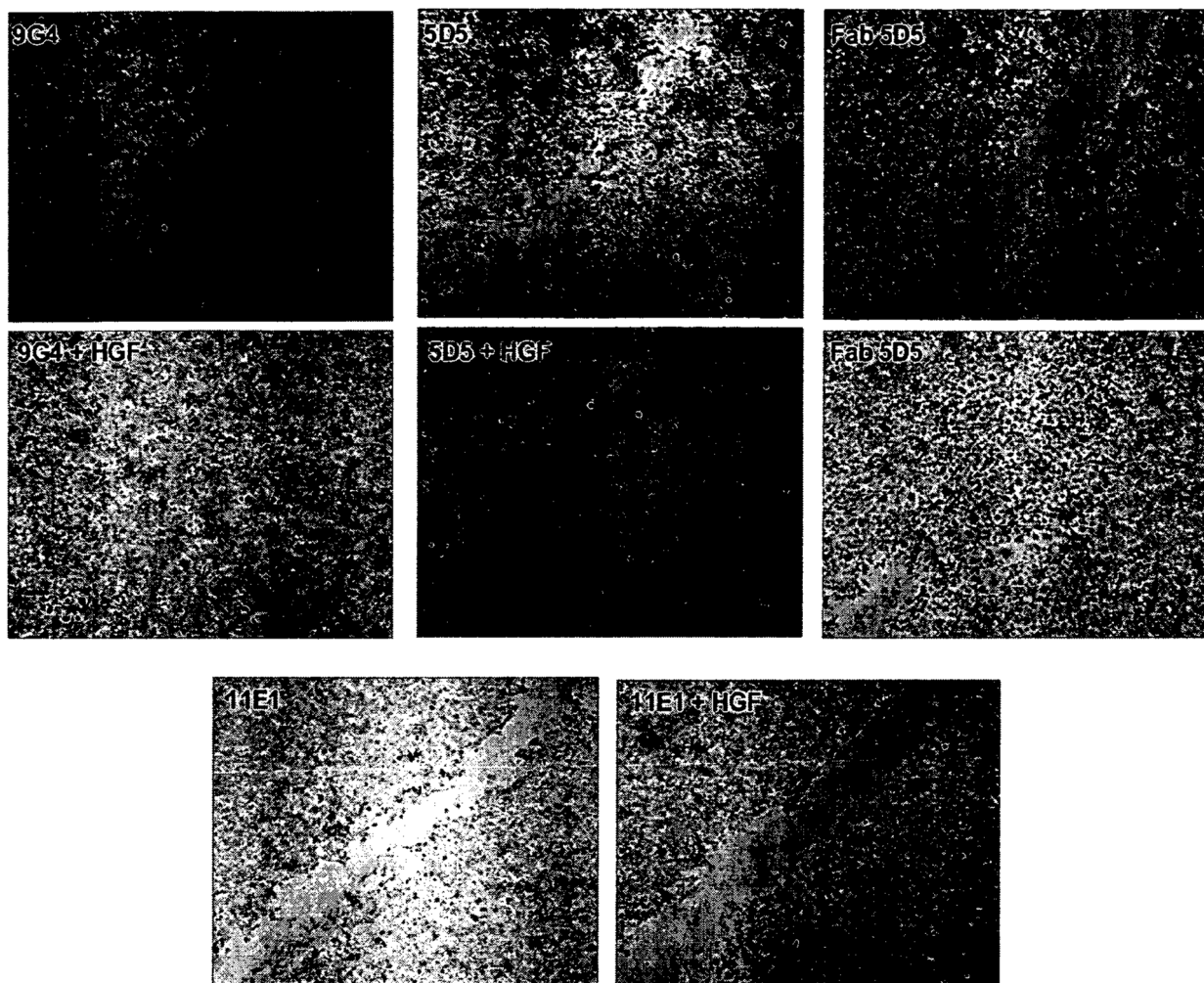


FIGURA 9

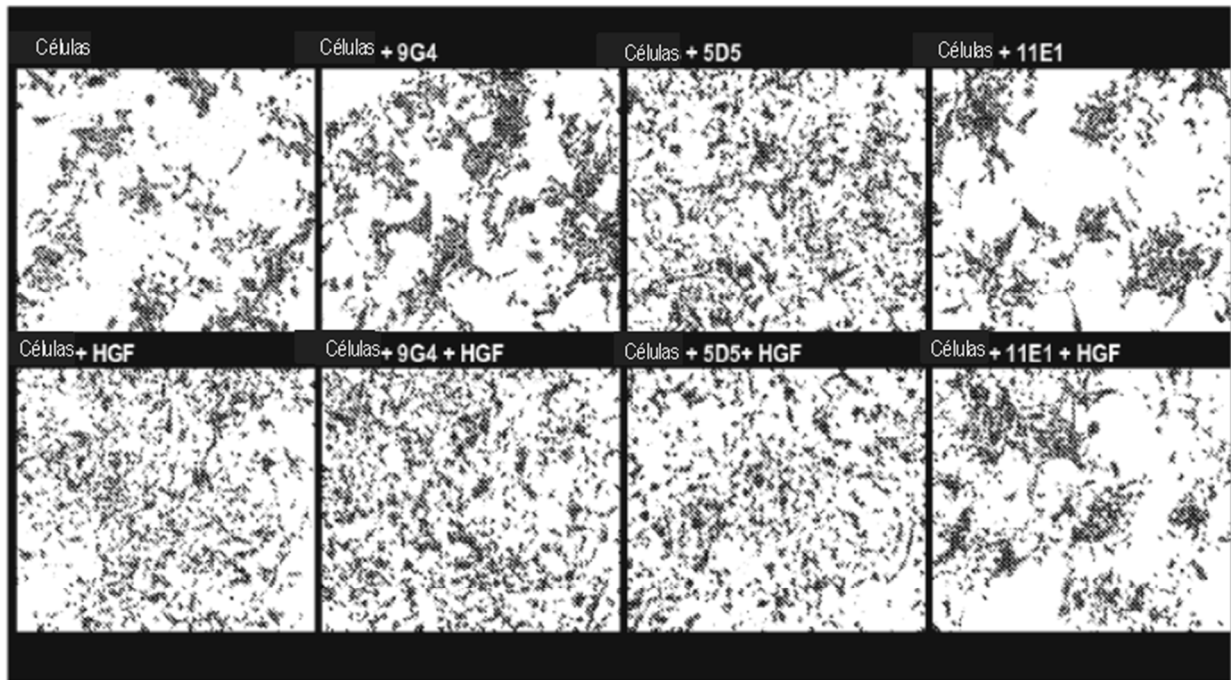


FIGURA 10A

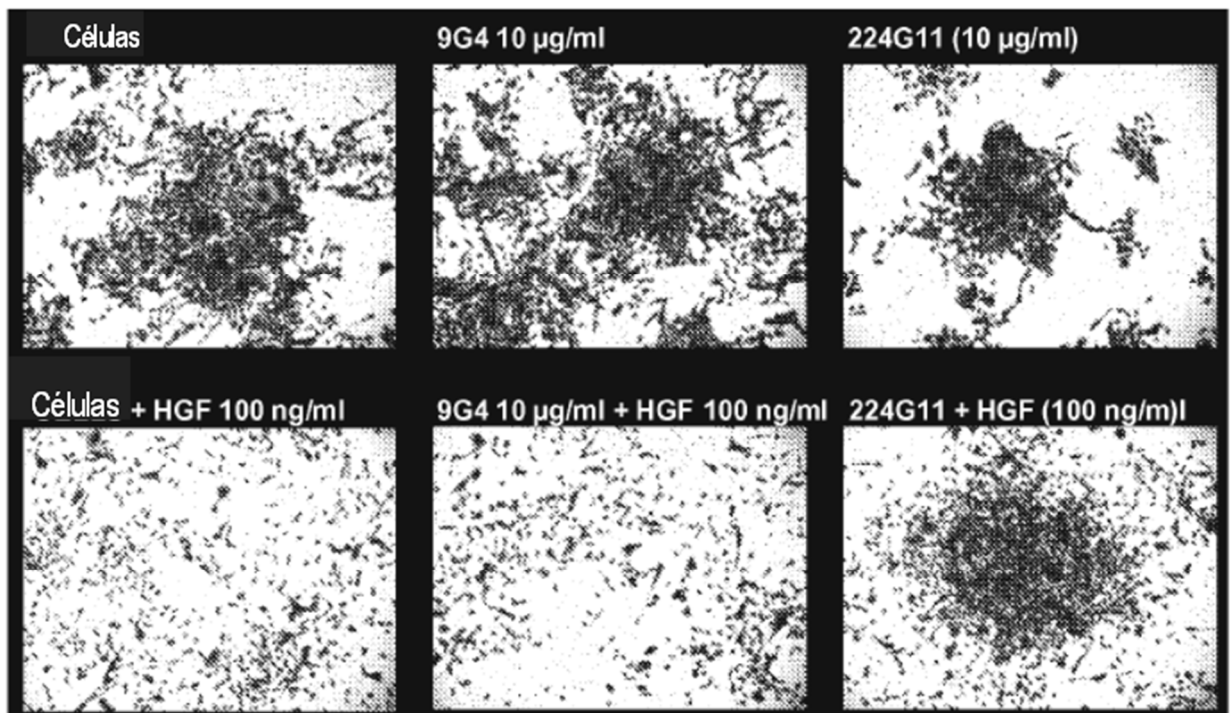


FIGURA 10B

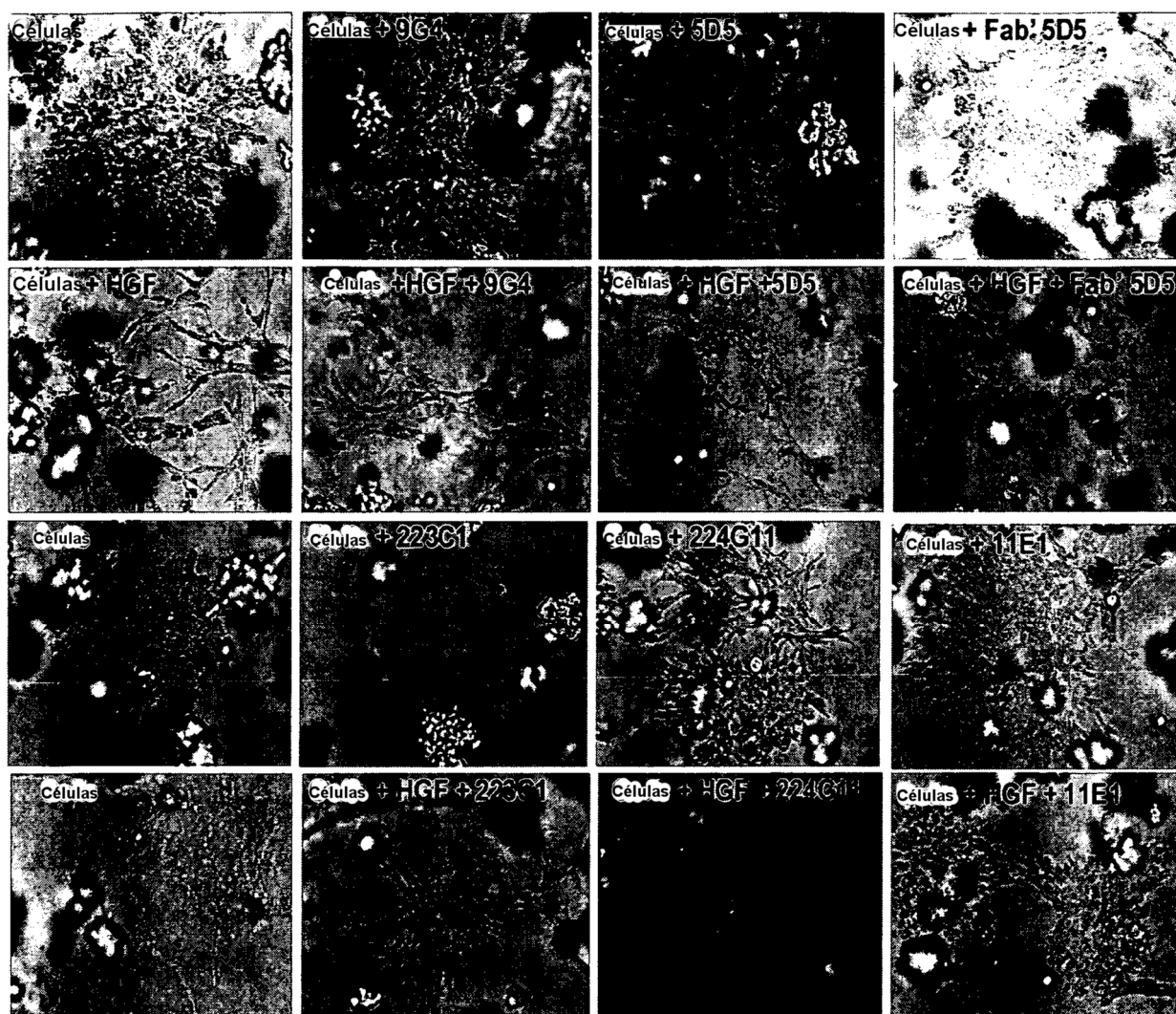


FIGURA 11

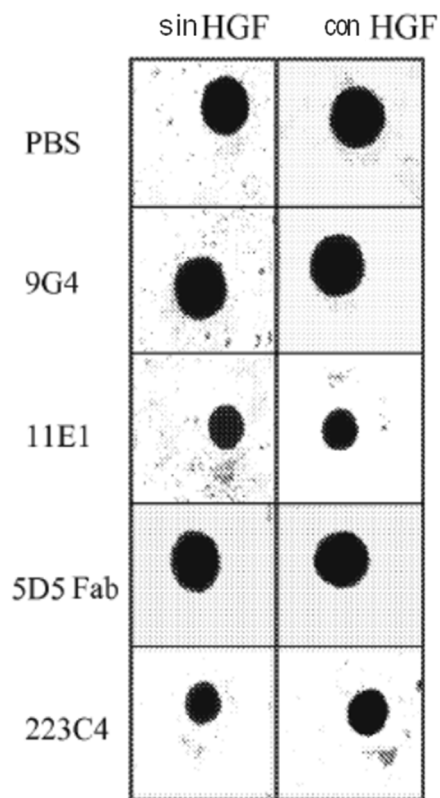


FIGURA 12A

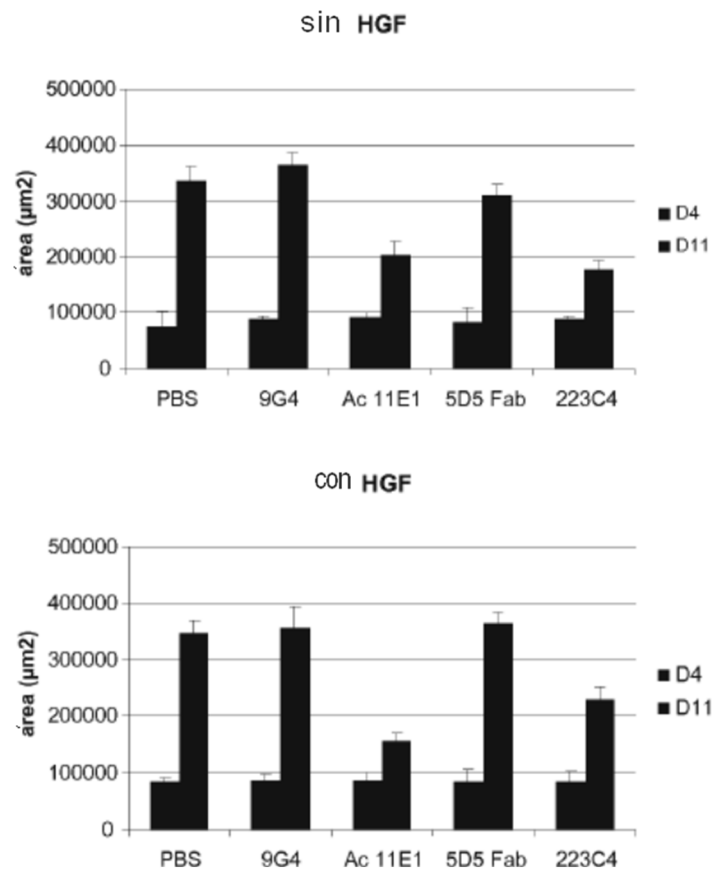


FIGURA 12B

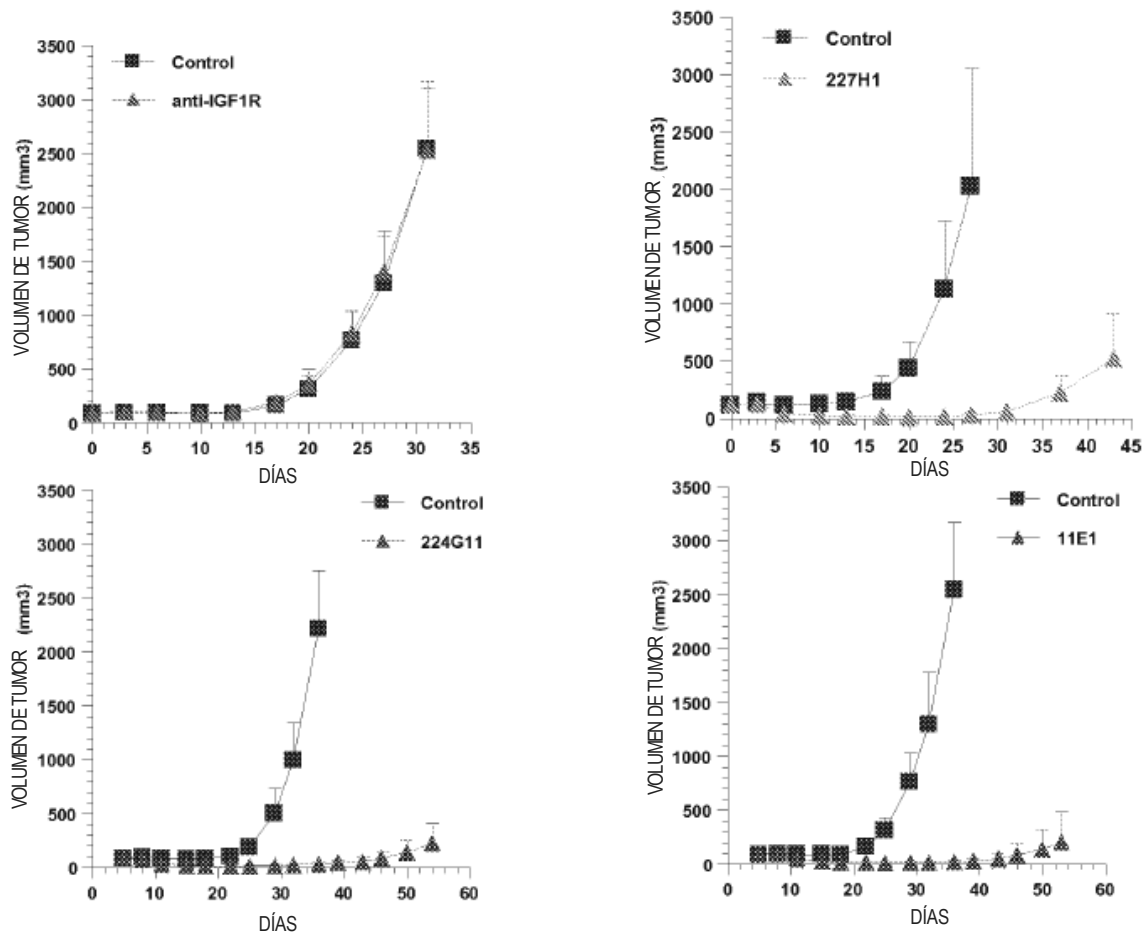


FIGURA 13

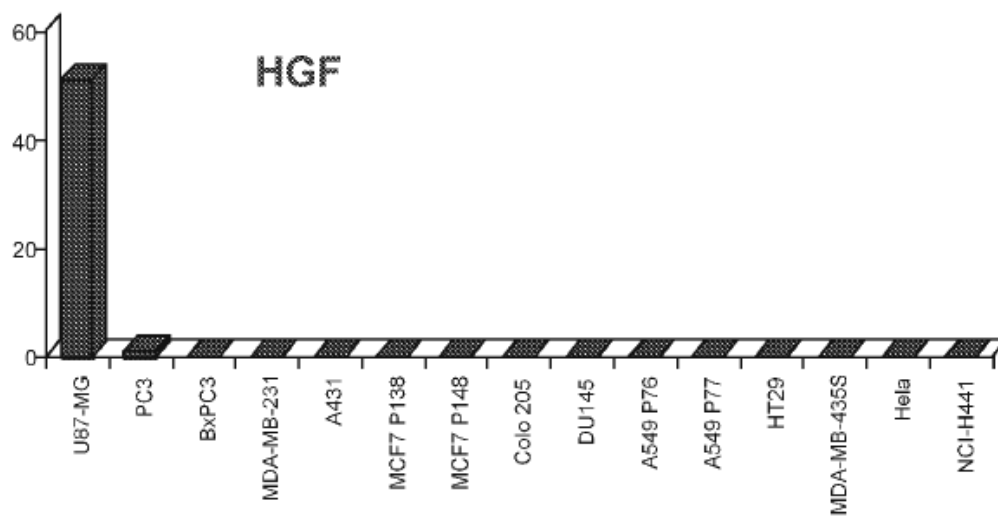


FIGURA 14

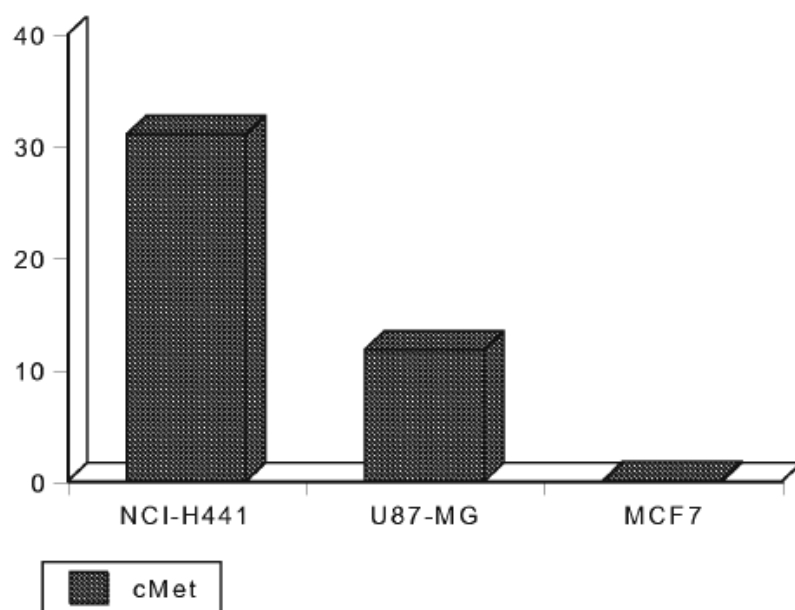


FIGURA 15A

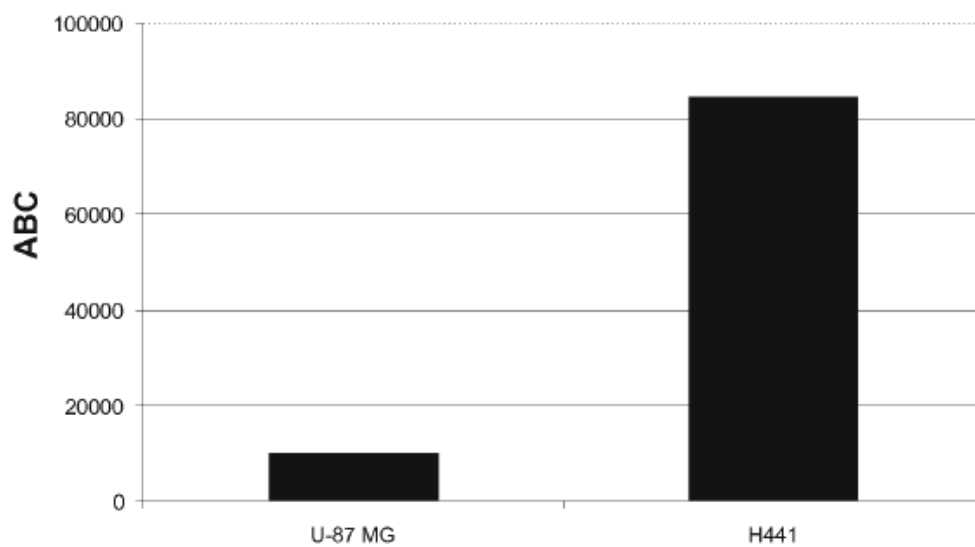


FIGURA 15B

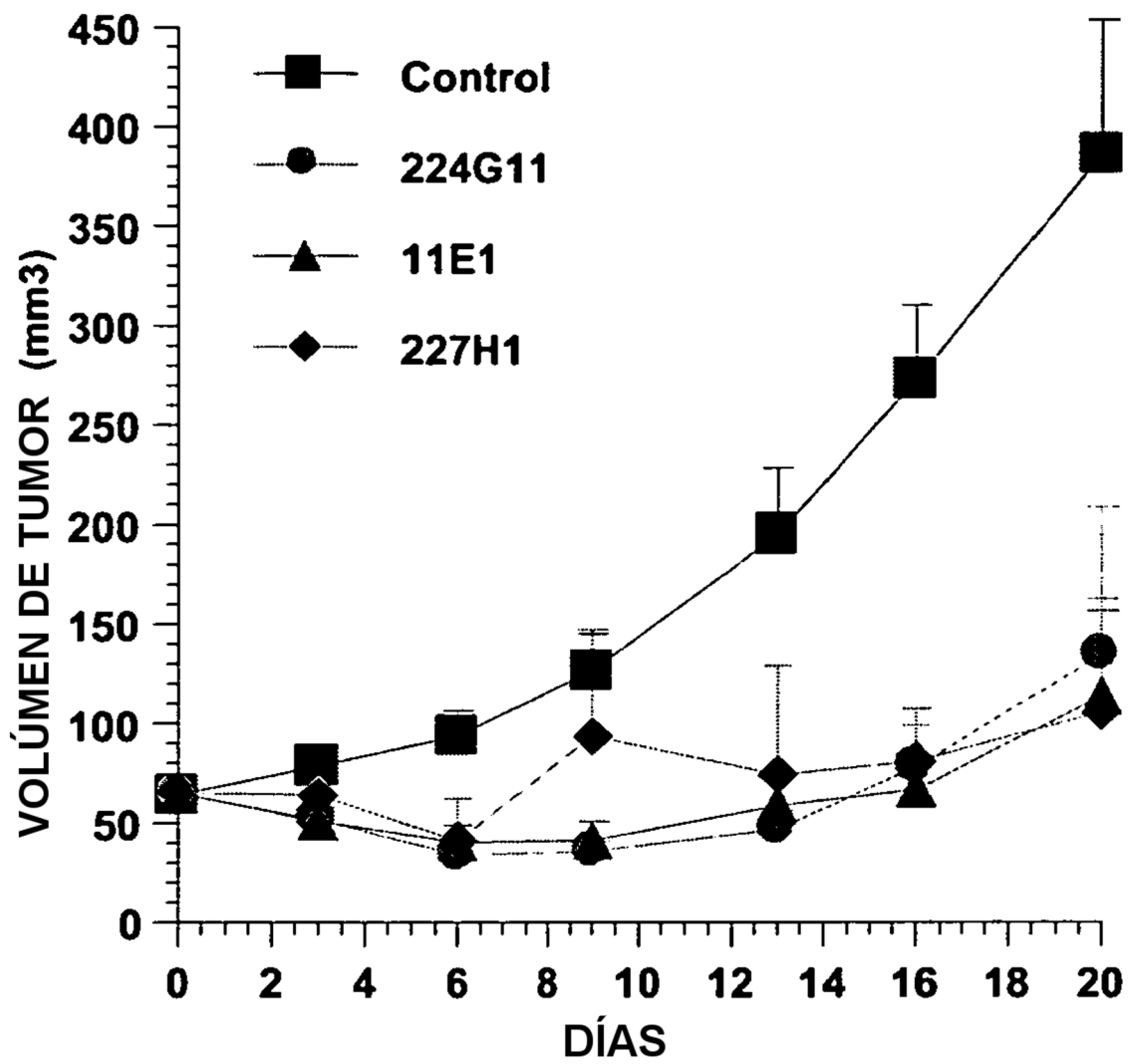


FIGURA 16

ES 2 686 335 T3

```

<----- FR1 - IMGT
1      5      10      15
D I V L T Q S P A S L A V S L
gac att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta

224G11 VL
K02161 IGKV3-5*01

----->
20      25      30
G Q R A T I S C R A S E S V D
ggg cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gaa agt gtt gat

224G11 VL
K02161 IGKV3-5*01

CDR1 - IMGT <-----
35      40      45
S Y A N S F M H W Y Q Q K
agt tat gcc aat agt ttt ... atg cac tgg tac cag cag aaa
G
K02161 IGKV3-5*01
-g- ...

FR2 - IMGT -----> CDR2
50      55      60
P G Q P P K L L I Y R A S
cca gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat cgt gca tcc ...

224G11 VL
K02161 IGKV3-5*01

- IMGT ----->
65      70      75
... N L E S G I P A R
... aac cta gaa tct ggg atc cct ... gcc agg

224G11 VL
K02161 IGKV3-5*01

FR3 - IMGT ----->
80      85      90
F S G S G S R T D F T L T
ttc agt ggc agt ggg ... tct agg aca gac ttc acc ctc acc

224G11 VL
K02161 IGKV3-5*01

----->
95      100      105
I N P V E A D D V A T Y Y C Q
att aat cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt cag

224G11 VL
K02161 IGKV3-5*01

CDR3 - IMGT <----- FR4 - IMGT
110      115      120
Q S K E D P L T F G S G T K L
caa agt aag gag gat cct ctc acg ttc ggc tcg ggg aca aaa ttg
N
K02161 IGKV3-5*01
--t --- -c

----->
123
E M K
224G11 VL
gaa atg aaa

```

FIGURA 17A

ES 2 686 335 T3

[illegible]

FIGURA 17B

ES 2 686 335 T3

```

<----- FR1 - IMGT
1      5      10      15
D I V L T Q S P A S L A V S L
gac att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta
E
--a --- --- t-- --a --g --- --- --c a-c c-- t-- t-- --- -c-
M D

----->
20      25      30
G Q R A T I S C R A S E S V D
ggg cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gaa agt gtt gat
E L
--- g-a --a --- --- c-c --- --- --g --- --- c-g --- --- agc
E N K Q L

--- CDR1 - IMGT -----<-----
35      40      45
S Y A N S F . . M H W Y Q Q K
agt tat gcc aat agt ttt ... .. atg cac tgg tac cag cag aaa
. . . . L A
--c --c ... .. t-a gc- --- --- --a --- ---
N N Y L A

FR2 - IMGT -----> CDR2
50      55      60
P G Q P P K L L I Y R A S
cca gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat cgt gca tcc ... ..
A R D
--t --c --- g-t --- -gg --- --- --- ga- --- --- ... ..
W

- IMGT -----<-----
65      70      75
... .. N L E S G I P A R
... .. aac cta gaa tct ggg atc cct ... gcc agg
... .. R A T
... .. --- agg -cc a-- --c --- --a ... --- ---
T R V D

----- FR3 - IMGT -----
80      85      90
F S G S G S R T D F T L T
ttc agt ggc agt ggg ... .. tct agg aca gac ttc acc ctc acc
G
--- --- --- --- --- g-- --- --- --t --- ---
G

----->
95      100      105
I N P V E A D D V A T Y Y C Q
att aat cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt cag
S S L P E F V
--c -gc agc c-a --- c-- --a --- t-- --- gtt --- --- ---
S S L Q E V

--- CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT -----
110      115      120
Q S K E D P L T F G S G T K L
caa agt aag gag gat cct ctc acg ttc ggc tcg ggg aca aaa ttg
R S N W
--g c-- -gc a-c tgg --- -c
Y Y S T P

----->
123
E M K
gaa atg aaa
224G11 VL

```

FIGURA 18A

ES 2 686 335 T3

	CDR3 -	IMGT		<-----	FR4 -	IMGT	-----									
		110			115		120									
	Q	S	K	E	D	P	L	T	F	G	S	G	T	K	L	
224G11 VL	caa	agt	aag	gag	gat	cct	ctc	acg	ttc	ggc	tcg	ggg	aca	aaa	ttg	
											G				V	
AF103571 IGKJ4*02									--	---	---	---	gga	---	--c	--g g--
	----->															
																123
	E	M	K													
224G11 VL	gaa	atg	aaa													
		I														
AF103571 IGKJ4*02	--g	--c	---	c												

FIGURA 18B

ES 2 686 335 T3

		FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
		1 10 20	30	40 50	60
224G11 VL					
		DIVLTQSPAS SLAVSLGQR ATISCRAS	ESVDSYANSF..	MHWYQQKPGQP PKLLIY	RAS.....
		3 3 3 3 2 3 3		11 2 3	
FR Humano		E-----T-SL-P-E---L-----		LA-----A-R----	
224G11 HZ1VL		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS	ESVDSYANSF..	MHWYQQKPGQAP RLLIY	RAS.....
		FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-113)	FR4-IMGT (114-123)	
		70 80 90 100	110	120	
224G11 VL					
		N LE SGIP.ARFSGSG.. SRTDFTLTINPVE ADDVATYYC	QQSKEDPLT	FGSGTK LEM K	
		223 1 323 33 2 3		3 3 3	
FR Humano		-RAT---.-----.-G-----SSL-PE-F-V---		--G---V-I-	
224G11 HZ1VL		NRATGIP.ARFSGSG.. SRTDFTLT ISSLEPEDFAVYYC	QQSKEDPLT	FGGGTKVEIK	

FIGURA 19A

		FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
		1 10 20	30	40 50	60
224G11 VL					
		DIVLTQSPAS SLAVSLGQR ATISCRAS	ESVDSYANSF..	MHWYQQKPGQP PKLLIY	RAS.....
		1 3 3 3 3 32		11	
FR Humano		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS		LAWYQQKPGQP	PKLLIY
224G11 HZ2VL		DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSS	ESVDSYANSF..	MHWYQQKPGQP PKLLIY	RAS.....
		FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-113)	FR4-IMGT (114-123)	
		70 80 90 100	110	120	
224G11 VL					
		N LE SGIP.ARFSGSG.. SRTDFTLTINPVE ADDVATYYC	QQSKEDPLT	FGSGTK LEM K	
		22 3 3 1 3233 3 3		3 3 3	
FR Humano		TRESGVP.DRFSGSG.. SGTDFTLT ISSLQAEDVAVYYC		FGGGTKVEIK	
224G11 HZ2VL		TRESGVP.DRFSGSG.. SRTDFTLT ISSLQAEDVAVYYC	QQSKEDPLT	FGGGTKVEIK	

FIGURA 19B

ES 2 686 335 T3

```

<----- FR1 - IMGT
1      5      10      15
E  V  Q  L  Q  Q  S  G  P      E  L  V  K  P
gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct ... gag ctg gtg aag cct

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

----->
20      25      30
G  A  S  V  K  I  S  C  K  T  S  G  Y  I  F
ggg gct tca gtg aag ata tcc tgc aag act tct gga tac ata ttc
P      A      T
c-- --g-- --c--

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

--- CDR1 - IMGT <-----
35      40      45
T  A  Y  T      M  H  W  V  R  Q  S
act gca tac acc ... atg cac tgg gtg agg cag agc
D      N      D      K
-ac -a- ... -g-- -a-

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

FR2 - IMGT -----> CDR2
50      55      60
L  G  E  S  L  D  W  I  G  G  I  K  P  N  N
ctt gga gag agc ctt gac tgg att gga ggt att aaa cca aac aat
H      K      E      D      N
-a- -a- -g-- -a- -t-- -t--

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

- IMGT ----->
65      70      75
G  L  A      N  Y  N  Q  K  F  K      G  K
ggt ctt gct ... aac tac aac cag aag ttc aag ... ggc aag
G  T      I
gg- a-- -t--

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

----- FR3 - IMGT -----
80      85      90
A  T  L  T  V  D  K  S  S  S  T  A  Y  M  D
gcc aca ttg act gta gac aag tcc tcc agc aca gcc tac atg gac
E
--g

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

----->
95      100      105
L  R  S  L  T  S  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A
ctc cgc agc ctg aca tct gag gat tct gca gtc tat tac tgt gca
T
--c a--

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

--- CDR3 - IMGT -----
110      115      120
R  S  E  I  T  T  E  F  D  Y  W  G  Q  G  T
aga tct gag att acg acg gaa ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

--- FR4 - IMGT ----->
126
A  L  T  V  S  S
gct ctc aca gtc tcc tca

```

FIGURA 20A

ES 2 686 335 T3

224G11 VH
J00431 IGHD2-4*01

FIGURA 20B

224G11 VH

V00770 IGHJ2*01

FIGURA 20C

ES 2 686 335 T3

```

<----- FR1 - IMGT
1      5      10      15
E  V  Q  L  Q  Q  S  G  P      E  L  V  K  P
gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct ... gag ctg gtg aag cct
Q
X62106 IGHV1-2*02 c-- --g --- --- gtg --- --g g-- ... --g aa- --- ---

----->
      20      25      30
G  A  S  V  K  I  S  C  K  T  S  G  Y  I  F
ggg gct tca gtg aag ata tcc tgc aag act tct gga tac ata ttc
V
X62106 IGHV1-2*02 --- --c --- --- g-c --- --- g-- --- --- --cc ---

--- CDR1 - IMGT -----<-----
      35      40      45
T  A  Y  T      M  H  W  V  R  Q  S
act gca tac acc ... ... ... atg cac tgg gtg agg cag agc
G
X62106 IGHV1-2*02 --c -gc --- tat ... ... ... --- --- --- c-a --- gc-

FR2 - IMGT -----> CDR2
      50      55      60
L  G  E  S  L  D  W  I  G  G  I  K  P  N  N
ctt gga gag agc ctt gac tgg att gga ggt att aaa cca aac aat
P
X62106 IGHV1-2*02 -c- --- c-a g-g --- --g --- --g --- t-g --c --c --t --- -g-

- IMGT -----<-----
      65      70      75
G  L  A      N  Y  N  Q  K  F  K      G  K
ggt ctt gct ... ... aac tac aac cag aag ttc aag ... ggc aag
G
X62106 IGHV1-2*02 --- ggc a-a ... --- --t gca --- --- --t c-- ... --- -g-

-----> FR3 - IMGT -----
      80      85      90
A  T  L  T  V  D  K  S  S  S  T  A  Y  M  D
gcc aca ttg act gta gac aag tcc tcc agc aca gcc tac atg gac
V
X62106 IGHV1-2*02 -t- --c a-- --c agg --- -c- --- at- --- --- --- --g

----->
      95      100      105
L  R  S  L  T  S  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A
ctc cgc agc ctg aca tct gag gat tct gca gtc tat tac tgt gca
S
X62106 IGHV1-2*02 --g a-- --g --- -g- --- --c --c a-g --c --g --- --- --g

--- CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT
      110      115      120
R  S  E  I  T  T  E  F  D  Y  W  G  Q  G  T
aga tct gag att acg acg gaa ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc
X62106 IGHV1-2*02 --- ga

----->
      126
A  L  T  V  S  S
gct ctc aca gtc tcc tca

```

FIGURA 21A

ES 2 686 335 T3

	CDR3 - IMGT										<----- FR4 - IMGT				
	110										115				
	R	S	E	I	T	T	E	F	D	Y	W	G	Q	G	T
224G11 VH	aga	tct	gag	att	acg	acg	gaa	ttt	gac	tac	tgg	ggc	caa	ggc	acc
J00256 IGHJ4*01							Y								
	...	...	...	...	...	ac	t-c	---	---	---	---	---	---	---	---
	----->														
	126														
	A	L	T	V	S	S									
224G11 VH	gct	ctc	aca	gtc	tcc	tca									
	L	V													
J00256 IGHJ4*01	ctg	g--	--c	---	---	---	g								

FIGURA 21B

ES 2 686 335 T3

		FR1-IMGT (1-26)					CDR1-IMGT (27-38)					FR2-IMGT (39-55)					CDR2-IMGT (56-65)				
		11020					30					4050					60				
																					
224G11	VH	EVQLQSSGP.ELVKPGASVKISCKTS					GYIFTAYT....					MHWVRQSLGESLDWIGG					IKPNNGLA..				
rango		333332										3322121									
FR Humano		Q---V---A.-VK-----V---A-										-----AP-QG-E-M-W									
224G11	HZVH	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSKAS					GYIFTAYT....					MHWVRQAPGQGLDWMGG					IKPNNGLA..				
		FR3-IMGT (66-104)										CDR3-IMGT (105-115)					FR4-IMGT (116-126)				
		708090100										110					120				
																					
224G11	VH	NYNQKFK.GKATLTVDKSSSTAYMDLRSITSEDSAVYYC										ARSEITTEFDY					WGQGTALTIVSS				
rango		33322113233333															33				
FR Humano		--A---Q.-RV-M-R-T-I-----E-SR-R-D-T-----															-----LV----				
224G11	HZVH	NYAQKFQ.GRVTMTVDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYC										ARSEITTEFDY					WGQGTILVTIVSS				

FIGURA 22

ES 2 686 335 T3

```

<----- FR1 - IMGT
1      5      10      15
G   I   V   L   T   Q   S   P   A   S   L   A   V   S   L
ggc att gtg ttg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta
D
K02161 IGKV3-5*01
-a- --- --- c- --- --- --- --- --- --- --- ---

----->
      20      25      30
G   Q   R   A   T   I   S   C   R   V   S   E   S   I   D
gga cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gtc agt gaa agt att gat
V
K02161 IGKV3-5*01
--g --- --- --- --- --- --- -c- --- --- --- g- ---

--- CDR1 - IMGT -----<-----
      35      40      45
T   Y   G   N   S   F   I   H   W   Y   Q   Q   K
act tat ggc aat agt ttt ... .. ata cac tgg tac cag cag aaa
S
K02161 IGKV3-5*01
-g- --- --- --- --- --- ... .. -g- --- --- --- ---

FR2 - IMGT ----->----- CDR2
      50      55      60
P   G   Q   P   P   K   L   L   I   Y   R   A   S
cca gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat cgt gca tcc ... ..

K02161 IGKV3-5*01
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ... ..

- IMGT -----<-----
      65      70      75
... .. N   L   E   S   G   I   P   A   R
... .. aac cta gaa tct ggg atc cct ... gcc agg
... .. --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

FR3 - IMGT ----->-----
      80      85      90
F   S   G   S   G   S   R   T   D   F   T   L   T
ttc agt ggc agt ggg ... .. tct agg aca gac ttc acc ctc acc

K02161 IGKV3-5*01
--- --- --- --- --- ... .. --- --- --- --- ---

----->-----
      95      100      105
I   N   P   V   E   A   D   D   S   A   T   Y   Y   C   Q
att aat cct gtg gag gct gat gat tct gca acc tat tac tgt cag
V
K02161 IGKV3-5*01
--- --- --- --- --- --- --- gt- --- --- --- ---

--- CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT
      110      115      120
Q   S   N   E   D   P   F   T   F   G   S   G   T   K   L
caa agt aat gag gat cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg

K02161 IGKV3-5*01
--- --- --- --- --- --t cc

----->
      123
E   M   K
gaa atg aaa
K02161 VL

```

FIGURA 23A

ES 2 686 335 T3

	CDR3 - IMGT										<----- FR4 - IMGT				
	110										115				
	Q	S	N	E	D	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L
227H1 VL	caa	agt	aat	gag	gat	cca	ttc	acg	ttc	ggc	tcg	ggg	aca	aag	ttg
V00777 IGKJ4*01															
	----->														
227H1 VL															
V00777 IGKJ4*01															

FIGURA 23B

ES 2 686 335 T3

```

<----- FR1 - IMGT
1      5      10      15
G    I    V    L    T    Q    S    P    A    S    L    A    V    S    L
ggc att gtg ttg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta
E
-aa --- --- --- -a --g --- --- -c a-c c-- t-- t-- --- -c-
D              M              D

----->
      20      25      30
G    Q    R    A    T    I    S    C    R    V    S    E    S    I    D
gga cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gtc agt gaa agt att gat
E              L              A              Q              V    S
--g g-a --a --- --- c-c --- --- -g -c- --- c-g --- g-- agc
E              N              K    S              Q              V

CDR1 - IMGT <-----
      35      40      45
T    Y    G    N    S    F              I    H    W    Y    Q    Q    K
act tat ggc aat agt ttt ... .. ata cac tgg tac cag cag aaa
S              .              .              L    A
-gc --c ... .. ... .. t-- gc- --- --- --a --- ---
Y    S    S              N    K    N    Y    L    A

FR2 - IMGT -----> CDR2
      50      55      60
P    G    Q    P    P    K    L    L    I    Y    R    A    S
cca gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat cgt gca tcc ... ..
A              R              D
--t --c --- g-t --- -gg --- --- --- ga- --- --- ... ..
W

- IMGT ----->
      65      70      75
N    L    E    S    G    I    P              A    R
... .. ... .. aac cta gaa tct ggg atc cct ... gcc agg
R              A    T
... .. ... .. --- agg -cc a-- -c --- --a ... --- ---
T    R              V              D

FR3 - IMGT ----->
      80      85      90
F    S    G    S    G              S    R    T    D    F    T    L    T
ttc agt ggc agt ggg ... .. tct agg aca gac ttc acc ctc acc
G
--- --- --- --- ... .. --- g-- --- --- -t --- ---
G

----->
      95      100      105
I    N    P    V    E    A    D    D    S    A    T    Y    Y    C    Q
att aat cct gtg gag gct gat gat tct gca acc tat tac tgt cag
S    S    L              P    E              F              V
--c -gc agc c-a --- c-- --a --- -t-- gtt --- --- ---
S    S    L    Q              E              V              V

CDR3 - IMGT -----> FR4 - IMGT
      110      115      120
Q    S    N    E    D    P    F    T    F    G    S    G    T    K    L
caa agt aat gag gat cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg
R    S    N    W
--g c-- -gc a-c tgg --t cc

----->
      123
E    M    K
gaa atg aaa
227H1 VL

```

FIGURA 24A

ES 2 686 335 T3

	CDR3 - IMGT										<----- FR4 - IMGT					
	110										115					120
	Q	S	N	E	D	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	
227H1 VL	caa	agt	aat	gag	gat	cca	ttc	acg	ttc	ggc	tcg	ggg	aca	aag	ttg	
AF103571 IGKJ4*02							L				G				V	
							g	c--	---	---	---	gga	---	--c	g--	
	----->															
	123															
	E	M	K													
227H1 VL	gaa	atg	aaa													
AF103571 IGKJ4*02		I														
	--g	--c	---	c												

FIGURA 24B

ES 2 686 335 T3

	FR1-IMGT (1-26)				CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20		30		40	50		60
227H1 VL										
	GIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRVS				ESIDTYGNSF..		IHWYQQKPGQPPLLIY		RAS.....	
	3	3	33 2 3	3 2			11	2 3		
FR Humano	E-----T-SL-P-E---L---A-						LA-----A-R----			
227H1 HZ1VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS				ESIDTYGNSF..		IHWYQQKPGQAPRLLIY		RAS.....	
	FR3-IMGT (66-104)						CDR3-IMGT (105-113)		FR4-IMGT (114-123)	
	70	80	90	100			110	120		
227H1 VL										
	NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEADDSATYYC						QQSNEDPFT		FGSGTKLEMK	
	223	1	323 33 2 3						3 3 3	
FR Humano	-RAT---.-----G-----SSL-PE-F-V---								--G---V-I-	
227H1 HZ1VL	NRATGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTISSELEPEDFAVYYC						QQSNEDPFT		FGGGTKVEIK	

FIGURA 25A

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20	30	40	50	60		
227H1 VL									
	GIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRVS			ESIDTYGNSF..		IHWYQQKPGQPPKLLIY RAS.....			
	3	1	3	3	32	11			
FR Humano	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS					LAWYQQKPGQPPKLLIY			
227H1 HZ2VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSS			ESIDTYGNSF..		IHWYQQKPGQPPKLLIY RAS.....			
	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-113)		FR4-IMGT (114-123)		
	70	80	90	100	110	120			
227H1 VL									
	NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEADDSATYYC				QQSNEDPFT		FGSGTKLEMK		
	22	3	3	1	3233	3	3	3	
FR Humano	TRESGVP.DRFSGSG..SGTDFTLTISLQAEDVAVYYC						FGGGTKVEIK		
227H1 HZ2VL	TRESGVP.DRFSGSG..SRTDFTLTISLQAEDVAVYYC				QQSNEDPFT		FGGGTKVEIK		

FIGURA 25B

ES 2 686 335 T3

```

<----- FR1 - IMGT
1      5      10      15
E  V  Q  L  Q  Q  S  G  P      E  L  V  K  P
gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct ... gaa ctg gtg aag cct

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01

----->
20      25      30
G  A  S  M  K  I  S  C  K  A  S  G  Y  S  F
gga gct tca atg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tat tca ttc
V      P      T
--g --- g-- --a c-- --- --a --c a-- ---

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01

--- CDR1 - IMGT <-----
35      40      45
T  D  Y  T      L  N  W  V  K  Q  S
act gac tac acc ... ctg aac tgg gtg aag cag agc
N      M  D
--- --a- ... a-- g-- ---

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01

FR2 - IMGT -----> CDR2
50      55      60
H  G  K  T  L  E  W  I  G  L  I  N  P  Y  N
cat gga aag acc ctt gag tgg att gga ctt att aat cct tac aat
S      D      N
--- -g- --- ga- --- a-- ---

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01

- IMGT ----->
65      70      75
G  G  T      T  Y  N  Q  K  F  K      G  K
ggt ggt act ... acc tac aac cag aag ttc aag ... ggc aag
I
--- --t- --- --- ---

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01

----- FR3 - IMGT -----
80      85      90
A  T  L  T  V  D  K  S  S  S  T  A  Y  M  E
gcc aca tta act gta gac aag tca tcc agc aca gcc tac atg gag

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01

----->
95      100      105
L  L  S  L  T  S  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A
ctc ctc agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt gca
R      T
--- -g- --c --- a-- ---

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01

--- CDR3 - IMGT <-----
110      115      120
R  E  E  I  T  K  D  F  D  F  W  G  Q  G  T
aga gag gaa att acg aag gac ttt gat ttc tgg ggc caa ggc acc

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01

FR4 - IMGT ----->
126
T  L  T  V  S  S
act ctc aca gtc tcc tca

```

FIGURA 26A

ES 2 686 335 T3

227H1 VH
IGHD1-1*02

										CDR3 -		IMGT			
										110				115	
A	R	E	E	I	T	K	D	F	D	F					
gca	aga	gag	gaa	att	acg	aag	gac	ttt	gat	ttc					
		-t-	-t-	gc-	--										

FIGURA 26B

227H1 VH
V00770 IGHJ2*01

										CDR3 -		IMGT		<-----											
										110				115		120									
R	E	E	I	T	K	D	F	D	F	W	G	Q	G	T											
aga	gag	gaa	att	acg	aag	gac	ttt	gat	ttc	tgg	ggc	caa	ggc	acc											
						Y			Y																
		...	...	...	...	..c	t--	---	--c	-a-	---	---	---	---											

FR4 - IMGT ----->

										126						
T	L	T	V	S	S											
act	ctc	aca	gtc	tcc	tca											

227H1 VH
V00770 IGHJ2*01

---	---	---	---	---	---	g									
-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--

FIGURA 26C

ES 2 686 335 T3

[illegible]

FIGURA 27A

```

                CDR3 - IMGT
                110      115      120
R   E   E   I   T   K   D   F   D   F   W   G   Q   G   T
227H1 VH   aga gag gaa att acg aag gac ttt gat ttc tgg ggc caa ggc acc
J00256 IGHJ4*01   ... ..-c t-- --c -a- --- --- --a ---

                FR4 - IMGT ----->
                126
T   L   T   V   S   S
227H1 VH   act ctc aca gtc tcc tca
J00256 IGHJ4*01   L   V
                ctg g-- --c --- --- --- g

```

FIGURA 27B

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
	1 10 20 30	40 50 60		
227H1 VH				
rango	EVQLQ SGP. ELV KPGAS MK ISCKAS	GYSFTDYT....	LNWVKQ SH GK TLEW IGL	INPYNGGT..
FR Humano	3 3 3 33 3 3		11 3 33 22 2 1	
227H1 HZVH	Q---V---A.-VK-----V-V-----		MH--R-AP-QG---M-W	
	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS	GYSFTDYT....	LNWVRQ APGQGLEWM G L	INPYNGGT..

	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-115)	FR4-IMGT (116-126)
	70 80 90 100	110	120
227H1 VH			
rango	TYNQKFK .G KATLT V DK SSSTAYMEL LSLT SEDSAVYYC	AREEITKDFDF	WGQGT TL TVSS
FR Humano	1 3 3 32 2 1 1 3 33 3 3 3		33
227H1 HZVH	N-A---Q.-RV-M-R-T-I-----SR-R-D-T-----	AREEITKDFDF	-----LV----
	TYAQKFQ .GRVTMT VDK SISTAYMELSR LR SDDTAVYYC		WGQGT LV TVSS

FIGURA 28

ES 2 686 335 T3

```

<----- FR1 - IMGT
1      5      10      15
D I Q M T Q S P A S L S V S V
gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gta tct gtg

VL 223C4
AJ235956 IGKV12-46*01

----->
20      25      30
G E T V T I T C R A S E N I Y
gga gaa act gtc acc atc aca tgt cga gca agt gag aat att tac

VL 223C4
AJ235956 IGKV12-46*01

CDR1 - IMGT <-----
35      40      45
S N L A W Y Q Q K
agt aat ... .. tta gca tgg tat cag cag aaa

VL 223C4
AJ235956 IGKV12-46*01

FR2 - IMGT -----> CDR2
50      55      60
Q G K S P Q L L V Y A A T
cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc tat gct gca aca ... ..

VL 223C4
AJ235956 IGKV12-46*01

- IMGT ----->
65      70      75
N L V D G V P S R
... .. aac tta gta gat ggt gtg cca ... tca agg
A
... .. -C- ... ..

FR3 - IMGT ----->
80      85      90
F S G S G S G T Q Y S L K
ttc agt ggc agt gga ... .. tca ggc aca cag tat tcc ctc aag

VL 223C4
AJ235956 IGKV12-46*01

----->
95      100      105
I N S L Q S E D F G S Y Y C Q
atc aac agc ctg cag tct gaa gat ttt ggg agt tat tac tgt caa

VL 223C4
AJ235956 IGKV12-46*01

CDR3 - IMGT -----> FR4 - IMGT ----->
110      115      120
H F W G P P Y T F G G G T K L
cat ttt tgg ggt cct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg
T
... .. a-- -t cc

```

FIGURA 29A

```

CDR3 - IMGT -----> FR4 - IMGT ----->
110      115      120      123
G P P Y T F G G G T K L E I K
ggt cct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gag ata aag

VL 223C4
V00777 IGKJ2*01

```

FIGURA 29B

ES 2 686 335 T3

```

<----- FR1 - IMGT
1          5          10          15
D I Q M T Q S P A S L S V S V
gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gta tct gtg
S
Y14865 IGKV1-NL1*01
--- --c --- --g --- -c- --- --a

----->
          20          25          30
G E T V T I T C R A S E N I Y
gga gaa act gtc acc atc aca tgt cga gca agt gag aat att tac
D R Q G S
Y14865 IGKV1-NL1*01
--- -c -ga --- --t --c --g --g --- c-- ggc --- ag-

CDR1 - IMGT <-----
          35          40          45
S N L A W Y Q Q K
agt aat ... .. tta gca tgg tat cag cag aaa
N S
Y14865 IGKV1-NL1*01
-a- tc- ... .. --c --- ---

FR2 - IMGT -----> CDR2
          50          55          60
Q G K S P Q L L V Y A A T
cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc tat gct gca aca ... ..
P A K L S
Y14865 IGKV1-NL1*01
-ca --g --- g-c --- a-- --- --c --- t-c ... ..

- IMGT ----->
          65          70          75
N L V D G V P S R
... .. aac tta gta gat ggt gtg cca ... tca agg
R E S
Y14865 IGKV1-NL1*01
... .. -ga --g -a- ag- --g --c --- --c ---

FR3 - IMGT ----->
          80          85          90
F S G S G S G T Q Y S L K
ttc agt ggc agt gga ... tca ggc aca cag tat tcc ctc aag
D T T
Y14865 IGKV1-NL1*01
--- --- --t --g --g g-t --c a-t --- -cc

----->
          95          100          104
I N S L Q S E D F G S Y Y C Q
atc aac agc ctg cag tct gaa gat ttt ggg agt tat tac tgt caa
S P A T
Y14865 IGKV1-NL1*01
--- -g- --- c-- --- -ca -c- ---

CDR3 - IMGT -----> FR4 - IMGT -----
          110          115          120          123
H F W G P P Y T F G G G T K L
cat ttt tgg ggt cct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg
Q Y Y S T
Y14865 IGKV1-NL1*01
--g -a- -at a-- a-c --t cc

```

FIGURA 30A

```

CDR3 - IMGT -----> FR4 - IMGT -----
          110          115          120          123
G P P Y T F G G G T K L E I K
ggt cct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gag ata aag
Q
J00242 IGKJ2*01
- --- --t --t --c ca- --- --- --- -c ---

```

FIGURA 30B

	<-----FR1 - IMGT	
	1 5 10 15	
Hz VL 223C4	D I Q M T Q S P S S L S A S V	
	----->	
	20 25 30	
Hz VL 223C4	G D R V T I T C R A S E N I Y	
	----->	
	CDR1 - IMGT 35 40 45	
Hz VL 223C4	S N L A W Y Q Q K	
	----->	
	FR2 - IMGT 50 55 60 CDR2	
Hz VL 223C4	P G K A P K L L L Y A A T	
Retromutación	Q S Q 2 2	
	3 2 2	
	----->	
	- IMGT 65 70 75	
Hz VL 223C4	R L E S G V P S R	
Retromutación	N V D	
	1 1 2	
	----->	
	FR3 - IMGT 80 85 90	
Hz VL 223C4	F S G S G S G T D Y T L T	
Retromutación	Q 2	
	----->	
	95 100 105	
Hz VL 223C4	I S S L Q P E D F A T Y Y C Q	
Retromutación	N 2 S 3	
	----->	
	CDR3 - IMGT 110 115 120 FR4 - IMGT	
Hz VL 223C4	H F W G P P Y T F G Q G T K L	
	----->	
	123	
Hz VL 223C4	E I K	

FIGURA 31

ES 2 686 335 T3

[illegible]

FIGURA 32A

										CDR3 - IMGT												
										110					115							
										R	G	R	Y	V	G	Y	Y	Y	A	M	D	Y
VH 223C4										aga	ggg	agg	tat	gtt	ggt	tac	tac	tat	gct	atg	gac	tac
														D								
D13199 IGHD6-3*01										...	.tc	---	-a-	---	---	---						

FIGURA 32B

ES 2 686 335 T3

```

      CDR3 - IMGT      <----- FR4 - IMGT ----->
      115      120      125      129
      G   Y   Y   Y   A   M   D   Y   W   G   Q   G   T   S   V   T   V   S   S
VH 223C4      ggt tac tac tat gct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca
V00770 IGHJ4*01      -t --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```

FIGURA 32C

```

      <----- FR1 - IMGT ----->
      1      5      10      15
      E   V   L   L   Q   Q   S   G   P   E   L   V   K   P
VH 223C4      gag gtc ctg ctg caa cag tct gga cct ... gag ctg gtg aag cct
      Q   Q   V   A   V   K
X62106 IGHV1-2*02      c-- --g -a- --- gtg --- --- --g g-- ... --- g-- aa- --- ---

      <----->
      20      25      30
      G   A   S   V   K   I   P   C   K   A   S   G   Y   T   F
VH 223C4      ggg gct tca gtg aag ata ccc tgc aag gct tct gga tac aca ttc
      V   S
X62106 IGHV1-2*02      --- --c --- --- --- g-c t-- --- --- --- --- --c ---

      CDR1 - IMGT      <----->
      35      40      45
      T   D   Y   N   M   D   W   V   K   Q   S
VH 223C4      act gac tac aac ... .. atg gac tgg gtg aag cag agc
      G   Y   H   R   A
X62106 IGHV1-2*02      --c -g- --- t-t ... .. --- c-- --- --- cga --- gc-

      FR2 - IMGT      <-----> CDR2
      50      55      60
      H   G   M   S   L   E   W   I   G   D   I   N   P   N   N
VH 223C4      cat gga atg agc ctt gag tgg att gga gat att aat cct aac aat
      P   Q   G   M   W   S
X62106 IGHV1-2*02      -c- --- caa g-g --- --- --- --g --- tgg --c --c --- --- -g-

      - IMGT      <----->
      65      70      75
      G   G   T   I   F   N   Q   K   F   K   G   K
VH 223C4      ggt ggt act ... .. atc ttc aac cag aag ttc aag ... ggc aag
      N   Y   A   Q   R
X62106 IGHV1-2*02      --- --c --a ... .. -a- -at gca --- --- --t c-- ... --- -g-

      <----- FR3 - IMGT ----->
      80      85      90
      A   T   L   T   V   D   K   S   S   S   T   A   Y   M   E
VH 223C4      gcc aca ttg act gta gac aag tcc tcc agc aca gcc tac atg gag
      V   M   R   T   I
X62106 IGHV1-2*02      -t- --c a-- --c agg --- -c- --- at- --- --- --- ---

      <----->
      95      100      105
      L   R   S   L   T   S   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A
VH 223C4      ctc cgc agc ctg aca tct gag gac act gca gtc tat tac tgt gca
      S   R   R   D
X62106 IGHV1-2*02      --g a-- --g --- -g- --- --c --- --g --c --g --- --- --- --g

```

FIGURA 33A

ES 2 686 335 T3

	CDR3 - IMGT												
	110					115							
	R	G	R	Y	V	G	Y	Y	Y	A	M	D	Y
VH 223C4	aga	ggg	agg	tat	gtt	ggt	tac	tac	tat	gct	atg	gac	tac
X97051 IGHD1-26*01	-t	---	--c	--c	tac								

FIGURA 33B

	CDR3 - IMGT												<----- FR4 - IMGT							
	110				115								120				125			
	R	Y	V	G	Y	Y	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V		
VH 223C4	agg	tat	gtt	ggt	tac	tac	tat	gct	atg	gac	tac	tgg	ggt	caa	gga	acc	tca	gtc		
J00256 IGHJ6*01			Y	Y				G			V						T			
	--	tac	tac	---	---	---	--c	-g-	---	---	gt-	---	--g	---	--g	---	a-g	---		
	----->																			
					129															
VH 223C4	T	V	S	S																
	acc	gtc	tcc	tca																
J00256 IGHJ6*01	---	---	---	---																

FIGURA 33C

Hz VH 223C4 Retromutación	<-----FR1 - IMGT														
	1				5				10					15	
	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A		E	V	K	K	P
Hz VH 223C4 Retromutación	E		L		Q				P				V		
	2		2		2				3				3		
	----->														
Hz VH 223C4 Retromutación					20				25					30	
	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F
							P								
Hz VH 223C4 Retromutación	----->														
	<-----CDR1 - IMGT														
					35				40					45	
Hz VH 223C4 Retromutación	T	D	Y	N					M	H	W	V	R	Q	A
										D					S
										1					1
Hz VH 223C4 Retromutación	<-----FR2 - IMGT														
					50				55					60	
	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	W	I	N	P	N	N
Hz VH 223C4 Retromutación	H		M							D					
	3		2							1					
	----->														
Hz VH 223C4 Retromutación	<-----IMGT														
					65				70					75	
	G	G	T			N	Y	A	Q	K	F	Q		G	R
Hz VH 223C4 Retromutación						I	F								
						1	1								
	----->														
Hz VH 223C4 Retromutación	<-----FR3 - IMGT														
					80				85					90	
	V	T	M	T	R	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E
Hz VH 223C4					V										
					2										
	----->														
Hz VH 223C4					95				100					105	
	L	S	R	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A
Hz VH 223C4	<-----CDR3 - IMGT														
					110				115					120	
	R	G	R	Y	V	G	Y	Y	Y	A	M	D	Y	W	G
Hz VH 223C4	<-----FR4 - IMGT														
					125				129						
	Q	G	T	T	V	T	V	S	S						

FIGURA 34

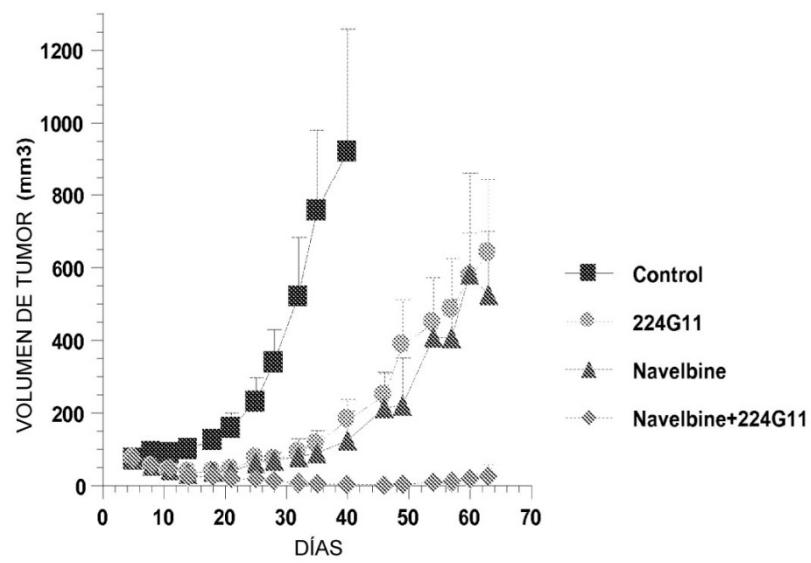


FIGURA 35

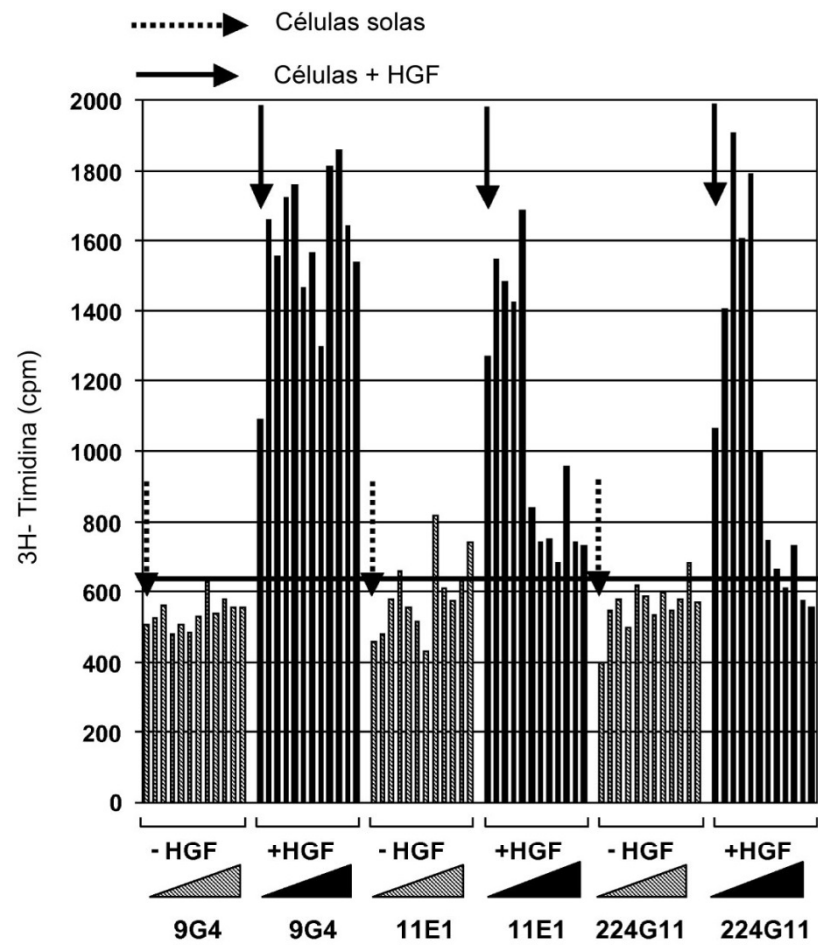


FIGURA 36

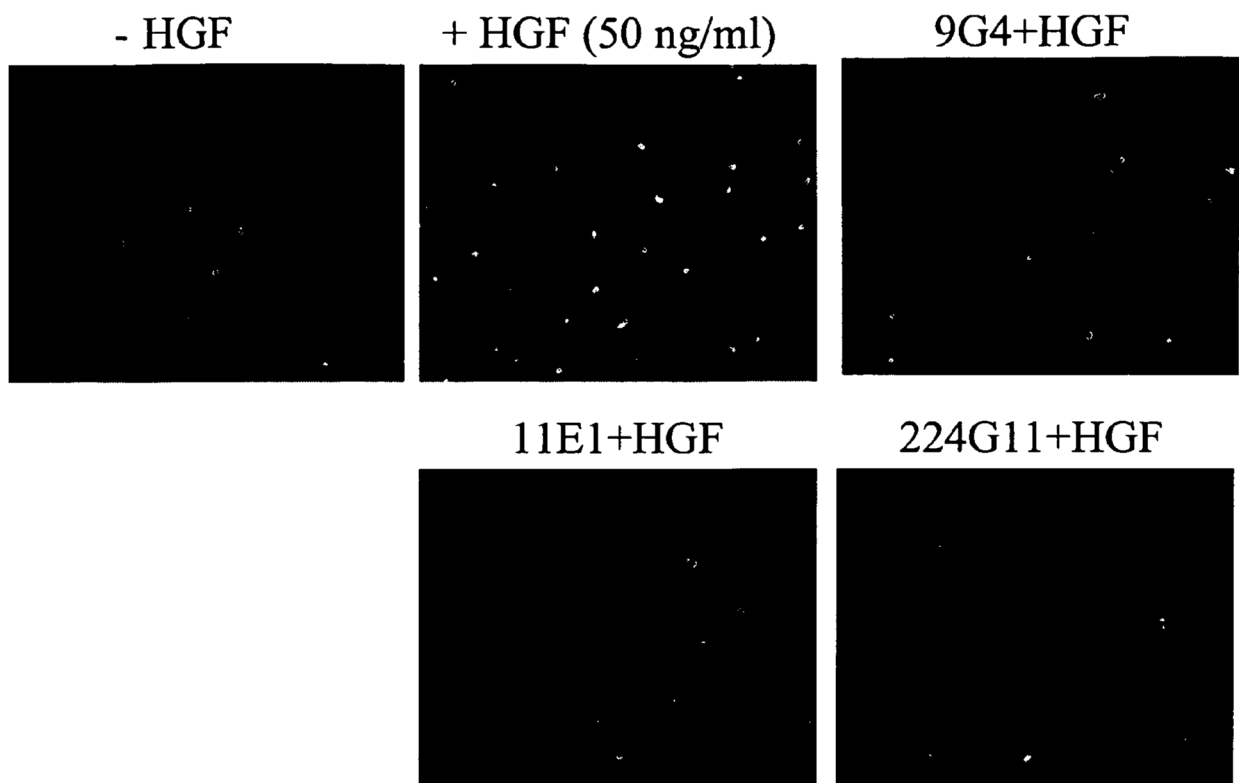


FIGURA 37

ES 2 686 335 T3

```

<----- FR1 - IMGT
1          5          10          15
  Q   I   V   L   T   Q   S   P   A   I   M   S   A   S   P
11E1 VL   caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct cct
AJ231214 IGKV4-79*01 -----

----->
          20          25          30
  G   E   K   V   T   L   T   C   S   A   S   S   S   V   S
11E1 VL   ggg gag aag gtc acc ttg acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt
AJ231214 IGKV4-79*01 -----

--- CDR1 - IMGT -----<-----
          35          40          45
  S   T   Y          L   Y   W   Y   Q   Q   K
11E1 VL   tcc acc tac ... .. ttg tac tgg tac cag cag aag
AJ231214 IGKV4-79*01   S
                        -g- --- ... ..

FR2 - IMGT -----> CDR2
          50          55          60
  P   G   S   S   P   K   L   W   I   Y   T   T   S
11E1 VL   cca gga tcc tcc ccc aaa ctc tgg att tat acc aca tcc ... ..
AJ231214 IGKV4-79*01   S
                        -g- --- ... ..

- IMGT -----<-----
          65          70          75
          I   L   A   S   G   V   P          A   R
11E1 VL   ... .. atc ctg gct tct gga gtc cct ... gct cgc
AJ231214 IGKV4-79*01   N
                        -a- --- ... ..

----- FR3 - IMGT -----
          80          85          90
  F   S   G   S   G          S   G   T   S   Y   S   L   T
11E1 VL   ttc agt ggc agt ggg ... .. tct ggg acc tct tac tct ctc aca
AJ231214 IGKV4-79*01 -----

----->
          95          100          105
  I   S   S   M   E   T   E   D   A   A   S   Y   F   C   H
11E1 VL   atc agc agc atg gag act gaa gat gct gcc tct tat ttc tgc cat
AJ231214 IGKV4-79*01   A
                        g-- ---

--- CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT
          110          115          120
  Q   W   S   S   Y   P   F   T   F   G   S   G   T   K   L
11E1 VL   cag tgg agt agt tac cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg
AJ231214 IGKV4-79*01   P
                        cc- c

----->
          123
  D   I   K
11E1 VL   gac ata aaa

```

FIGURA 38A

ES 2 686 335 T3

```

          CDR3 - IMGT          <----- FR4 - IMGT
          110          115          120
    Q   W   S   S   Y   P   F   T   F   G   S   G   T   K   L
11E1 VL cag tgg agt agt tac cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg
V00777 IGKJ4*01          --- --- --- --- --- --- --- ---

----->
          123
    D   I   K
11E1 VL gac ata aaa
V00777 IGKJ4*01 E
          --a --- --- c

```

FIGURA 38B

ES 2 686 335 T3

```

<----- FR1 - IMGT
1      5      10      15
Q  I  V  L  T  Q  S  P  A  I  M  S  A  S  P
caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct cct
E      M      T  L  L
g-- --- --a a-g --a --- --- --- --c -c- c-- --- ttg --- --a

----->
      20      25      30
G  E  K  V  T  L  T  C  S  A  S  S  S  V  S
ggg gag aag gtc acc ttg acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt
      R  A      S      R      Q
--- --a -ga -c- --- c-c t-- --- --g --- --t cag --- --t --c

CDR1 - IMGT
      35      40      45
S  T  Y      L  Y  W  Y  Q  Q  K
tcc acc tac ... .. ttg tac tgg tac cag cag aag
S
ag- -g- --- ... .. --a -c- --- --- --- --a

FR2 - IMGT -----> CDR2
      50      55      60
P  G  S  S  P  K  L  W  I  Y  T  T  S
cca gga tcc tcc ccc aaa ctc tgg att tat acc aca tcc ... ..
      Q  A      R      L      G  A
--t --g cag g-t --- -gg --- ctc --c --- ggt g-- --- ... ..

- IMGT ----->
      65      70      75
I  L  A  S  G  V  P  A  R
... .. atc ctg gct tct gga gtc cct ... gct cgc
T  R      T  I
... .. -c- ag- --c a-- --c a-- --a ... --c a-g

FR3 - IMGT ----->
      80      85      90
F  S  G  S  G      S  G  T  S  Y  S  L  T
ttc agt ggc agt ggg ... .. tct ggg acc tct tac tct ctc aca
      D  F  T
--- --- --- ... .. --a gac -t- a-- --- --c

----->
      95      100      105
I  S  S  M  E  T  E  D  A  A  S  Y  F  C  H
atc agc agc atg gag act gaa gat gct gcc tct tat ttc tgc cat
      L  Q  P      F      V      Y      Q
--- --- --- c-- c-- c-- --- --- tt- --a gt- --- -a- --t --g

CDR3 - IMGT -----> FR4 - IMGT ----->
      110      115      120
Q  W  S  S  Y  P  F  T  F  G  S  G  T  K  L
cag tgg agt agt tac cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg
      D  Y  N  L
--- gat ta- -ac -ta --t cc

----->
      123
D  I  K
gac ata aaa
11E1 VL

```

FIGURA 39A

ES 2 686 335 T3

```

CDR3 - IMGT  <----- FR4 - IMGT ----->
110          115          120          123
Y   P   F   T   F   G   S   G   T   K   L   D   I   K
tac cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gac ata aaa
          G          V   E
AF103571 IGKJ4*02  ....g c-- --- --- --- gga --- --c ---g--g--c--

```

FIGURA 39B

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
	1 10 20 30	40 50 60		
11E1 VL				
rango	QIVLTQSPA IMS ASPG EV TLTCSAS	SSVSSTY.....	LYWYQ QKPGSSPKL WIY	TTS.....
FR Humano	3 1 33 3 33 3 2		1 33 3 2	
11E1 HZVL	E--M-----TL-L-----RA--S-R--		-S-----QA-R-L--	
	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS	SSVSSTY.....	LYWYQ QKPGQAPRLLI Y	TTS.....

	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-113)	FR4-IMGT (114-123)
	70 80 90 100	110	120
11E1 VL			
rango	ILASGVP.ARFSGSG..SGT SY SLTISS ME TED AAS YFC	HQWSSYPFT	FGSGTK LD IK
FR Humano	22 3 3 213 321 2 3 3		3 32
11E1 HZVL	TR-T-I-.....DFT-----LQP--F-V-Y-	HQWSSYPFT	--G---VE--
	TRATGIP.ARFSGSG..SGTD Y TLTISS LQ TEDFAVYYC		FGGGTKVEIK

FIGURA 40

ES 2 686 335 T3

```

<----- FR1 - IMGT
1      5      10      15
Q  V  Q  L  Q  Q  S  G  A      E  L  A  K  P
cag gtc cag ctt cag cag tct ggg gct ... gaa ctg gca aaa cct

11E1 VH
AC090843 IGHV1-7*01

----->
20      25      30
G  A  S  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F
ggg gcc tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac act ttt

11E1 VH
AC090843 IGHV1-7*01
                L
                c-

CDR1 - IMGT
35      40      45
T  S  Y  W      M  N  W  V  K  Q  R
act tcc tac tgg ... .. atg aac tgg gtg aaa cag agg

11E1 VH
AC090843 IGHV1-7*01
ag- ... .. c- -a

FR2 - IMGT -----> CDR2
50      55      60
P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y  I  N  P  T  T
cct gga cag ggt ctg gaa tgg att gga tac att aac cct acc act
S S
- - - - -t -g- -g-

- IMGT ----->
65      70      75
G  S  T      D  Y  N  Q  K  L  K      D  K
ggt tct act ... .. gac tac aat cag aag tta aag ... gac aag
Y K F
-a- ... .. a-g -c ...

11E1 VH
AC090843 IGHV1-7*01

FR3 - IMGT ----->
80      85      90
A  T  L  T  A  D  K  S  S  N  T  A  Y  M  Q
gcc aca ttg act gca gac aaa tcc tcc aac aca gcc tac atg caa
S
- - - - -g- -g-

----->
95      100      105
L  S  S  L  T  S  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A
ctg agc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt gca
Y
- - - - -a-

CDR3 - IMGT ----->
110      115      120
I  G  G  Y  G  S  W  F  A  Y  W  G  Q  G  T
ata gga gga tat ggg tcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act
R
-g-

FR4 - IMGT ----->
126
L  V  T  V  S  A
ctg gtc act gtc tct gca

11E1 VH

```

FIGURA 41A

ES 2 686 335 T3

					CDR3 -	IMGT				
	105				110			115		
11E1 VH	A	I	G	G	Y	G	S	W	F	A
L32868 IGHD4-1*01	gca	ata	gga	gga	tat	ggg	tcc	tgg	ttt	gct
					-g	---	c			

FIGURA 41B

					CDR3 -	IMGT													
					110			115											
11E1 VH	I	G	G	Y	G	S	W	F	A	Y	W	G	Q	G	T				
V00770 IGHJ3*01	ata	gga	gga	tat	ggg	tcc	tgg	ttt	gct	tac	tgg	ggc	caa	ggg	act				
	..	...	...	...	...	..	---	---	---	---	---	---	---	---	---				
						FR4 -	IMGT												
								126											
11E1 VH	L	V	T	V	S	A													
V00770 IGHJ3*01	ctg	gtc	act	gtc	tct	gca													
	---	---	---	---	---	---													g

FIGURA 41C

```

<----- FR1 - IMGT
1      5      10      15
Q  V  Q  L  Q  Q  S  G  A      E  L  A  K  P
cag gtc cag ctt cag cag tct ggg gct ... gaa ctg gca aaa cct
V
--- --g --- --g gt- --- --- --- ... --g --aag --g ---
V
...
V  K

----->
20      25      30
G  A  S  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F
ggg gcc tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac act ttt
V
--- --- --- --- g-c --- --- --- --a --- --c --c
V

CDR1 - IMGT <-----
35      40      45
T  S  Y  W      M  N  W  V  K  Q  R
act tcc tac tgg ... .. atg aac tgg gtg aaa cag agg
G      Y      H      R      A
--c gg- --- -at ... .. --- c- --- --- cg- --- gcc
Y ... .. H      R      A

FR2 - IMGT -----> CDR2
50      55      60
P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y  I  N  P  T
cct gga cag ggt ctg gaa tgg att gga tac att aac cct acc act
M      W      N  S
--- --- --a --g --t --g --- --g --- --gg --c --- --a --g-
M      I      S  G

- IMGT ----->
65      70      75
G  S  T      D  Y  N  Q  K  L  K      D  K
ggg tct act ... .. gac tac aat cag aag tta aag ... gac aag
G      N      A      F  Q      G  R
--- ggc --a ... .. a- --t gca --- --- --t c- --- -g- -g-
... .. S      A      F  Q ... G  R

FR3 - IMGT ----->
80      85      90
A  T  L  T  A  D  K  S  S  N  T  A  Y  M  Q
gcc aca ttg act gca gac aaa tcc tcc aac aca gcc tac atg caa
V      M      R      T      I  S      E
-t- --c a- --c agg --- -cg --- at- -g- --- --- --g
V      M      R      T      T  S      V      E

----->
95      100      105
L  S  S  L  T  S  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A
ctg agc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt gca
R      D      T
--- --- --g --- -g- --- --c --- a-g --c --g --- --- --g
R      T

CDR3 - IMGT -----> FR4 - IMGT
110      115      120
I  G  G  Y  G  S  W  F  A  Y  W  G  Q  G  T
ata gga gga tat ggg tcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act
R
-g- -a

----->
126
L  V  T  V  S  A
ctg gtc act gtc tct gca

```

11E1 VH
X62106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (aminoácido)

11E1 VH
X62106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (aminoácido)

11E1 VH
X62106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (aminoácido)

11E1 VH
X62106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (aminoácido)

11E1 VH
X62106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (aminoácido)

11E1 VH
X62106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (aminoácido)

11E1 VH
X62106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (aminoácido)

11E1 VH
X62106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (aminoácido)

FIGURA 42A

ES 2 686 335 T3

```

CDR3 - IMGT      <----- FR4 - IMGT ----->
110              115              120              126
G   S   W   F   A   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   A
11E1 VH          ggg tcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca
M25625 IGHJ4*03  ... .g- -ac --- -ac --- --- --- --- --- -c --- --- -c --- -c t-- g

```

FIGURA 42B

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
11E1 VH	1 10 20	30	40 50	60
rango				
FR Humano	QVQLQSGA.ELAKPGASVKMSCKAS	GYTFTSYW....	MNWKQRPQGLEWIGY	INPTTGST..
11E1 HZVH	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSKAS	GYTFTSYW....	MNWRQAPQGLEWMGY	INPTTGST..
	3 33 3		1 3 3 2 1	
	----V----.-VK-----V----		-H--R-A-----M-I	

	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-115)	FR4-IMGT (116-126)
11E1 VH	70 80 90 100	110	120
rango			
FR Humano	DYNQKLK.DKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYC	AIGGYGSWFAY	WGQGLTVTVSA
11E1 HZVH	DYAQKFQ.GRVTMTADKSTSTVYMESSLRSEDTAVYYC	AIGGYGSWFAY	WGQGLTVTVSS
	1 23 332 2 1 1 33 2 3 3 3		3
	S-A--FQ.GRV-M-R-T-TS-V--E---R---T-----		-----S

FIGURA 43

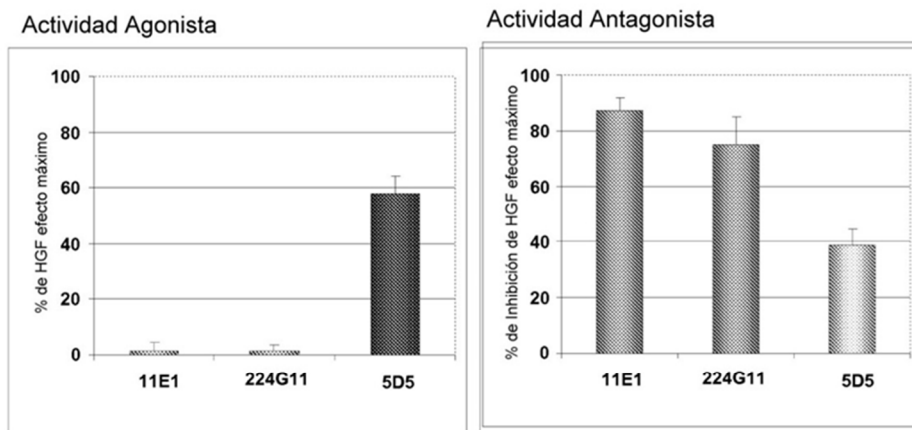


FIGURA 44A

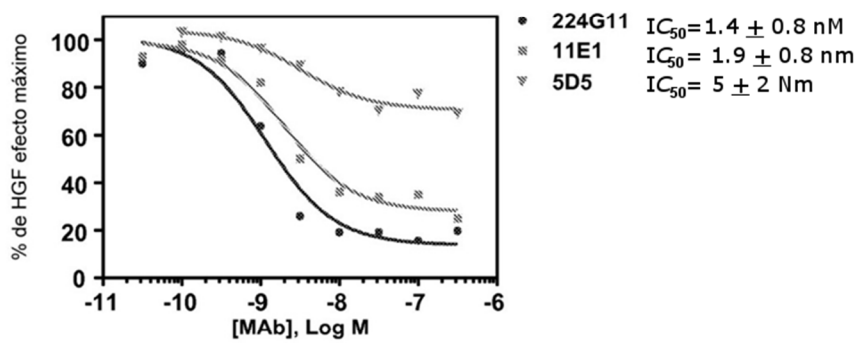


FIGURA 44B

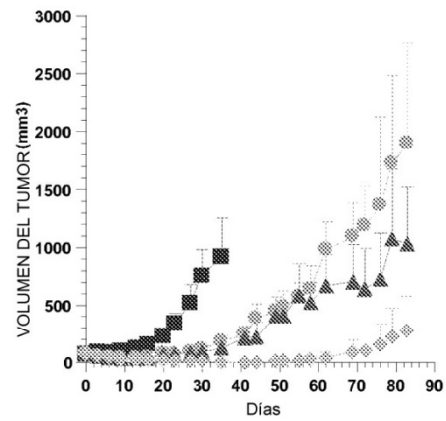


FIGURA 45

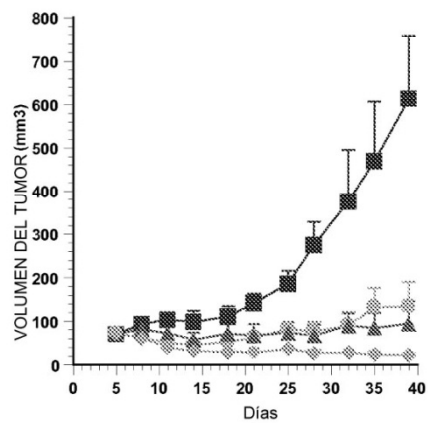


FIGURA 46

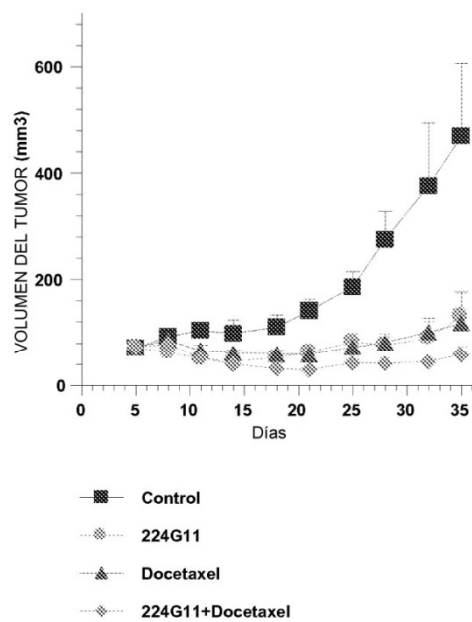


FIGURA 47

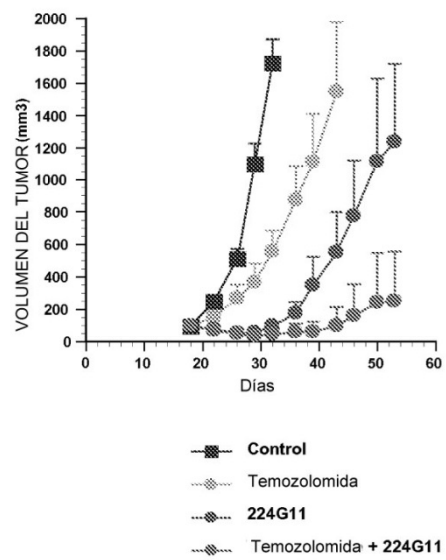


FIGURA 48

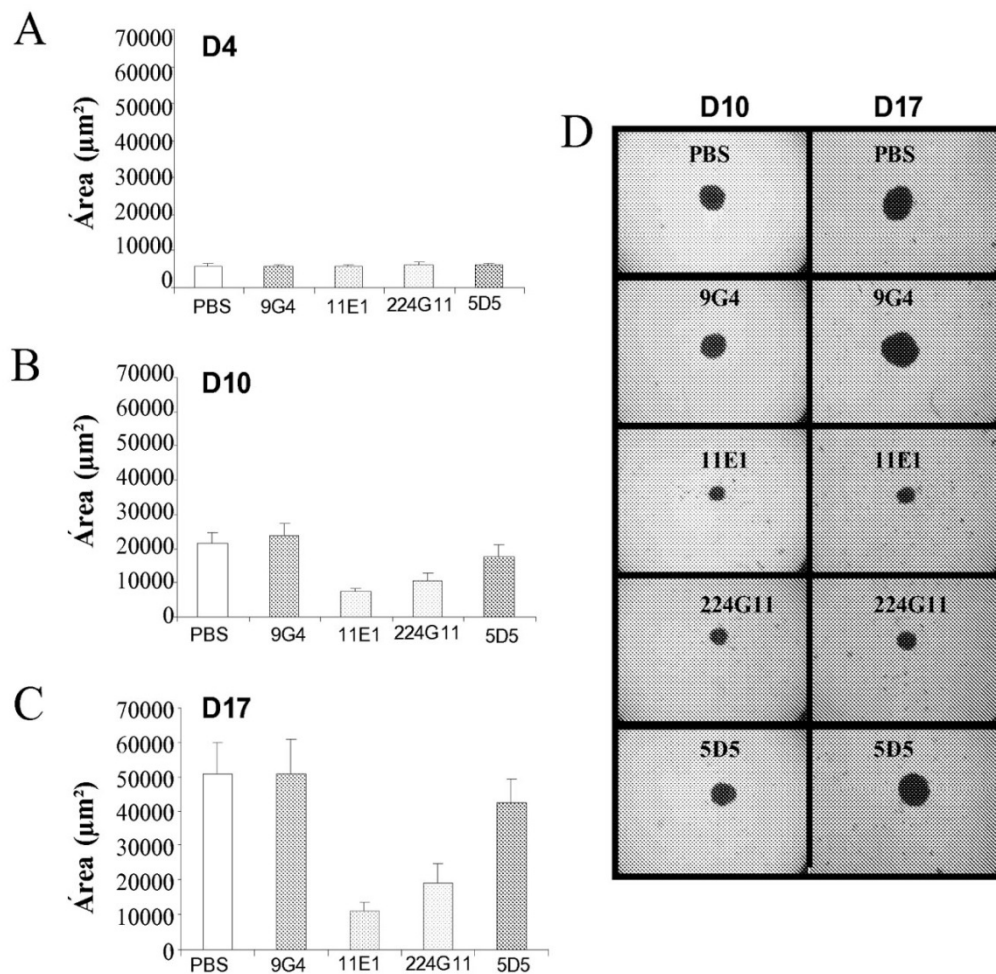


FIGURA 49A - FIGURA 49B - FIGURA 49C - FIGURA 49D

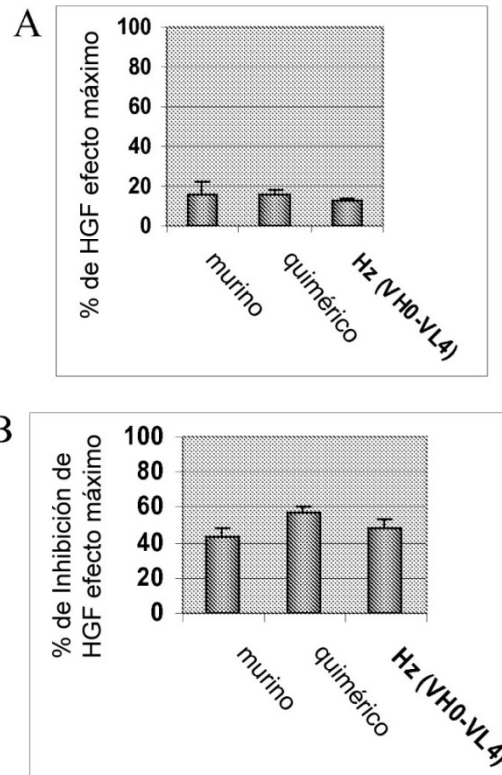


FIGURA 50A - FIGURA 50B

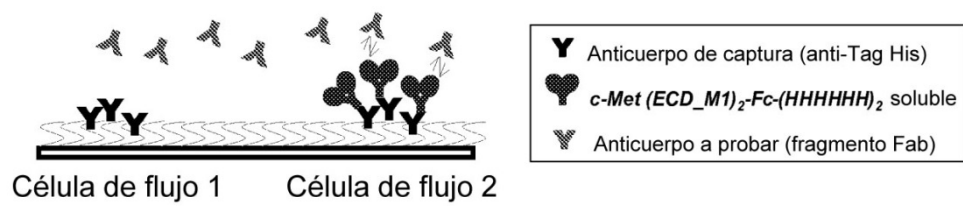


FIGURA 51

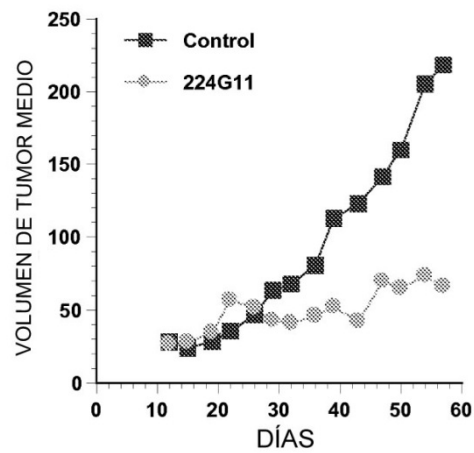


FIGURA 52

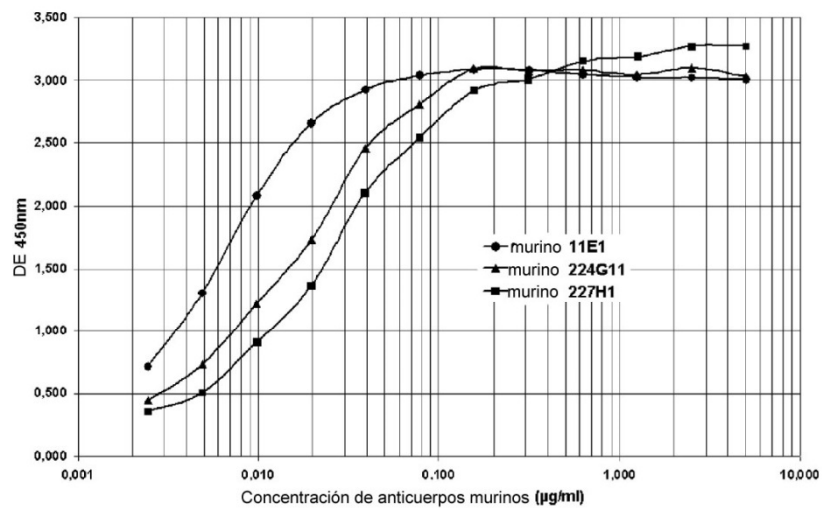


FIGURA 53

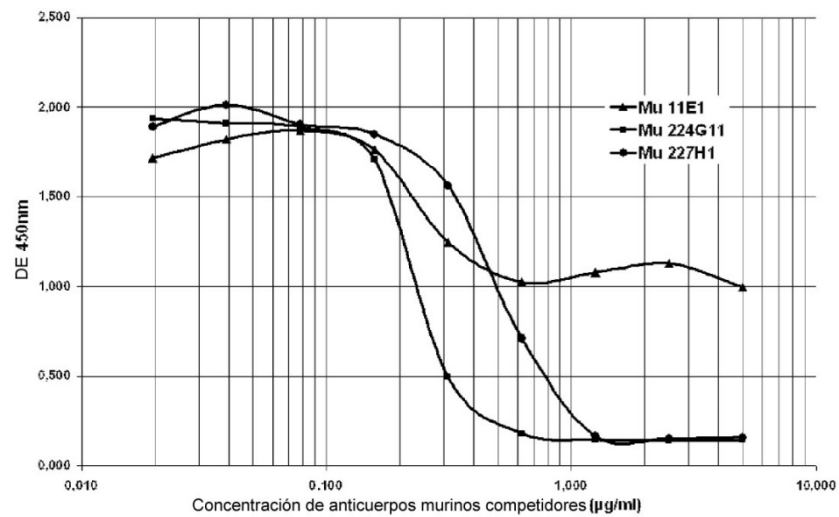


FIGURA 54

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)			CDR2-IMGT (56-65)		
	1	10	20	30		40	50		60		
227H1 VH											
FR Humano	EVQLQQSGP	ELVKPGASMKISCKAS	GYSFTDYT...	LNWVKQSHGKTLEWIGL	INPYNGGT..	MH--R-AP-QG---M-W					
Cambiado en	Q---V---A.-VK-----V-V-----					11 * 33 22 2 1					
227H1 HZ3VH	* * 2 *2 3 *										
227H1 HZ2VH	QVQLVQSGP	EVVKPGASMKVSCCKAS	GYSFTDYT...	LNWVRQSHGKTLEWIGL	INPYNGGT..	LNWVRQAPGKTLEWIGL	INPYNGGT..				
227H1 HZ1VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVKVSCCKAS	GYSFTDYT...	LNWVRQAPGQGLEWMGL	INPYNGGT..						

FIGURA 55

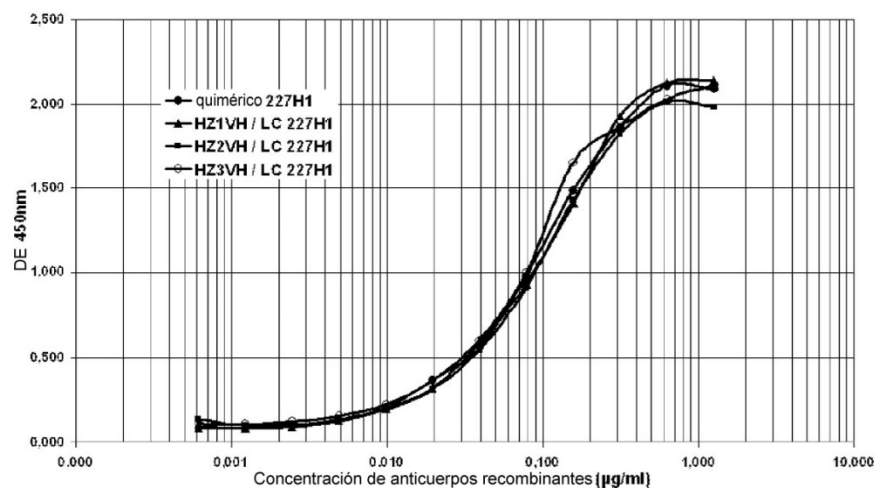


FIGURA 56

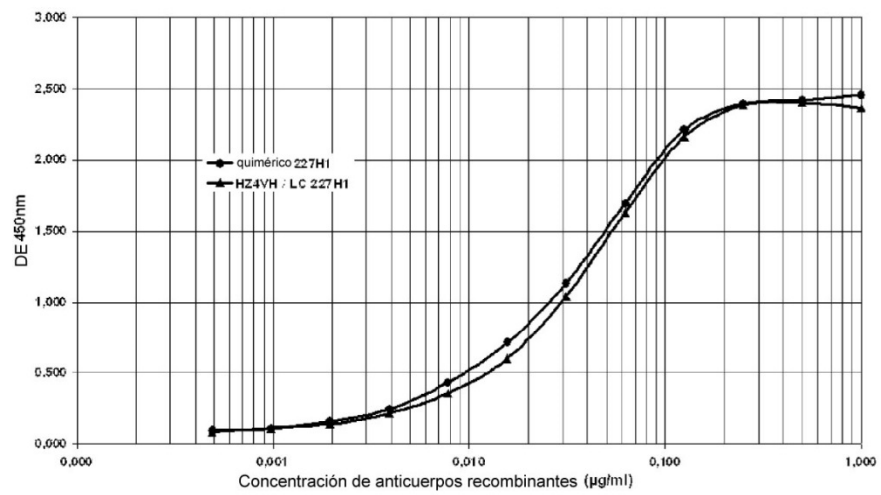


FIGURA 57

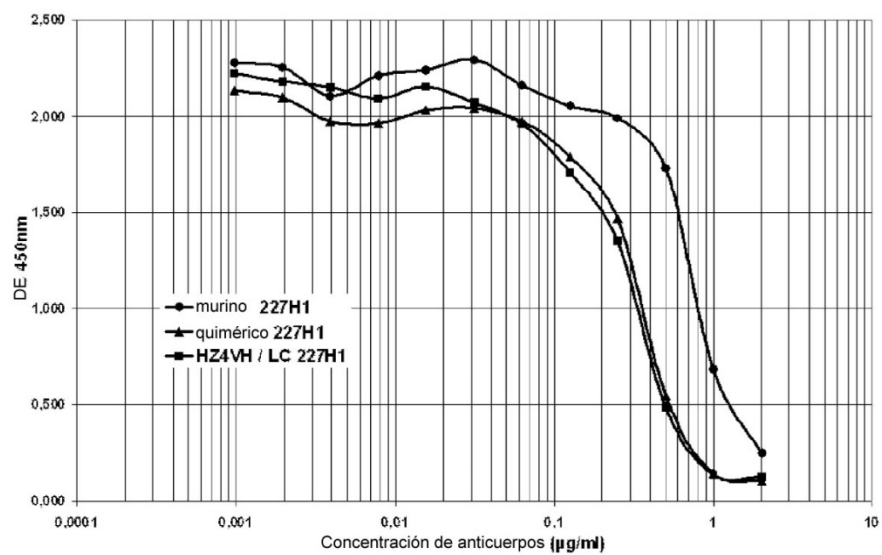


FIGURA 58

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20	30		40	50	60	
227H1-HZ VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVKV	SCKAS	GYSFTD	YTDY	MHWVRQAPGQGLEWMGW		INPYNGGT	
humanización	*	*	!	*	!	*	!!	!!	!

FIGURA 59

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	11020			30		4050		60	
11E1 VH	QVQLQSGAELAKPGASVKMSCKAS			GYTFTSYW....		MNWVKRPGQGLEWIGY		INPTTGST..	
FR Humano	---V---VK-----V---					-H-R-A-----M-I			
Cambiado en	* ** 3					1 * * 2 1			
11E1 HZ VH3	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKMSCKAS			GYTFTSYW....		MNWVRQAPQGQLEWIGY		INPTTGST..	
11E1 HZ VH2	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCKAS			GYTFTSYW....		MNWVRQAPQGQLEWIGY		INPTTGST..	
11E1 HZ VH1	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCKAS			GYTFTSYW....		MNWVRQAPQGQLEWMGY		INPTTGST..	
	FR3-IMGT (66-104)					CDR3-IMGT (105-115)		FR4-IMGT (116-126)	
	708090100					110		120	
11E1 VH	DYNQKILK.DKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYC					AIGGYGSWFAY		WGQGTLVTVSSA	
FR Humano	S-A-FQ.GRV-M-R-T-TS-V--E---R--T----							-----S	
Cambiado en	1 3 23 3 2 2 1 1 33 2 3 *							*	
11E1 HZ VH3	DYNQKILK.DKATLTADKSSNTAYMELSSLTSEDTAVYYC					AIGGYGSWFAY		WGQGTLVTVSS	
11E1 HZ VH2	DYAQKLQ.GRATLTADKSTSTAYMELSSLRSSEDTAVYYC					AIGGYGSWFAY		WGQGTLVTVSS	
11E1 HZ VH1	DYAQKFQ.GRVTMTADKSTSTVYMELSSLRSSEDTAVYYC					AIGGYGSWFAY		WGQGTLVTVSS	

FIGURA 60

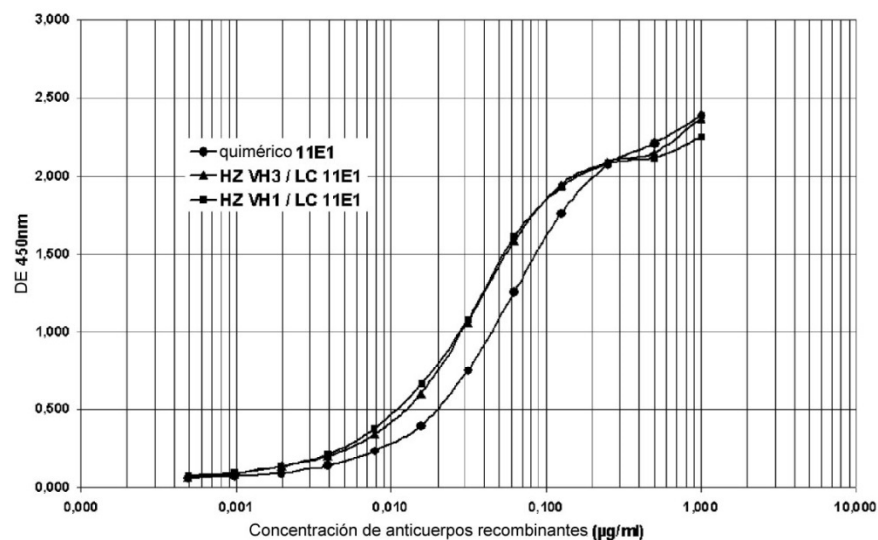


FIGURA 61

	FR1-IMGT (1-26)				CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20		30		40	50		60
11E1 VL	QIV	LTQSP	AIM	ASPGE	KVTL	TCS	AS	SSVS	STY	
FR Humano	E--M	-----	TL-L	-----	RA--S	R--		-S-----	QA-R-L--	TTS.....
Cambiado en	* 1		*3 *		**	* 2		1	33 * 2	
11E1 HZ VL3	EIV	LTQSP	ATM	SLSPGER	ATL	SC	SS	SSVS	STY	
11E1 HZ VL2	EIV	LTQSP	ATL	SLSPGER	ATL	SC	SS	SSVS	STY	
11E1 HZ VL1	EIV	LTQSP	ATL	SLSPGER	ATL	SC	SS	SSVS	STY	

	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-113)		FR4-IMGT (114-123)					
	70	80	90	100	110		120					
11E1 VL	IL	ASGV	P	ARFSGSG	..SGT	SYS	LT	ISS	MET	ED	A	SYFC
FR Humano	TR-T-I	-	-----	..---	DFT	---	LQP	--F-V-Y-				
Cambiado en	22 *	*		213			321	2 3 3			3	*2
11E1 HZ VL3	IL	ATGIP	ARFSGSG	..SGT	SYS	LT	ISS	MET	ED	A	SYFC	
11E1 HZ VL2	IL	ATGIP	ARFSGSG	..SGT	SYS	LT	ISS	MET	ED	A	AVYYC	
11E1 HZ VL1	TR	ATGIP	ARFSGSG	..SGT	DY	TL	ISS	LQ	TE	D	FAVYYC	

FIGURA 62

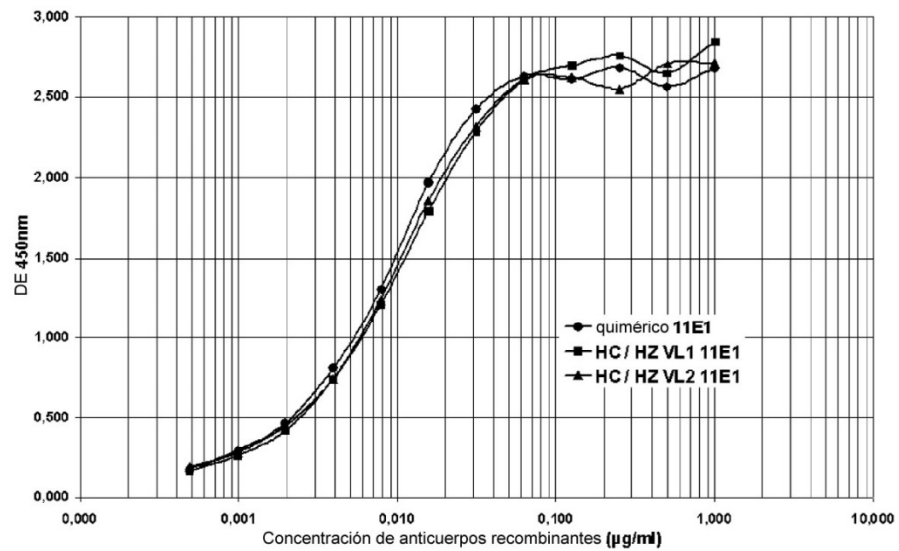


FIGURA 63

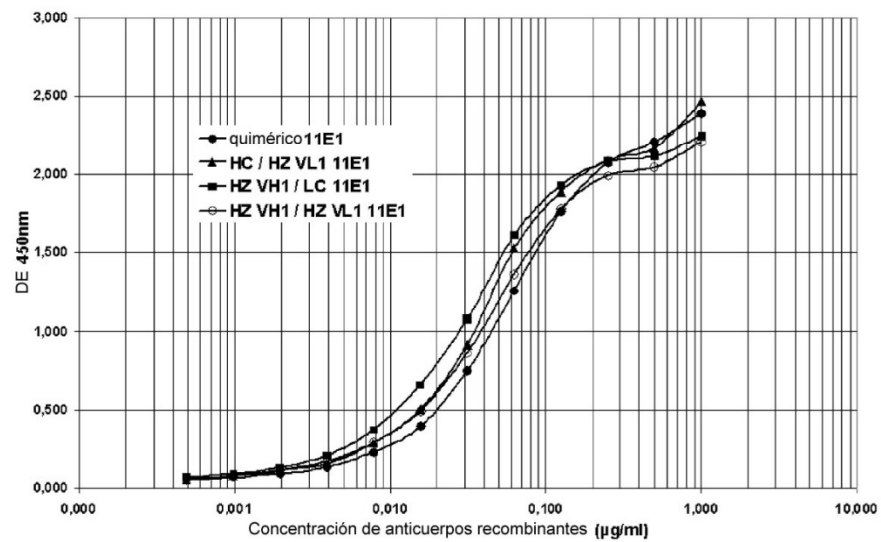


FIGURA 64

		FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
		1	10	20	30		40	50	60	
224G11	VH									
		EVQLQSSGP	.ELVKPGASVKISCKTS	GYIFTAYT...	MHWVRQSLGESLDWIGG	IKPNNGLA..				
227H1	VH	EVQLQSSGP	.ELVKPGASVKISCKAS	GYSFTDYT...	LNWVKQSHGKTLEWIGL	INPYNGGT..				
FR Humano		Q---V---A	-VK-----V---A-		-----AP-QG-E-M-W					
224G11	HZ VH0	QVQLVQSGA	.EVKKPGASVKVSCAS	GYIFTAYT...	MHWVRQAPQGLEWMGW	IKPNNGLA..				
		FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-115)		FR4-IMGT (116-126)		
		70	80	90	100	110		120		
224G11	VH									
		NYNQKFK	.GKATLTVDKSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYC	ARSEITTEFDY	WGQGTALTIVSS					
227H1	VH	TYNQKFK	.GKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYC	AREEITKDFDF	WGQGTALTIVSS					
FR Humano		--A---Q	-RV-M-R-T-I-----E-SR-R-D-T-----		-----LV-----					
224G11	HZ VH0	NYAQKFQ	.GRVTMTSDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYC	ARSEITTEFDY	WGQGTALTIVSS					

FIGURA 65

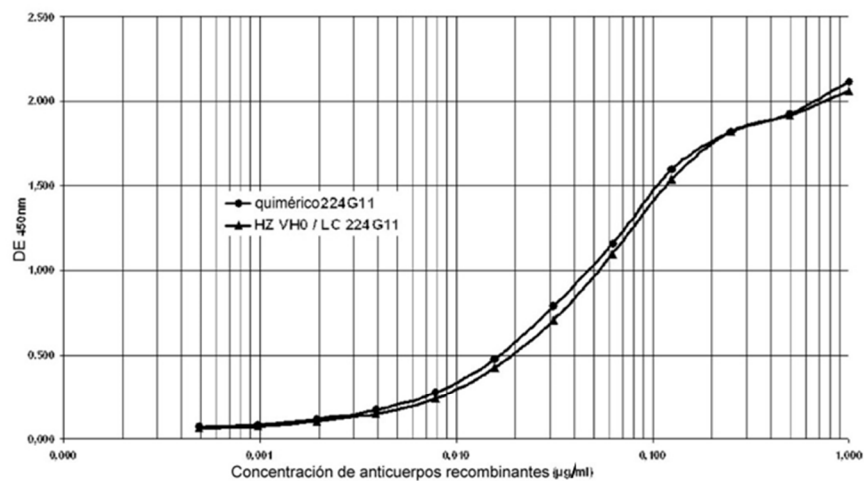


FIGURA 66

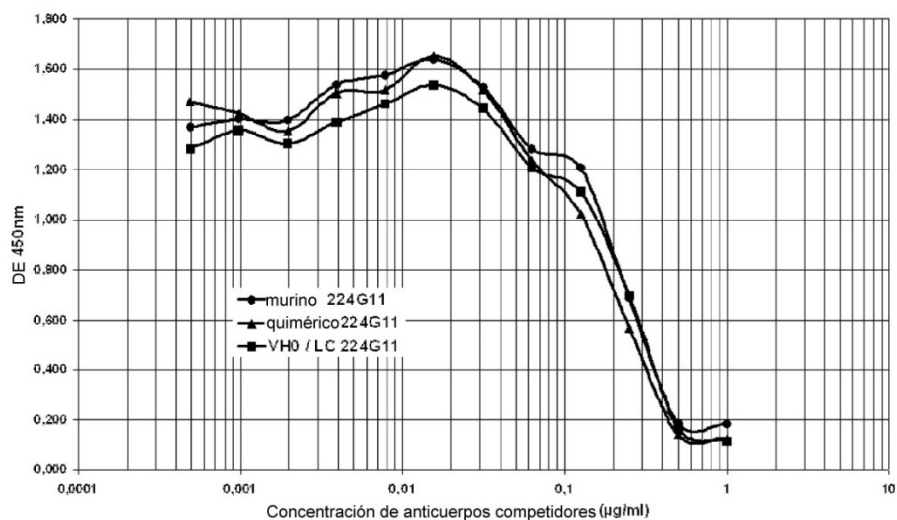


FIGURA 67

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
	1 10 20	30	40 50	60
224G11 VL	 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS	 ESVDSYANSF..	 MHWYQQKPGQPPKLLIY	 RAS.....
Hu-FR más corto Rango	E-----T-SL-P-E---L----- * * 3* 2 3 *		LA-----A-R----- 11 2 3	
224G11 HZ VL3	RIVLTQSPATIALSLGQRATISCRAS	ESVDSYANSF..	MHWYQQKPGQP P KLLIY	RAS.....
Hu-FR más largo Rango	---M---D-----E---N-KS- 1 * 3 * 32		LA----- 11	
224G11 HZ VL6	DIVLTQSPDSLAVSLGQRATINCRAS	ESVDSYANSF..	MHWYQQKPGQP P KLLIY	RAS.....
	FR3-IMGT (66-104)		CDR3-IMGT (105-113)	FR4-IMGT (114-123)
	70 80 90 100		110	120
224G11 VL	 NLESGIP.ARFSGSG..SRDTFTLTINPVEADDVATYYC		 QQSKEDPLT	 FGSGTKLEMK
Hu-FR más corto Rango	-RAT---.-----.-G-----SSL-PE-F-V--- 22* 1 32* 33 2 3		--G---V-I- 3 * *	
224G11 HZ VL3	NLETGIP.ARFSGSG..SRDTFTLTIN P LEADDVATYYC		QQSKEDPLT	FGSGTKVEIK
Hu-FR más largo Rango	TR--V-.D-----.-G-----SSLQ-E---V--- 22 * * 1 32*3 3 3 3		--G---V-I- 3 * *	
224G11 HZ VL6	NLESGVP.DRFSGSG..SRDTFTLTIN P LEADDVATYYC		QQSKEDPLT	FGSGTKVEIK

FIGURA 68

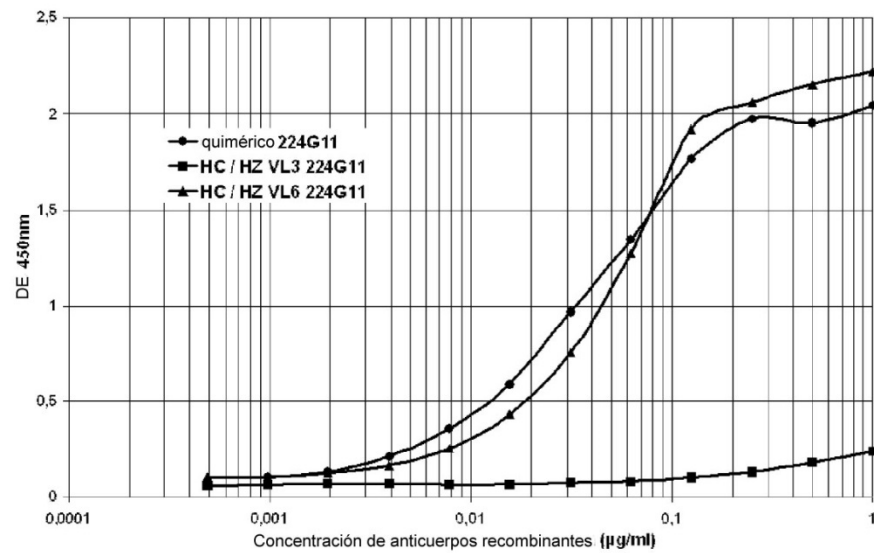


FIGURA 69

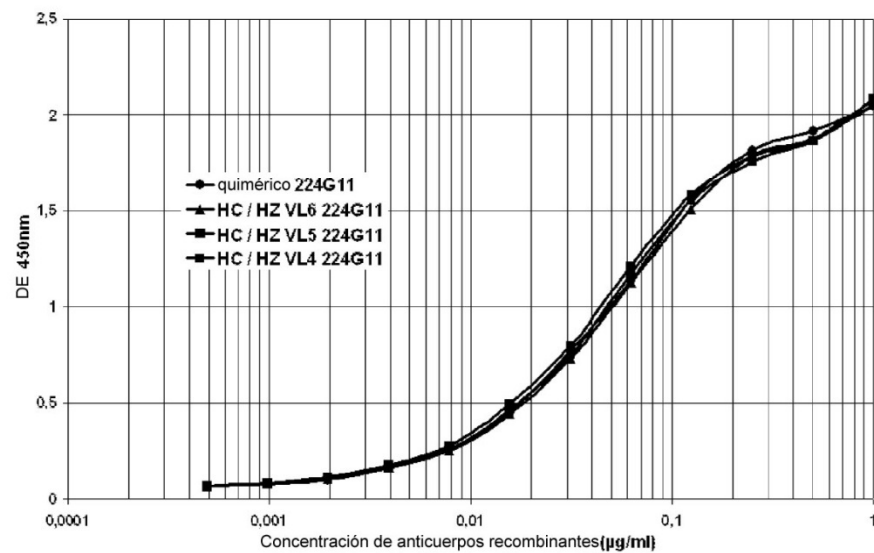


FIGURA 70

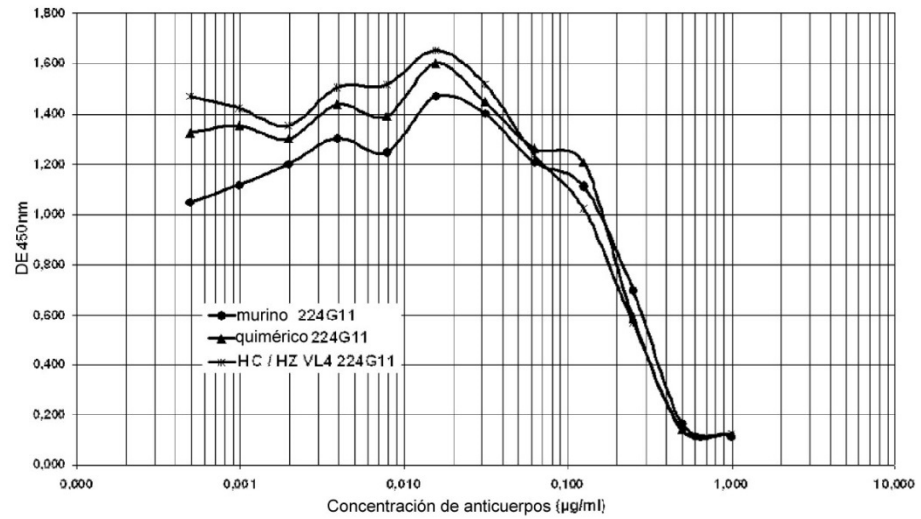


FIGURA 71

		FR1-IMGT (1-26)										CDR1-IMGT (27-38)										FR2-IMGT (39-55)										CDR2-IMGT (56-65)									
		1					10					20					30					40					50					60									
224G11 HZ VL4		DIVLTQSPDLSAVLSIGERATINCKSS										ESVDSYANSF..										MHVYQQKPGQPPKLLIY										RAS.....									
humanización		\$ *										! * !!																				\$\$									
		FR3-IMGT (66-104)																				CDR3-IMGT (105-113)										FR4-IMGT (114-123)									
		70					80					90					100					110					120														
224G11 HZ VL4		TRESGVP.DRFSGSG..SRRTDFTLTITSSLQAEDVAVYYC																				QSKEDPLT										FGGGTKVEIK									
humanización		!! * * \$																				!!! ! !																			

FIGURA 72

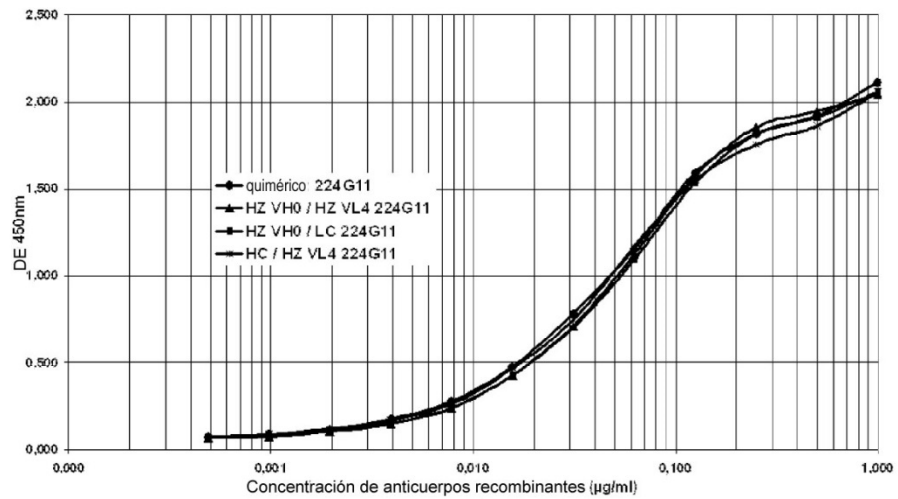


FIGURA 73

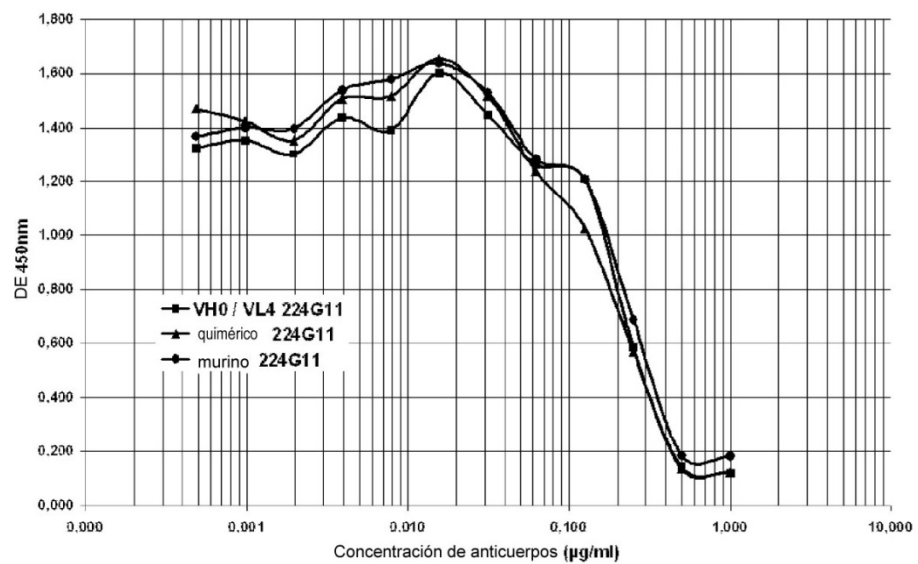


FIGURA 74

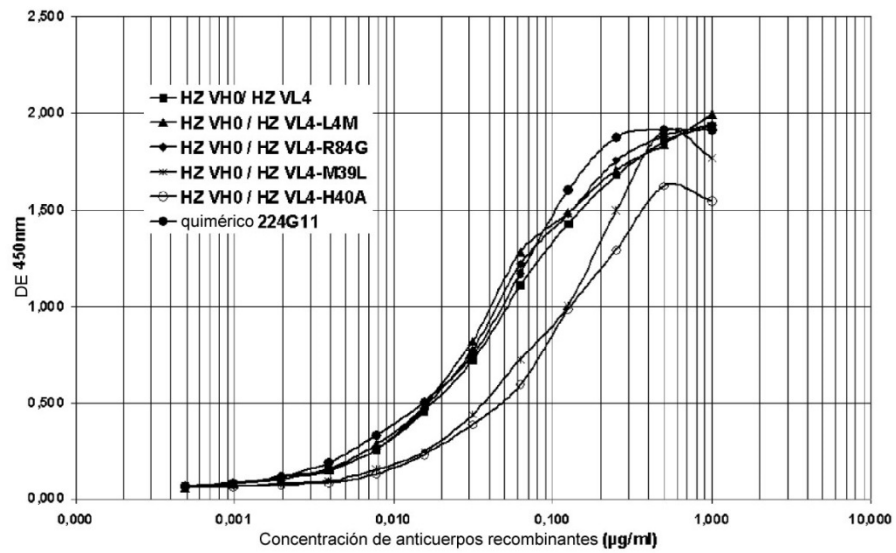


FIGURA 75

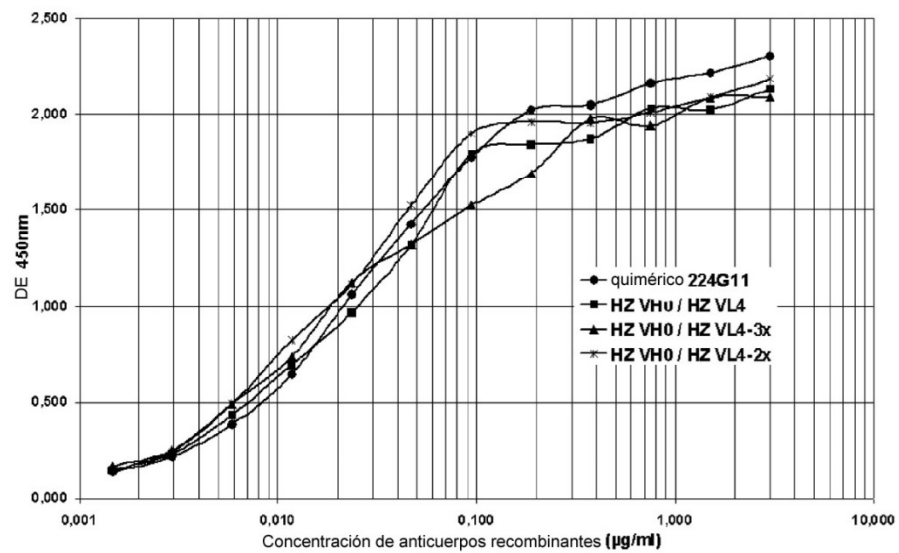


FIGURA 76

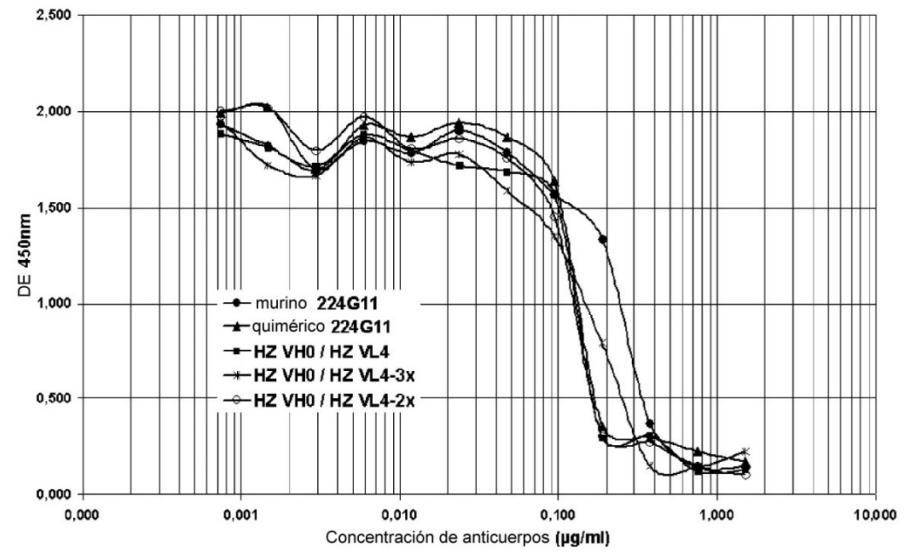


FIGURA 77