

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 522**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2010 PCT/EP2010/062271**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.02.2011 WO11020925**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2010 E 10744608 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2467402**

54 Título: **Anticuerpo anti-cMet y su utilización para la detección y el diagnóstico del cáncer**

30 Prioridad:

21.08.2009 EP 09305777

21.08.2009 US 235864 P

25.05.2010 US 348005 P

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

04.12.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GOETSCH, LILIANE y
JOUHANNEAUD, ALEXANDRA**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 692 522 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

Anticuerpo anti-cMet y su utilización para la detección y el diagnóstico del cáncer.

- 5 La presente invención se refiere al campo del pronóstico y/o diagnóstico de una enfermedad proliferativa en un paciente. Más particularmente, la invención se refiere a un nuevo anticuerpo apto para unirse específicamente al receptor cMet humano, así como las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que codifican este anticuerpo. La invención comprende asimismo la utilización de dicho anticuerpo y los procedimientos correspondientes para la detección y diagnóstico de trastornos oncogénos patológicos hiperproliferativos asociados a la expresión de cMet. En ciertas formas de realización, los trastornos son trastornos oncogénos con expresión incrementada del polipéptido cMet con respecto a la normal, o cualquier otra patología asociada a la sobreexpresión de cMet. La invención comprende, por último, los productos y/o composiciones o kits que comprenden por lo menos un anticuerpo de ese tipo para el pronóstico o diagnóstico de ciertos cánceres.
- 10
- 15 Los agentes dirigidos al receptor de tirosina cinasa (RTK) tales los inhibidores trastuzumab, cetuximab, bevacizumab, imatinib y gefitinib han ilustrado el interés de adoptar como diana esta proteína para el tratamiento de cánceres seleccionados.
- cMet, es el miembro prototípico de una subfamilia de RTKs que también incluye RON y SEA. La familia de RTK cMet es estructuralmente diferente de otras familias de RTK y es el único receptor conocido con alta afinidad por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), también denominado factor disperso (SF) [D.P. Bottaro et al., Science 1991, 251: 802-804; L. Naldini et al., Eur. Mol. Biol. Org. J. 1991, 10:2867-2878]. cMet y HGF se expresan ampliamente en una variedad de tejidos y su expresión se limita normalmente a las células de origen epitelial y mesenquimático, respectivamente [M.F. Di Renzo et al., Oncogene 1991, 6:1997-2003; E. Sonnenberg et al., J. Cell. Biol. 1993, 123:223-235]. Ambos son necesarios para el desarrollo normal de los mamíferos y se ha demostrado que son particularmente importantes en la migración celular, la diferenciación morfológica y la organización de las estructuras tubulares tridimensionales, así como en su 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]. Si bien se ha demostrado que la regulación controlada de cMet y HGF es importante para el desarrollo de los mamíferos, el mantenimiento y reparación de tejidos [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 desregulación está implicada en el progreso de los cánceres.
- 20
- 25
- 30
- 35 La señalización aberrante desencadenada por la activación incorrecta de cMet es una de las aberraciones más frecuentes observadas en los cánceres humanos y desempeña una función crucial en la tumorigénesis y metástasis [Birchmeier et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003, 4:915-925; L. Trusolino y Comoglio P. M., Nat Rev. Cancer. 2002, 2(4):289-300].
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- La activación incorrecta de cMet se puede suscitar mediante mecanismos dependientes de ligandos e independientes, que incluyen la sobreexpresión de cMet, y/o la activación paracrina o autocrina, o por una ganancia de mutación de funciones [J.G. Christensen, Burrows J. y Salgia R., cáncer Letters. 2005, 226:1-26]. Sin embargo, es necesaria la oligomerización del receptor cMet, en presencia o ausencia del ligando, para regular la afinidad de unión y la cinética de unión de la cinasa hacia sustratos peptídicos con contenido de ATP y tirosina [Hays JL, Watowich SJ, Biochemistry, 2004 Ago. 17, 43:10570-8]. El cMet activado recluta efectores de la señalización hacia su sitio de multianclaje situado en el dominio del citoplasma, para dar lugar a la activación de varias vías de señalización clave, que incluyen 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 vías son esenciales para la proliferación de células tumorales, invasión y angiogénesis y para eludir la 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 Abr 27, 19(18):2212-23]. Además, una faceta singular de la señalización de cMet con respecto a los otros RTK es su interacción informada con los complejos de adhesión focal y asociados que no se unen a cinasas tales como las integrinas $\alpha 6 \beta 4$ [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, Valdembrì 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 pueden agregar aun más a la complejidad de regulación de la función celular por su receptor. Por último, los datos recientes demuestran que cMet puede estar implicado en la resistencia de los tumores al gefitinib o erlotinib, lo que sugiere que la combinación de compuestos que se dirigen tanto al EGFR como a cMet podrían ser de considerable interés [Engelman JA et al., Science, 2007, 316:1039-43].
- En los últimos años, se han desarrollado numerosas estrategias para atenuar la señalización de cMET en estirpes de células cancerosas. Estas estrategias incluyen i) anticuerpos neutralizantes contra cMet 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 del antagonista de HGF/SF NK4 para prevenir la unión del ligando a cMet [Kuba K, Matsumoto K, Date K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T, Cancer Res., 2000, 60:6737-43], ii) pequeños inhibidores del sitio de unión de ATP a cMet que bloquean la 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 diseño que interfiere con el acceso al sitio de multianclaje y ARNi o ribozima que reduce la expresión del receptor o ligando. La mayoría de estas estrategias exhiben una inhibición selectiva de cMet, que da lugar a la inhibición de los tumores y demuestra que cMet podría ser de interés para la intervención terapéutica en el cáncer.

El objetivo de la presente invención consiste en producir por lo menos un reactivo que se puede utilizar como biomarcador de diagnóstico o pronóstico para detectar y/o monitorear trastornos oncogénos, especialmente los que se caracterizan por la expresión de cMet o los que son mediados por la expresión aberrante de cMet. Por lo tanto, la invención es como se reivindica.

No se han dado a conocer intentos anteriores por desarrollar un anticuerpo valioso que se pueda utilizar como herramienta de diagnóstico o pronóstico. En la presente memoria se describen nuevos anticuerpos que satisfacen estos criterios.

En un primer aspecto, un asunto de la invención es un anticuerpo aislado, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, que se une al receptor cMET (cMet) preferentemente cMet humano, con alta afinidad y, por lo tanto, puede ser de utilidad en procedimientos para diagnosticar trastornos oncogénos hiperproliferativos mediados por la expresión de cMet.

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

Debe apreciarse en la presente memoria que la divulgación no se refiere a los anticuerpos en su forma natural; es decir, que no están en su ambiente natural sino que han podido ser aislados u obtenidos mediante purificación de fuentes naturales o de lo contrario obtenidos por recombinación genética o por síntesis química, y que entonces pueden contener aminoácidos no naturales, como se describe a continuación con mayor detalle.

Más particularmente, de acuerdo con otro aspecto de la invención, se reivindica un anticuerpo aislado, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, con capacidad para unirse específicamente a cMet, caracterizándose dicho anticuerpo por que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) seleccionada de entre las CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 1 a 12 o 29 a 39 o por lo menos una CDR cuya secuencia presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después del alineamiento óptimo con las secuencias 1 a 12 o 29 a 39.

Un "fragmento funcional" de un anticuerpo se refiere específicamente a un fragmento de anticuerpo, como por ejemplo los fragmentos Fv, scFv (sc= cadena simple), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o cualquier fragmento cuya vida media se haya incrementado. Dichos fragmentos funcionales se describen con mayor detalle a continuación en la presente descripción.

Un "compuesto derivado" o "derivado" de un anticuerpo se refiere, en particular, a una proteína de unión compuesta por un andamiaje peptídico y por lo menos una de las CDR del anticuerpo original para conservar su capacidad para ser reconocido. Dichos compuestos derivados, muy conocidos por un experto en la materia, se describen a continuación en la presente descripción.

Más preferentemente, la invención comprende los anticuerpos, sus compuestos derivados o sus fragmentos funcionales de acuerdo con la presente invención, obtenidos por recombinación genética o síntesis química.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el anticuerpo de acuerdo con la invención, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza por consistir en un anticuerpo monoclonal.

Debe apreciarse que la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que surge de una población casi homogénea. Más específicamente, los anticuerpos individuales de una población son idénticos, excepto por unas pocas mutaciones de origen natural posibles que se pueden encontrar en proporciones mínimas. En otras palabras, un anticuerpo monoclonal consiste en un anticuerpo homogéneo que surge del cultivo de un único clon celular (por ejemplo, un hibridoma, una célula hospedadora eucariota transfectada con una molécula de ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, una célula hospedadora procariota transfectada con una molécula de ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, etc.) y generalmente se caracteriza por cadenas pesadas una, y solo una clase y subclase, y cadenas ligeras únicamente de un tipo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un único antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos

policionales que incluyen, por lo general, diversos anticuerpos dirigidos contra diversos determinantes, o epítomos, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo epítomo del antígeno.

Preferentemente, las CDR del anticuerpo se definen de acuerdo con el sistema de numeración IMGT.

5 Se ha definido la numeración característica de IMGT para comparar los dominios variables sin importar el receptor del 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., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. y Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. En la numeración
10 característica IMGT, los aminoácidos conservados tienen siempre 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 singular numeración IMGT ofrece una delimitación normalizada de las regiones de marco (FR1-IMGT: posiciones 1 a 26, FR2-IMGT: 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 y FR4-IMGT: 118 a 128) y de las regiones determinantes de la complementariedad: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 y CDR3-IMGT: 105 a 117. Como los huecos representan posiciones no ocupadas, los tramos de CDR-IMGT
15 (expuestos entre paréntesis y separados por puntos, por ej. [8.8.13]) se convierten en información crucial. La singular numeración de IMGT se utiliza en representaciones gráficas 2D, designadas IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. y Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], y en estructuras 3D en IMGT/estructura3D-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Existen tres CDR de cadena pesada y 3 CDR de cadena ligera. El término CDR o CDRs se utiliza en la presente memoria para indicar, según el caso, una o varias de estas regiones o incluso la totalidad de estas regiones que
25 contienen la mayor parte de los residuos aminoácidos responsables de la unión por afinidad del anticuerpo por el antígeno y el epítomo que reconoce.

Más particularmente, de acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo aislado, o un fragmento o derivado funcional del mismo, con capacidad para unirse específicamente a la proteína c-Met, que comprende i) una cadena pesada que comprende por lo menos una de las siguientes CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, según lo definido de acuerdo con el sistema de numeración IMGT, donde CDR-H1 comprende la secuencia
30 SEC ID nº 55, CDR-H2 comprende la secuencia SEC ID nº 56 y CDR-H3 comprende la secuencia SEC ID nº 57; y/o ii) una cadena ligera que comprende por lo menos una de las siguientes CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, según lo definido de acuerdo con el sistema de numeración IMGT, donde CDR-L1 comprende la secuencia SEC ID nº 58, CDR-L2 comprende la secuencia SEC ID nº 59 y CDR-L3 comprende la secuencia SEC ID nº 60.

Una forma de realización preferida proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento funcional o derivado del mismo, con capacidad para unirse específicamente a la proteína c-Met, que se caracteriza por que comprende i) una cadena pesada que comprende por lo menos las siguientes tres CDR CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, según lo
40 definido de acuerdo con el sistema de numeración IMGT, donde CDR-H1 comprende la secuencia SEC ID nº 55, CDR-H2 comprende la secuencia SEC ID nº 56 y CDR-H3 comprende la secuencia SEC ID nº 57; y/o ii) una cadena ligera que comprende por lo menos las siguientes tres CDR: CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, según lo definido de acuerdo con el sistema de numeración IMGT, donde CDR-L1 comprende la secuencia SEC ID nº 58, CDR-L2 comprende la secuencia SEC ID nº 59 y CDR-L3 comprende la secuencia SEC ID nº 60.

45 Para ponerse más claramente de manifiesto, las secuencias consenso SEC ID nº 55 a 60 de la invención están resumidas en la siguiente tabla 1.

Tabla 1

	SEC ID nº	Secuencia (IMGT)
CDR-H1	55	GYX ₁ X ₂ TSX ₃ YX ₄
CDR-H2	56	INX ₅ X ₆ X ₇ GX ₈ X ₉
CDR-H3	57	X ₁₀ RX ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ Y
CDR-L1	58	X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ Y
CDR-L2	59	X ₂₃ X ₂₄ S
CDR-L3	60	QQX ₂₅ NSX ₂₆ PX ₂₇ T

50 Donde:

X ₁ : S o T	X ₂ : I o F	X ₃ : A o -	X ₄ : F o W
X ₅ : Y o P	X ₆ : D o S	X ₇ : - o N	X ₈ : T o R
X ₉ : N o T	X ₁₀ : T o A	X ₁₁ : D o R	X ₁₂ : R o V
X ₁₃ : T o G	X ₁₄ : F o Y	X ₁₅ : A o L	X ₁₆ : - o M
X ₁₇ : - o D	X ₁₈ : Q o -	X ₁₉ : R o S	X ₂₀ : I o S
X ₂₁ : Y o V	X ₂₂ : N o S	X ₂₃ : Y o D	X ₂₄ : A o T

X₂₅: S o WX₂₆: W o NX₂₇: L o P

 “-” corresponde a “ausente (eliminación del residuo aminoácido en esta posición)”

5 De acuerdo con una forma de realización particular, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, se caracteriza por el hecho de que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes definidas según el IMGT, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde CDR-H1 comprende la secuencia SEC ID nº 7, CDR-H2 comprende la secuencia SEC ID nº 2 and CDR-H3 comprende la secuencia SEC ID nº 8.

10 De acuerdo con una forma de realización particular, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, se caracteriza por el hecho de que comprende una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes definidas según el IMGT, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde CDR-L1 comprende la secuencia SEC ID nº 4, CDR-L2 comprende la secuencia SEC ID nº 5 and CDR-L3 comprende la secuencia SEC ID nº 6.

15 De acuerdo con una forma de realización particular, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, se caracteriza por el hecho de que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes según lo definido de acuerdo con el sistema de numeración IMGT, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde CDR-H1 comprende la secuencia SEC ID nº 29, CDR-H2 comprende la secuencia SEC ID nº 30 y CDR-H3 comprende la secuencia SEC ID nº 31.

20 De acuerdo con una forma de realización particular, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, se caracteriza por el hecho de que comprende una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes según lo definido de acuerdo con el sistema de numeración IMGT, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde CDR-L1 comprende la secuencia SEC ID nº 32, CDR-L2 comprende la secuencia SEC ID nº 33 y CDR-L3 comprende la secuencia SEC ID nº 34.

25 Es decir, se proporciona en la presente memoria un anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, que se caracteriza por el hecho de que comprende una cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste en:

30 a) una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes según lo definido de acuerdo con el sistema de numeración IMGT, CDR-H1 que presenta la secuencia SEC ID nº 7, CDR-H2 que presenta la secuencia SEC ID nº 2 y CDR-H3 que presenta la secuencia SEC ID nº 8 respectivamente y

35 b) una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes según lo definido de acuerdo con el sistema de numeración IMGT, CDR-H1 que presenta la secuencia SEC ID nº 29, CDR-H2 que presenta la secuencia SEC ID nº 30 y CDR-H3 que presenta la secuencia SEC ID nº 31 respectivamente.

40 Se proporciona asimismo en la presente memoria un anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, que se caracteriza por comprender una cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste en:

40 a) una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes según lo definido de acuerdo con el sistema de numeración IMGT, CDR-L1 que presenta la secuencia SEC ID nº 4, CDR-L2 que presenta la secuencia SEC ID nº 5 y CDR-L3 que presenta la secuencia SEC ID nº 6, respectivamente y

45 b) una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes según lo definido de acuerdo con el sistema de numeración IMGT, CDR-L1 que presenta la secuencia SEC ID nº 32, CDR-L2 que presenta la secuencia SEC ID nº 33 y CDR-L3 que presenta la secuencia SEC ID nº 34 respectivamente.

50 En otra forma de realización, región determinante de la complementariedad, o CDR, se refiere a regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas según lo definido por Kabat *et al.* (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5^a Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991 y ediciones posteriores). Existen tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera. En este contexto, los términos “CDR” y “CDR” se utilizan para indicar, dependiendo del caso, una o más, o incluso todas, las regiones que contienen la mayoría de los residuos aminoácidos responsables de la afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno o el epítipo que reconoce.

60 De acuerdo con otra forma de realización particular, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, se caracteriza por el hecho de que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes definidas de acuerdo con Kabat, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde CDR-H1 comprende la secuencia SEC ID nº 9, CDR-H2 comprende la secuencia SEC ID nº 10 y CDR-H3 comprende la secuencia SEC ID nº 3.

De acuerdo con otra forma de realización particular, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, se caracteriza por el hecho de que comprende una cadena ligera que comprende las

tres CDR siguientes definidas de acuerdo con Kabat, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde CDR-L1 comprende la secuencia 11, CDR-L2 comprende la secuencia 12 y CDR-L3 comprende la secuencia 6.

5 De acuerdo con otra forma de realización particular, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, se caracteriza por el hecho de que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes definidas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, respectivamente: CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde CDR-H1 comprende la secuencia SEC ID nº 35, CDR-H2 comprende la secuencia SEC ID nº 36 y CDR-H3 comprende la secuencia SEC ID nº 37.

10 De acuerdo con otra forma de realización particular, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, se caracteriza por el hecho de que comprende una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes definidas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde CDR-L1 comprende la secuencia SEC ID nº 38, CDR-L2 comprende la secuencia SEC ID nº 39 y CDR-L3 comprende la secuencia SEC ID nº 34.

15 Otra manera de definir las CDR de los anticuerpos de acuerdo con la presente invención puede consistir en determinar los residuos comunes correspondientes a cada CDR de acuerdo con IMGT y a continuación Kabat.

20 De acuerdo con otra forma de realización, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, se caracteriza por el hecho de que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una de las tres CDR de las secuencias SEC ID Nos. 1, 2 o 3, o por lo menos una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después del alineamiento óptimo, con las secuencias SEC ID Nos. 1, 2 o 3.

25 Más particularmente, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, se caracteriza por el hecho de que comprende una cadena ligera que comprende por lo menos una de las tres CDR de las secuencias SEC ID Nos. 4, 5 o 6, o por lo menos una secuencia con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad, después del alineamiento óptimo, con las secuencias SEC ID Nos. 4, 5 o 6.

30 De una manera preferida, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, se caracteriza por el hecho de que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

35 - CDR-H1 comprende la secuencia SEC ID nº 1, 7, 9, 29 o 35, o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 1, 7, 9, 29 o 35;

40 - CDR-H2 comprende las secuencias SEC ID nº 2, 10, 30 o 36, o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 2, 10, 30 o 36 y

45 - CDR-H3 comprende la secuencia SEC ID nº 3, 8, 31 o 37, o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 3, 8, 31 o 37.

Aun más preferentemente, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, se caracteriza por el hecho de que comprende una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde:

50 - CDR-L1 comprende la secuencia SEC ID nº 4, 11, 32 o 38, o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 4, 11, 32 o 38;

55 - CDR-L2 comprende las secuencias SEC ID nº 5, 12, 33 o 39, o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 5, 12, 33 o 39 y

60 - CDR-L3 comprende la secuencia SEC ID nº 6 o 34, o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 6 o 34.

La invención se refiere a un anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, que se caracteriza por ser seleccionado de entre el grupo que consiste en:

65 a) un anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, que comprende:

- una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes definidas según el IMGT, respectivamente CDR-H1 que presenta la secuencia SEC ID nº 7, CDR-H2 que presenta la secuencia SEC ID nº 2 y CDR-H3 que presenta la secuencia SEC ID nº 8 y
- 5 - una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes definidas según el IMGT, respectivamente CDR-L1 que presenta la secuencia SEC ID nº 4, CDR-L2 que presenta la secuencia SEC ID nº 5 y CDR-L3 que presenta la secuencia SEC ID nº 6 y
- b) un anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, que comprende:
 - 10 - una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes definidas según el IMGT, respectivamente CDR-H1 que presenta la secuencia SEC ID nº 29, CDR-H2 que presenta la secuencia SEC ID nº 30 y CDR-H3 que presenta la secuencia SEC ID nº 31 y
 - 15 - una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes definidas según el IMGT, respectivamente CDR-L1 que presenta la secuencia SEC ID nº 32, CDR-L2 que presenta la secuencia SEC ID nº 33 y CDR-L3 que presenta la secuencia SEC ID nº 34.

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

25 Para mayor claridad, debe apreciarse que, en la siguiente descripción, y más específicamente en las tablas 3a y 4a, las CDR del anticuerpo denominado 224D10, se definen por la numeración IMGT, la numeración de Kabat y por la numeración común.

La numeración común reagrupa los residuos que forman parte de cada CDR, que son comunes a las CDR definidas por los sistemas de numeración IMGT y de Kabat.

30 El sistema de numeración IMGT define las CDR de acuerdo con el sistema IMGT definido, en tanto que el sistema de numeración de Kabat define las CDR de acuerdo con el sistema de Kabat definido anteriormente.

Más particularmente, la CDR-H1 consiste en la SEC ID nº 1 (**TSAYF**) en el sistema de numeración común, en la SEC ID nº 7 (**GYSITSAFY**) en el sistema de numeración IMGT en la SEC ID nº 9 (**TSAYFWS**) en el sistema de numeración de Kabat.

35 La CDR-H2 consiste en la SEC ID nº 2 (**INYDGTN**) en los sistemas común y IMGT y en SEC ID nº 10 (**FINYDGTNNYNPSLKN**) en el sistema de numeración de Kabat.

40 La CDR-H3 consiste en la SEC ID nº 3 (**DRTFAY**) en los sistemas de numeración común y de kabat, en tanto que consiste en SEC ID nº 8 (**TRDRTFAY**) en el sistema de numeración IMGT.

En el caso de la cadena ligera, CDR-L1 consiste en SEC ID nº 4 (**QRIYNY**) en el sistema de numeración común y de IMGT y en SEC ID nº 11 (**RASQRIYNYLH**) en el sistema de numeración de Kabat.

45 Con respecto a CDR-L2, ésta consiste en SEC ID nº 5 (**YAS**) en los sistemas de numeración común e IMGT y en SEC ID nº 12 (**YASQSIG**) en el sistema de numeración de Kabat.

50 Por último, la CDR-L3 consiste en SEC ID nº 6 (**QSNSWPLT**) según cada uno de los tres sistemas de numeración.

Un experto en la materia puede hacer lo mismo con respecto al anticuerpo 221C9.

55 Paralelamente, para mayor claridad, debe apreciarse en la siguiente descripción, y más específicamente en las tablas 3b y 4b, se definen las CDR del anticuerpo denominado 221C9, según la numeración IMGT y la numeración de kabat.

60 Como se utiliza en la presente memoria, el “porcentaje de identidad” entre dos secuencias de aminoácidos se refiere al porcentaje de nucleótidos o residuos aminoácidos idénticos entre las dos secuencias que se deben comparar, obtenido tras el alineamiento óptimo, porcentaje este que es puramente estadístico y donde las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen de manera aleatoria en toda su longitud. La comparación de dos secuencias de ácido nucleico o aminoácidos se lleva a cabo tradicionalmente comparando las secuencias después de haberlas alineadas de manera óptima, comparación que se puede realizar por segmentos o utilizando una “ventana de alineamiento”. El alineamiento óptimo de las secuencias para su comparación se puede llevar a cabo, además de por comparación manual, por medio de un algoritmo de homología local de Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], por medio del procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman

(1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] o por medio de software de computación que utiliza estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o mediante el software de comparación BLAST NR o BLAST P).

5 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o aminoácidos se determina comparando las dos secuencias alineadas de manera óptima en las cuales la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos que se deben comparar pueden tener adiciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia para la alineación óptima entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de
10 posiciones en las cuales el residuo aminoácido o nucleótido es idéntico entre las dos secuencias, dividiendo el número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en la ventana de alineamiento y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre las dos secuencias.

Por ejemplo, el programa BLAST, "BLAST 2 secuencias" (Tatusova *et al.*, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174:247-250) que se puede obtener
15 en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, se puede utilizar con los parámetros por defecto (notablemente para los parámetros "penalización por abertura de hueco" 5 y "penalización por extensión de hueco": 2; donde la matriz seleccionada es, por ejemplo, la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa) el porcentaje de identidad entre las dos secuencias que se deben comparar es calculado directamente por el programa.

20 En el caso de la secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad con una secuencia de aminoácidos de aminoácidos, los ejemplos preferidos incluyen los que contienen la secuencia de referencia, ciertas modificaciones, particularmente una eliminación, adición o sustitución de por lo menos un aminoácido, truncamiento o extensión. En el caso de la sustitución de uno o más
25 aminoácidos consecutivos o no consecutivos, se prefieren las sustituciones en las cuales se reemplazan los aminoácidos sustituidos por aminoácidos "equivalentes". En este caso, se utiliza la expresión "aminoácidos equivalentes" para indicar cualquier aminoácido con probabilidad de ser sustituido por uno de los aminoácidos estructurales sin modificar, sin embargo, las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes y las de los ejemplos específicos definidos a continuación.

30 Se pueden determinar los aminoácidos equivalentes por su homología estructural con los aminoácidos por los cuales son sustituidos o basándose en los resultados de las pruebas comparativas de actividad biológica entre los diversos anticuerpos que probablemente se generen.

35 A título de ejemplo no limitativo, la siguiente tabla 2 resume las posibles sustituciones que probablemente se lleven a cabo sin dar lugar a una modificación significativa de la actividad biológica del correspondiente anticuerpo modificado; naturalmente son posibles sustituciones inversas en las mismas condiciones.

Tabla 2

40

Residuo original	Sustitución (sustituciones)
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

Un experto en la materia sabe que en el estado actual de la técnica, se encuentra la mayor variabilidad (longitud y composición) entre las seis CDR en las tres CDR de cadena pesada y, más específicamente, en la CDR-H3 de esta cadena pesada.

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

5 Otra forma de realización de la invención divulga el anticuerpo 224D10, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, que comprende:

una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, sobre la base de la definición "común" de las CDR:

- 10
- CDR-H1 de la secuencia SEC ID nº 1 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 1;
 - 15 - CDR-H2 de la secuencia SEC ID nº 2 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 2 y
 - CDR-H3 de la secuencia SEC ID nº 3 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 3 y

20 una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes:

- CDR-L1 de la secuencia SEC ID nº 4 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 4;
- 25 - CDR-L2 de la secuencia SEC ID nº 5 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 5; y
- CDR-L3 de la secuencia SEC ID nº 6 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 6.

30 Todavía otra forma de realización de la invención divulga el anticuerpo 224D10, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, que comprende:

una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, basándose en el sistema de numeración IMGT:

- 35
- CDR-H1 de la secuencia SEC ID nº 7 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 7;
 - 40 - CDR-H2 de la secuencia SEC ID nº 2 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después del alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 2 y
 - CDR-H3 de la secuencia SEC ID nº 8 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después del alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 8 y

45 una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes:

- CDR-L1 de la secuencia SEC ID nº 4 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 4;
- 50 - CDR-L2 de la secuencia SEC ID nº 5 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después del alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 5; y
- CDR-L3 de la secuencia SEC ID nº 6 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 6.

55 Todavía otra forma de realización divulga el anticuerpo 224D10, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, que comprende:

una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, sobre la base del sistema de numeración de Kabat:

- 60
- CDR-H1 de la secuencia SEC ID nº 9 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 9;
 - 65 - CDR-H2 de la secuencia SEC ID nº 10 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 10 y

- CDR-H3 de la secuencia SEC ID nº 3 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 3, y

5 una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes:

- CDR-L1 de la secuencia SEC ID nº 11 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 11;

10 - CDR-L2 de la secuencia SEC ID nº 12 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 12; y

- CDR-L3 de la secuencia SEC ID nº 6 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 6.

15 El anticuerpo 224D10, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, de acuerdo con la invención se caracteriza por el hecho de que comprende, de acuerdo con el sistema de numeración "común":

- una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEC ID nº 1, la CDR-H2 de la secuencia SEC ID nº 2 y la CDR-H3 de la secuencia SEC ID nº 3; y

20 - una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEC ID nº 4, la CDR-L2 de la secuencia SEC ID nº 5 y la CDR-L3 de la secuencia SEC ID nº 6.

25 En otra forma de realización, el anticuerpo 224D10, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, de acuerdo con la invención se caracteriza por el hecho de que comprende, de acuerdo con el sistema de numeración IMGT:

- una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEC ID nº 7, la CDR-H2 de la secuencia SEC ID nº 2 y la CDR-H3 de la secuencia SEC ID nº 8; y

30 - una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEC ID nº 4, la CDR-L2 de la secuencia SEC ID nº 5 y la CDR-L3 de la secuencia SEC ID nº 6.

35 En otra forma de realización, el anticuerpo 224D10, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, de acuerdo con la invención se caracteriza por el hecho de que comprende, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat:

- una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEC ID nº 9, la CDR-H2 de la secuencia SEC ID nº 10 y la CDR-H3 de la secuencia SEC ID nº 3; y

40 - una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEC ID nº 11, la CDR-L2 de la secuencia SEC ID nº 12 y la CDR-L3 de la secuencia SEC ID nº 6.

45 De acuerdo con una forma de realización adicional, el anticuerpo 224D10 de la invención, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza por el hecho de que comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 13 o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 13; y/o por el hecho de que comprende una secuencia de dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 14 o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 14.

50 Más particularmente, el anticuerpo de la invención, sus compuestos derivados y sus fragmentos funcionales, comprenden:

- a) un dominio de secuencia variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 13 y/o una secuencia de dominio variable de cadena ligera que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 14; y

60 b) se caracterizan por el hecho de que dicho anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo,

- tiene la capacidad de unirse específicamente a la proteína c-Met y, preferentemente

65 - no bloquea la unión del ligando HGF a la proteína c-Met.

Otra forma de realización divulga el anticuerpo 221C9, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, que comprende:

5 una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes:

- CDR-H1 de la secuencia SEC ID nº 29 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 29;

10 - CDR-H2 de la secuencia SEC ID nº 30 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 30; y

- CDR-H3 de la secuencia SEC ID nº 31 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 31, y

15 una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes:

- CDR-L1 de la secuencia SEC ID nº 32 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 32;

20 - CDR-L2 de la secuencia SEC ID nº 33 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 33; y

25 - CDR-L3 de la secuencia SEC ID nº 34 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 34.

Otra de las formas de realización divulga el anticuerpo 221C9, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, que comprende;

30 una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes:

- CDR-H1 de la secuencia SEC ID nº 35 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 35;

35 - CDR-H2 de la secuencia SEC ID nº 36 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 36; y

- CDR-H3 de la secuencia SEC ID nº 37 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 37, y

40 una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes:

- CDR-L1 de la secuencia SEC ID nº 38 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 38;

45 - CDR-L2 de la secuencia SEC ID nº 39 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 39; y

50 - CDR-L3 de la secuencia SEC ID nº 34 o de una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 34.

Es decir, el anticuerpo aislado 221C9, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, de acuerdo con la invención se caracteriza por el hecho de que comprende, de acuerdo con el sistema de numeración IMGT:

55 - una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEC ID nº 29, la CDR-H2 de la secuencia SEC ID nº 30 y la CDR-H3 de la secuencia SEC ID nº 31; y

- una cadena ligera que comprende a CDR-L1 de la secuencia SEC ID nº 32, la CDR-L2 de la secuencia SEC ID nº 33 y la CDR-L3 de la secuencia SEC ID nº 34.

60 En otra forma de realización, el anticuerpo aislado 221C9, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, de acuerdo con la invención se caracteriza por el hecho de que comprende, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat:

65 - una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEC ID nº 35, la CDR-H2 de la secuencia SEC ID nº 36 y la CDR-H3 de la secuencia SEC ID nº 37; y

- una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEC ID nº 38, la CDR-L2 de la secuencia SEC ID nº 39 y la CDR-L3 de la secuencia SEC ID nº 34.

5 De acuerdo con otra forma de realización adicional, el anticuerpo 221C9 de la invención, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan por el hecho de que comprenden una secuencia de dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 40 o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 40; y/o por que comprenden una secuencia de dominio variable de cadena ligera que comprende la
10 secuencia de aminoácidos SEC ID nº 41 o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 41.

Más particularmente, el anticuerpo de la invención, sus compuestos derivados y sus fragmentos funcionales, comprenden:

- 15
- a) una secuencia de dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 40 y/o una secuencia de dominio variable de cadena ligera con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con la secuencia SEC ID nº 41; y
 - 20 b) se caracterizan por el hecho de que dicho anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo,
 - tiene capacidad para unirse específicamente a la proteína c-Met y, preferentemente
 - 25 - no bloque la unión del ligando HGF a la proteína c-Met.

Es decir, la invención se puede describir asimismo como un anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, que se caracteriza por ser seleccionado de entre el grupo que consiste en:

- 30
- a) un anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, que comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 13 y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 14; y
 - 35 b) un anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, que comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 40 y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 41.

40 Como se expone anteriormente, la invención se refiere asimismo a cualquier compuesto derivado de un anticuerpo como se describe en la invención.

Más particularmente, el anticuerpo de la invención, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan por el hecho de que dicho compuesto derivado consiste en una proteína de unión que comprende un andamiaje peptídico sobre el cual se inserta por lo menos una CDR de tal manera que conserve la totalidad o
45 parte de las propiedades de reconocimiento de parátomos del anticuerpo inicial.

También pueden estar presente una o más secuencias entre las seis secuencias CDR descritas en la presente invención en los diversos andamiajes de proteína inmunoglobulina. En este caso, la secuencia proteica posibilita la recreación de un esqueleto peptídico favorable para el plegamiento de las CDR injertadas, lo que les permite
50 conservar sus propiedades de reconocimiento de antígeno del parátomo.

Por lo general, un experto en la materia sabe determinar el tipo de andamiaje proteico en el cual injertar por lo menos una de las CDR que surgen del anticuerpo original. Más específicamente, es conocido que para seleccionar dichos andamiajes, es necesario que satisfagan el mayor número posible de los siguientes criterios (Skerra A., J. Mol. Recogn., 2000, 13:167-187):

- buena conservación filogenética;
- 60 - estructura tridimensional conocida (como, por ejemplo, por cristalografía, espectroscopía de RMN o cualquier otra técnica conocida por un experto en la materia);
- tamaño pequeño;
- pocas o ninguna modificación postranscripción y/o
- 65 - facilidad de producción, expresión y purificación.

El origen de dichos andamiajes proteicos puede ser, aunque no de manera limitativa, una de las estructuras seleccionadas entre: fibronectina, y preferentemente el dominio 10 de la fibronectina tipo III, lipocalina, anticalina (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4):257-75), proteína Z que se origina en el dominio B de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, tioredoxina A o proteínas con un motivo repetido tal como la "repetición de ankirina" (Kohl *et al.*, PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705), la "repetición de armadillo", la repetición "rica en leucina" y la "repetición de tetratricopéptido".

También se deben mencionar los andamiajes derivados de toxinas tales como, por ejemplo, toxinas de escorpiones, insectos, plantas, moluscos, etc., y los inhibidores proteicos de la sintasa NO neuronal (PIN).

Un ejemplo, no limitativo en absoluto, de dichas construcciones híbridas, es la inserción de la CDR-H1 (cadena pesada) de un anticuerpo anti-CD4, es decir 13B8.2, en uno de los bucles de la PIN, de la nueva proteína de unión así obtenida conservando las mismas propiedades de unión del anticuerpo original (Bes *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 343(1), 334-344). A título únicamente ilustrativo, también se puede mencionar el injerto de la CDR-H3 (cadena pesada) de un anticuerpo VHH antilisoizima en uno de los bucles de neocarzinostatina (Nicaise *et al.*, Protein Science, 2004, 13(7):1882-1891).

Por último, como se describe anteriormente, dichos andamiajes peptídicos pueden comprender de una a seis CDR derivadas del anticuerpo original. Preferentemente, aunque no es indispensable, un experto en la materia selecciona por lo menos una CDR de la cadena pesada, la que se considera principalmente responsable por la especificidad del anticuerpo. La selección de una o más CDR relevantes es evidente para un experto en la materia, que a continuación debe seleccionar las técnicas conocidas adecuadas (Bes *et al.*, FEBS letters 508, 2001, 67-74).

La presente divulgación se refiere asimismo a un anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, que se caracteriza por el hecho de que el andamiaje peptídico es seleccionado entre proteínas que son a) filogenéticamente bien conservadas, b) de arquitectura robusta, c) de organización molecular 3-D muy conocida, d) de pequeño tamaño y/o e) comprenden regiones que se pueden modificar mediante eliminación y/o inserción sin modificar las propiedades de estabilidad.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el anticuerpo de la invención, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza por el hecho de que dicho andamiaje peptídico es seleccionado entre i) andamiajes que surgen de la fibronectina, preferentemente el dominio 10 de la fibronectina tipo 3, lipocalina, anticalina, proteína Z producida por el dominio B de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, tioredoxina A o proteínas con un motivo repetido tal como la "repetición de ankirina" (Kohl *et al.*, PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705), la "repetición de armadillo", la repetición "rica en leucina" y la "repetición de tetratricopéptido" o iii) inhibidores proteicos de la sintasa NO neuronal (PIN).

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

Más particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, que se caracteriza por el hecho de que dicho fragmento funcional es seleccionado entre los fragmentos Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc y diacuerpos, o cualquier fragmento cuya vida media se haya incrementado tales como fragmentos PEGilados.

Dichos fragmentos funcionales del anticuerpo de acuerdo con la invención consisten, por ejemplo, en los fragmentos Fv, scFv (sc=cadena simple), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o cualquier fragmento cuya vida media se haya incrementado mediante modificación química, como por ejemplo la adición de polialquilen glicol tal como polietilenglicol (PEGilación) (se hace referencia a fragmentos PEGilados como Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG y Fab'-PEG), o mediante la incorporación a un liposoma, microesferas o PLGA, donde dichos fragmentos poseen por lo menos una de las CDR características de la invención con la notable capacidad de ejercer una actividad de manera general, o incluso parcial, del anticuerpo del cual se obtiene.

Preferentemente, dichos fragmentos funcionales comprenden o incluyen una secuencia parcial de la cadena variable pesada o ligera del anticuerpo del cual se los obtiene, donde dicha secuencia parcial es suficiente para retener la misma especificidad de unión que el anticuerpo del cual se lo obtiene y suficiente actividad, preferentemente por lo menos igual a 1/100, más preferentemente por lo menos 1/10 de la del anticuerpo del cual se la obtiene.

Dicho fragmento funcional ha de contener por lo menos cinco aminoácidos preferentemente 6, 7, 8, 10, 15, 25, 50 o 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia del anticuerpo del cual se origina.

Preferentemente, estos fragmentos funcionales son de los tipos Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc o diacuerpos, que generalmente tienen la misma especificidad de unión que el anticuerpo del cual se originan. De acuerdo con la presente invención, se pueden obtener fragmentos del anticuerpo de la invención de los

anticuerpos descritos anteriormente por procedimiento tales como digestión con enzimas, incluyendo pepsina o papaína, y/o mediante escisión de los puentes de disulfuro por reducción química. Los fragmentos de anticuerpo también se pueden obtener por técnicas genéticas recombinantes también conocidas por un experto en la materia o por síntesis de péptidos por medio, por ejemplo, de sintetizadores peptídicos tales como los comercializados por Applied BioSystems, etc.

Para mayor claridad, la siguiente tabla 3a resume las diversas secuencias de aminoácidos correspondientes al anticuerpo 224D10 de la invención.

Tabla 3a (donde Mu. = murino)

Anticuerpo	Numeración de las CDR	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
224D10	Común	CDR-H1		1
		CDR-H2		2
		CDR-H3		3
			CDR-L1	4
			CDR-L2	5
			CDR-L3	6
	IMGT	CDR-H1		7
		CDR-H2		2
		CDR-H3		8
			CDR-L1	4
			CDR-L2	5
			CDR-L3	6
		CDR-H1		9
		CDR-H2		10
Kabat	CDR-H3		3	
		CDR-L1	11	
		CDR-L2	12	
		CDR-L3	6	
	Dominio variable Mu.		13	
		Dominio variable Mu.	14	

Para mayor claridad, la siguiente tabla 3b resume las diversas secuencias de aminoácidos correspondientes al anticuerpo 221C9 de la invención.

Tabla 3b (donde Mu. = murino)

Anticuerpo	Numeración de las CDR	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
221C9	IMGT	CDR-H1		29
		CDR-H2		30
		CDR-H3		31
			CDR-L1	32
			CDR-L2	33
			CDR-L3	34
	Kabat	CDR-H1		35
		CDR-H2		36
		CDR-H3		37
			CDR-L1	38
			CDR-L2	39
			CDR-L3	34
		Dominio variable Mu.		40
			Dominio variable Mu.	41

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un hibridoma murino con capacidad de secretar un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención, particularmente el hibridoma de origen murino depositado en la CNCM, Institut Pasteur, París, Francia, el 12 de marzo de 2008, bajo el número I-3949. Dicho hibridoma fue obtenido por la fusión de esplenocitos de ratones inmunizados Balb/C y células de las estirpes de mieloma Sp 2/O-Ag 14.

El anticuerpo monoclonal, al que en la presente memoria se denomina 224D10, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, que se caracteriza por el hecho de que dicho anticuerpo es secretado por el hibridoma depositado en la CNCM el 12 de marzo de 2008, bajo el número I-3949 forma parte, como es evidente, de la presente invención.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un hibridoma murino con capacidad para secretar un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención, particularmente el hibridoma de origen murino depositado en la CNCM, Institut Pasteur, París, Francia, el 14 de enero de 2010, bajo el número I-4273. Dicho hibridoma fue obtenido mediante la fusión de esplenocitos de ratones inmunizados Balb/C y estirpes de células de mieloma Sp 2/O-Ag 14.

El anticuerpo monoclonal, al que en la presente memoria se denomina 221C9, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, que se caracteriza por el hecho de que dicho anticuerpo es secretado por el hibridoma depositado en la CNCM el 14 de enero de 2010, bajo el número I-4273 evidentemente forma parte de la presente invención.

Un nuevo aspecto de la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado que se caracteriza por el hecho de que es seleccionado de entre los siguientes ácidos nucleicos:

- a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención;
- b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº15 a 26 y 42 a 52, o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad tras el alineamiento óptimo con las secuencias SEC ID 15 a 26 y 42 a 52;
- c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que comprende las secuencias SEC ID nº 27, 28, 53 y/o 54 o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después del alineamiento óptimo con las secuencias SEC ID 27, 28, 53 y/o 54;
- d) los correspondientes ácidos nucleicos ARN de los ácidos nucleicos definidos en a), b) o c);
- e) los ácidos nucleicos complementarios de los ácidos nucleicos definidos en a), b) y c) y
- f) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos con capacidad para hibridarse en condiciones de alta rigurosidad con por lo menos una de las CDR de las secuencias SEC ID nº 15 a 28 y 42 a 54 o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después del alineamiento óptimo con las secuencias SEC ID 15 a 28 y 42 a 54, o una secuencia complementaria de las mismas.

La siguiente tabla 4a resume las diversas secuencias de nucleótidos relacionadas con el anticuerpo 224D10 de la invención.

Tabla 4a

Anticuerpo	Numeración de las CDR	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
224D10	Común	CDR-H1		15
		CDR-H2		16
		CDR-H3		17
			CDR-L1	18
			CDR-L2	19
			CDR-L3	20
	IMGT	CDR-H1		21
		CDR-H2		16
		CDR-H3		22
			CDR-L1	18
			CDR-L2	19
			CDR-L3	20
	Kabat	CDR-H1		23
		CDR-H2		24
		CDR-H3		17
			CDR-L1	25
			CDR-L2	26
			CDR-L3	20
			Dominio variable Mu.	27
			Dominio variable Mu.	28

La siguiente tabla 4b resume las diversas secuencias de nucleótidos relativas al anticuerpo 221C9 de la

invención.

Tabla 4b

Anticuerpo	Numeración de las CDR	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
221C9	IMGT	CDR-H1		42
		CDR-H2		43
		CDR-H3		44
			CDR-L1	45
			CDR-L2	46
			CDR-L3	47
	Kabat	CDR-H1		48
		CDR-H2		49
		CDR-H3		50
			CDR-L1	51
			CDR-L2	52
			CDR-L3	47
		Dominio variable Mu.		53
			Dominio variable Mu.	54

5

Los términos “ácido nucleico”, “secuencia nucleica”, “secuencia de ácido nucleico” “polinucleótido”, “oligonucleótido”, “secuencia de polinucleótidos” y “secuencia de nucleótidos”, que se utilizan de manera intercambiable en la presente descripción, se refieren a una secuencia de nucleótidos precisa, modificada o no, que define un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene nucleótidos naturales o no, que es un ADN bicatenario, un ADN de cadena simple o productos de la transcripción de dichos ADN.

10

Se debe hacer constar asimismo que la presente invención no se refiere a las secuencias de nucleótidos en su ambiente cromosómico natural, es decir en estado natural. Las secuencias de la presente invención han sido aisladas y/o purificadas, es decir, que han sido muestreadas directa o indirectamente, por ejemplo mediante una copia, donde su ambiente ha sido por lo menos parcialmente modificado. También se deben mencionar en la presente memoria los ácidos nucleicos aislados obtenidos por genética recombinante, por ejemplo por medio de células hospedadoras u obtenidos por síntesis química.

15

“Secuencias nucleicas que exhiben un porcentaje de identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98%, después del alineamiento óptimo con una secuencia preferida” se refiere a secuencias nucleicas que exhiben, con respecto a la secuencia nucleica de referencia, ciertas modificaciones tales como, específicamente, una eliminación, un truncamiento, una prolongación, una fusión y/o sustitución química, notablemente puntual. Preferentemente, estas son secuencias que codifican las mismas secuencias de aminoácidos la secuencia de referencia, lo que se relaciona con la degeneración del código genético, o secuencias de complementariedad con probabilidad de hibridarse específicamente a las secuencias de referencia, preferentemente en condiciones altamente rigurosas, principalmente las definidas a continuación.

20

25

Hibridación en condiciones de alta rigurosidad se refiere a que las condiciones relacionadas con la temperatura y la potencia iónica son seleccionadas de tal manera que permitan que se mantenga la hibridación entre dos fragmentos de ADN complementarios. A título únicamente ilustrativo, las condiciones de alta rigurosidad de la etapa de hibridación para definir los fragmentos de polinucleótidos descrita anteriormente son las siguientes.

30

La hibridación ADN-ADN o ADN-ARN se lleva a cabo en dos etapas: (1) prehibridación a 42°C por espacio de tres horas en amortiguador de fosfato (20 mM, pH 7,5) con contenido de 5X SSC (1X SSC corresponde a una solución de NaCl 0,15 M + citrato de sodio 0,015 M), formamida al 50%, dodecil sulfato de sodio al 7% (SDS), 10X solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 5% y 1% de ADN de esperma de salmón; (2) hibridación primaria por espacio de 20 horas a una temperatura que depende de la longitud de la sonda (es decir, 42°C en el caso de una sonda >100 nucleótidos de longitud) seguida por dos lavados de 20 minutos a 20°C en 2X SSC + 2% de SDS, un lavado de 20 minutos a 20°C en 0.1X SSC + 0,1% de SDS. El último lavado de lleva a cabo en 0.1X SSC + 0.1% de SDS por espacio de 30 minutos a 60°C en el caso de una sonda >100 nucleótidos de longitud. Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad descritas anteriormente para un polinucleótido de un tamaño definido pueden ser adaptadas por un experto en la materia a oligonucleótidos de mayor o menor longitud, de acuerdo con los procedimientos descritos por Sambrook, *et al.* (Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory; 3a edición, 2001).

35

40

45

Además, se proporciona en la presente memoria un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con lo descrito en la presente memoria.

50

La divulgación se refiere específicamente a vectores de clonación y/o expresión que contienen dicha secuencia de nucleótidos.

- 5 Dichos vectores contienen preferentemente elementos que dan lugar a la expresión y/o secreción de las secuencias de nucleótidos en una célula hospedadora dada. El vector debe contener, por consiguiente, un promotor, señales de iniciación y terminación de la traducción, así como regiones de regulación de la transcripción adecuadas. Se debe poder mantener de manera estable en la célula hospedadora y puede tener, opcionalmente, señales específicas que especifican la secreción de la proteína traducida. Estos diversos elementos son seleccionados y optimizados por un experto en la materia de acuerdo con la célula hospedadora utilizada. Para este fin, se pueden insertar las secuencias de nucleótidos en vectores de autorreplicación dentro del hospedador elegido o pueden ser vectores integrativos del hospedador seleccionado.
- 10 Dichos vectores se preparan por procedimientos utilizados generalmente por un experto en la materia y se pueden introducir los clones así obtenidos en un hospedador adecuado por procedimientos estándares tales como lipofección, electroporación, choque término o procedimientos químicos.
- 15 Los vectores son, por ejemplo, vectores de origen plasmídico o viral. Son utilizados para transformar células hospedadoras para clonar o expresar las secuencias de nucleótidos de la invención.
- Se proporcionan asimismo en la presente memoria unas células hospedadoras transformadas o que comprenden un vector como se describe en la presente memoria.
- 20 La célula hospedadora puede ser seleccionada de entre sistemas procariotas o eucariotas tales como células bacterianas, por ejemplo, aunque también células de levadura o células animales, especialmente células de mamífero o también se pueden utilizar células vegetales.
- 25 La divulgación se refiere asimismo a animales, además del hombre, que contienen una célula transformada como se describe en la presente memoria.
- Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la producción de un anticuerpo de acuerdo con la invención, o uno de sus fragmentos funcionales, que se caracteriza por el hecho de que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:
- 30
- a) el cultivo en un medio de cultivo y las condiciones de cultivo adecuadas para una célula hospedadora de acuerdo con la invención; y
 - 35 b) la recuperación de dicho anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, así producidos del medio de cultivo o de dichas células cultivadas.
- Dichas células transformadas son de utilización los procedimientos de preparación de los polipéptidos recombinantes de acuerdo con la invención. Los procedimientos para la preparación del polipéptido de acuerdo con la invención en forma recombinante, que se caracterizan por el hecho de que dichos procedimientos utilizan un vector y/o una célula transformada por un vector de acuerdo con la invención, también están comprendidos en la presente invención. Preferentemente, se cultiva una célula transformada por un vector de acuerdo con la invención en condiciones que permiten la expresión del mencionado polipéptido y la recuperación de dicho péptido recombinante.
- 40
- 45 Como se ha expuesto anteriormente, la célula hospedadora puede ser seleccionada de entre sistemas procariotas y eucariotas. En particular, es posible identificar las secuencias de nucleótidos de la invención que facilitan la secreción en dicho sistema procariota o eucariota. Por lo tanto, se puede utilizar ventajosamente un vector de acuerdo con la invención que presenta dicha secuencia para la producción de proteínas recombinantes que se deben secretar. En efecto, la purificación de estas proteínas recombinantes de interés es facilitada por el hecho de que están presentes en el sobrenadante del cultivo celular en lugar de estar en el interior de las células hospedadoras.
- 50 Los presentes polipéptidos también se pueden preparar mediante síntesis química. Uno de dichos procedimientos de preparación también es un objetivo de la presente invención. Un experto en la materia conoce los procedimientos de síntesis química, como por ejemplo las técnicas en fase sólida (ver, especialmente, Steward *et al.*, 1984, Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2^a ed.) o técnicas en fase sólida parcial, mediante la condensación de fragmentos o mediante síntesis convencional en solución.
- 55 Los polipéptidos obtenidos por síntesis química que son aptos para contener los correspondientes aminoácidos no naturales también están comprendidos en la presente invención. Los anticuerpos, o los compuestos derivados o fragmentos funcionales de los mismos, que se pueden obtener probablemente por el procedimiento de la invención también están comprendidos en la presente invención.
- 60 También se divulga la utilización del anticuerpo de la invención como biomarcador. Los procedimientos se pueden utilizar para detectar o diagnosticar diversos trastornos oncógenos hiperproliferativos asociados con la
- 65

expresión de cMet a título de ejemplo no limitativo los siguientes: cáncer de próstata, osteosarcomas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de endometrio, glioblastoma, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer renal o cualquier otro cáncer asociado a la expresión de cMet. Como apreciará un experto en la materia, el nivel de expresión del anticuerpo asociado a un trastorno específico varía dependiendo de la naturaleza y/o la gravedad de la afección preexistente.

La administración de los presentes anticuerpos en cualquiera de las maneras convencionales conocidas por un experto en la materia (por ejemplo, tópica, parenteral, intramuscular, etc.), ofrece un procedimiento de suma utilidad para detectar células displásicas en una muestra, además de permitir al médico monitorizar el régimen terapéutico de un paciente sometido a tratamiento por un trastorno hiperproliferativo asociado o mediado por la expresión de cMet.

En otra forma de realización, la divulgación se refiere a una composición farmacéutica para la captación de imágenes *in vivo* de un trastorno oncógeno asociado a la expresión de cMet y que comprende dicho anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que está marcado y que se une a cMet *in vivo*, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El anticuerpo de la invención, o un fragmento funcional o derivado del mismo, es de utilidad para diversos fines médicos y de investigación, incluyendo la detección, diagnóstico y determinación de etapa de diversas patologías asociadas a la expresión de cMet.

La determinación de etapas tiene valor pronóstico potencial y ofrece criterios para diseñar una terapia óptima. Simpson et al., J. Clin. Oncology 18:2059 (2000). En general, la determinación patológica de etapas, por ejemplo del cáncer, es preferible a la determinación clínica puesto que aquella aporta un pronóstico más preciso. Sin embargo, podría ser preferible la determinación clínica de la etapa si hubiera una determinación patológica tan precisa, ya que no depende de un procedimiento invasivo para obtener tejido para la evaluación patológica.

Cuando se utiliza con marcadores adecuados u otras biomoléculas o sustancias químicas detectables apropiadas, el anticuerpo de la invención es de particular utilidad para aplicaciones de diagnóstico y pronóstico *in vitro* e *in vivo*.

Los marcadores para la utilización en inmunoensayos son conocidos generalmente por un experto en la materia e incluyen enzimas, radioisótopos y sustancias fluorescentes, luminescentes y sustancias cromógenas, incluyendo partículas coloreadas tales como oro coloidal o perlas de látex. Los inmunoensayos adecuados incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). Existen diversos tipos de marcadores y procedimientos para conjugar los marcadores a los anticuerpos de la invención muy conocidos por un experto en la materia, tales como los expuestos a continuación.

Como se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "un trastorno oncógeno asociado a la expresión de cMet" incluya enfermedades y otros trastornos en los cuales se ha demostrado o se sospecha que la presencia de altos niveles o niveles anormalmente bajos (aberrantes) de cMet en un sujeto que padece un trastorno es responsable de la fisiopatología del trastorno o es un factor que contribuye al empeoramiento del trastorno. Por otro lado, dichos trastornos se pueden evidenciar, por ejemplo, por un aumento de los niveles de cMet en la superficie celular o en la autofosforilación de tirosina incrementada en cMet en las células o tejidos afectados de un sujeto que padece el trastorno. El aumento de los niveles de cMet puede ser detectado, por ejemplo, usando el anticuerpo 224D10 de la invención. Además, se refiere a las células que exhiben un desarrollo relativamente autónomo, por lo que exhiben un fenotipo de crecimiento aberrante que se caracteriza por una pérdida significativa de control de la proliferación celular. Por otro lado, las células pueden expresar niveles normales de cMet pero estar marcados por una proliferación anormal.

En ciertas formas de realización, "expresión incrementada" en lo que respecta a cMet, se refiere a los niveles de proteína o expresión génica que demuestran un aumento estadísticamente significativo de la expresión (medida por expresión de ARN o expresión de proteínas) con respecto a un control.

Más particularmente, se considera que la utilización de un anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, de acuerdo con la invención descrita, para diagnosticar *in vitro* un trastorno oncógeno asociado con la expresión de cMET o para determinar *in vitro* el pronóstico para desarrollar un trastorno oncógeno asociado a la expresión de cMet, por ejemplo un cáncer asociado a la expresión de cMet.

Otro amplio aspecto de acuerdo con la presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar un trastorno oncógeno hiperproliferativo o una susceptibilidad a un estado patológico asociado a la expresión de cMet en un sujeto que comprende determinar la presencia o ausencia de células que presentan cMet en una muestra y diagnosticar un estado patológico o la susceptibilidad a un estado patológico basándose en la presencia o ausencia de dichas células portadoras de cMet. Las utilidades diagnósticas del anticuerpo de la invención comprenden tumores primarios, metástasis cancerosas. El anticuerpo puede estar presente en forma de inmunoconjugado o de un anticuerpo marcado para obtener una señal detectable y/o cuantificable.

Más particularmente, un objeto preferido de acuerdo con la presente invención es un procedimiento para la detección *in vitro* de la presencia y/o ubicación de un tumor con expresión de cMet en un sujeto, donde dicho procedimiento comprende las etapas siguientes (a) poner en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, de acuerdo con la invención y (b) detectar la unión de dicho anticuerpo a la muestra. Otro aspecto de la presente invención es el seguimiento de la expresión de c-Met en respuesta a una terapia dirigida a c-Met durante los ensayos clínicos y, más específicamente cuando la regulación a menos y o la degradación del receptor c-Met es uno de los componentes del mecanismo de acción del compuesto analizado.

Como resulta evidente para un experto en la materia, la detección de la unión del anticuerpo de la invención puede ser revelada por diversos ensayos. Si bien cualesquier medios para poner en práctica los ensayos es compatible con la invención, se pueden mencionar como ejemplos, FACS, ELISA o IHC.

En el contexto de la presente memoria, el término "muestra" indica cualquier líquido biológico, célula, tejido, órgano o porción del mismo que incluye o incluye potencialmente una célula neoplásica tal como una célula, como por ejemplo una célula de colon, estómago, recto, mama, ovario, próstata, riñón, pulmón, sangre, cerebro u otro órgano o tejido que contenga o se sospecha que contiene una célula neoplásica. El término incluye muestras presentes en un individuo, así como muestras obtenidas o derivadas del individuo. Por ejemplo, una muestra puede ser una sección histológica de un espécimen obtenido por biopsia, o células que se colocan o se adaptan a un cultivo celular. Una muestra puede ser asimismo una fracción subcelular o extracto, o una molécula de ácido nucleico en bruto o sustancialmente pura o una preparación proteica.

Se pretende que la expresión muestra clínica comprenda una variedad de tipos de muestras obtenidas de un sujeto y útiles en el procedimiento de la invención, como por ejemplo, una prueba de diagnóstico o monitorización para determinar o detectar los niveles de expresión de cMet. La definición comprende muestras de tejidos sólidos obtenidas mediante extirpación quirúrgica, un espécimen de patología, una muestra archivada o un espécimen para biopsia, cultivos tisulares o células derivadas de los mismos y la progenie de las mismas y secciones o frotis preparados de cualquiera de estas fuentes. Los ejemplos no limitativos son muestras obtenidas de tejido mamario, ganglios linfáticos, colon, páncreas, próstata, etc. La definición comprende además muestras líquidas de origen biológico y se puede referir a las células o fragmentos celulares suspendidos en las mismas o al medio líquido y sus solutos.

Otro aspecto de acuerdo con la presente invención se relaciona con un procedimiento para determinar *in vitro* el nivel de expresión de cMet en un tumor con expresión de cMet de un sujeto, donde dicho procedimiento comprende las etapas siguientes (a') poner en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, de acuerdo con la invención y (b') cuantificar el nivel de unión del anticuerpo a cMet en dicha muestra.

Como resulta evidente para el experto en la materia, el nivel de unión del anticuerpo a cMet se puede cuantificar de una variedad de maneras, como por ejemplo mediante diversos ensayos. Si bien cualesquier medios para poner en práctica los ensayos son compatibles con la invención, un procedimiento preferido conlleva procedimientos inmunoenzimáticos de acuerdo con la técnica de ELISA, por inmunofluorescencia, por inmunohistoquímica o una técnica de radio-inmunoensayo (RIA) o equivalente.

Preferentemente, la muestra biológica está constituida por un líquido biológico tal como suero, sangre entera, células, una muestra de tejidos o biopsia de origen humano. La muestra puede incluir, por ejemplo, tejido obtenido por biopsia, que puede ser convenientemente analizado para determinar la presencia de un trastorno oncógeno hiperproliferativo asociado a la expresión de cMet.

Una vez realizada una determinación de la cantidad de cMet presente en la muestra de ensayo, se pueden comparar los resultados con los de las muestras de control, que se obtienen de manera similar a las muestras de ensayo pero de individuos que no tienen o presentan un trastorno oncógeno hiperproliferativo asociado a la expresión de cMet. Si el nivel del cMet es significativamente elevado en la muestra de ensayo, se puede concluir que existe una probabilidad incrementada de que el sujeto del cual se la obtuviera tenga o en el futuro desarrolle dicho trastorno.

La invención se refiere, más particularmente, a un procedimiento para diagnosticar *in vitro* un tumor con expresión de cMet o para determinar *in vitro* el pronóstico de la posibilidad de desarrollar un tumor con expresión de cMet en un sujeto, donde dicho procedimiento comprende las etapas siguientes (i) determinar el nivel de expresión de cMet de acuerdo con lo descrito anteriormente y (ii) comparar el nivel de expresión de la etapa (i) con un nivel de expresión de cMet de referencia de un tejido normal o de un tejido sin expresión de cMet.

"Diagnosticar" una enfermedad ha de incluir, en el contexto de la presente memoria, por ejemplo el diagnóstico o la detección de la presencia de un trastorno oncógeno hiperproliferativo patológico asociado a la expresión de cMet o mediado por la misma, monitorizar el progreso de la enfermedad e identificar o detectar células o

muestras que sean indicativas de un trastorno asociado a la expresión de cMet.

“Pronóstico” se refiere, en el contexto la presente memoria, a la probabilidad de recuperación de una enfermedad o a la predicción del probable desarrollo o desenlace de una enfermedad. Por ejemplo, si una muestra de un sujeto es positiva para la tinción con el anticuerpo de la invención, entonces el “pronóstico” correspondiente a ese sujeto es mejor que si la muestra fuera negativa para la tinción de cMet. Se puede puntuar a las muestras con respecto a los niveles de expresión de cMet en una escala apropiada, como se expone con mayor detalle a continuación.

Sin embargo, otro aspecto de la invención se refiere asimismo a la monitorización de la expresión de c-Met de compuestos terapéuticos que inducen una degradación de c-Met como uno de sus mecanismos de acción. En ese caso, el seguimiento de la expresión de c-Met en la membrana celular podría ser una herramienta crucial para evaluar la eficacia del tratamiento durante las pruebas clínicas y las terapias “personalizadas”.

El nivel de expresión de cMet se compara o se mide ventajosamente en relación con los niveles de una célula o muestra de control, a los que se hace referencia como “nivel de referencia” o “nivel de expresión de referencia”. “nivel de referencia” o “nivel de expresión de referencia”. “Nivel de referencia” o “nivel de expresión de referencia”, nivel control y “control” se utilizan en forma intercambiable en la presente memoria. En términos generales, un “nivel de dcontrol” se refiere a un nivel de referencia separado medido en una célula control comparable, que está generalmente libre de enfermedad o de cáncer. Puede ser del mismo individuo o de otro individuo que es normal o que no presenta la misma enfermedad de la cual se obtiene la muestra enferma o de ensayo. En el contexto de la presente invención, el término “nivel de referencia” se refiere a un “nivel de control” de expresión de cMet usado para evaluar un nivel de ensayo de expresión de cMet en una muestra de un paciente que contiene células cancerosas. Por ejemplo, cuando el nivel de cMet en la muestra biológica de un paciente es superior al nivel de referencia de cMet, se considera que las células tienen un alto nivel de expresión, o sobreexpresión, de cMet. El nivel de referencia se puede determinar mediante una pluralidad de procedimientos. Los niveles de expresión pueden definir entonces las células que presentan cMet o, por otro lado, el nivel de expresión de expresión de cMet independiente del número de células con expresión de cMet. Por lo tanto, el nivel de referencia correspondiente a cada paciente se puede calcular mediante una relación de cMet de referencia, donde la relación de referencia se puede determinar por cualquiera de los procedimientos para determinar el nivel de referencias descrito en la presente memoria.

Por ejemplo, el control puede ser un valor predeterminado, que puede asumir una variedad de formas. Puede ser un valor de corte único tal como una mediana o media. El “nivel de referencia” puede ser un solo número, igualmente aplicable a cada paciente en forma individual, o el nivel de referencia puede variar de acuerdo con subpoblaciones específicas de pacientes. Así, por ejemplo, los hombres de mayor edad pueden tener un nivel de referencia diferente de los hombres de menos edad para el mismo cáncer y las mujeres pueden tener un nivel de referencia diferente al de los hombres con respecto al mismo cáncer. Por otro lado, se puede determinar el “nivel de referencia” midiendo el nivel de expresión de cMet en células cancerosas no oncógenas del mismo tejido que el tejido de las células neoplásicas que se debe analizar. Además, el “nivel de referencia” podría ser una determinada relación de cMet en las células neoplásicas de un paciente con respecto a los niveles de cMet en las células no tumorales dentro del mismo paciente. El “nivel de referencia” también puede ser un nivel de cMet de células cultivadas *in vitro*, que puede ser manipulado para simular células cancerosas, o se puede manipular de cualquier otra manera que dé origen a niveles de expresión que determinan con precisión el nivel de referencia. Por otro lado, el “nivel de referencia” se puede establecer sobre la base de grupos comparativos, como por ejemplo en grupos que no tienen niveles elevados de cMet y grupos que tienen niveles de cMet elevados. Otro ejemplo de grupos comparativos sería el de grupos que presentan una enfermedad, afección o síntomas específicos y grupos sin la enfermedad.

El valor predeterminado se puede disponer, por ejemplo, donde una población analizada se divide en grupos iguales (o desiguales), como por ejemplo un grupo de bajo riesgo, un grupo de medio riesgo y un grupo de alto riesgo o en cuadrantes o quintiles, donde el cuadrante o quintil más bajo es el de los individuos con el mayor riesgo o la menor cantidad de cMet.

También se puede determinar el nivel de referencia comparando el nivel de cMet en poblaciones de pacientes que tienen el mismo cáncer. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante análisis histográfico, en el cual se representa gráficamente toda una multitud de pacientes, donde un primer eje representa el nivel de cMet y un segundo eje representa el número de pacientes en el grupo cuyas células tumorales expresan cMet en un nivel dado. Se pueden determinar dos o más grupos separados de pacientes mediante la identificación de subseries de poblaciones de la multitud que tienen el mismo nivel de cMet o niveles similares. La determinación del nivel de referencia se puede realizar sobre la base de un nivel que mejor distingue estos grupos separados. Un nivel de referencia también puede representar los niveles de dos o más marcadores, uno de los cuales es cMet. Dos o más marcadores pueden estar representados, por ejemplo, por una relación de valores correspondiente a los niveles de cada marcador.

Del mismo modo, una población aparentemente sana presenta un intervalo “normal” diferente del de una

población que presenta una afección asociada a la expresión de cMet conocida. En consecuencia, el valor predeterminado seleccionado puede considerar la categoría en la cual se encuentra el individuo. Los intervalos y las categorías apropiados pueden ser seleccionados sin más experimentación de rutina por un experto en la materia. La expresión "elevado" o "incrementado" se refiere a alto con respecto a un control seleccionado. Por lo general, el control se basa en individuos aparentemente normales dentro de un intervalo de edad apropiado.

También se debe tener en cuenta que los controles de acuerdo con la invención pueden ser, además de valores predeterminados, muestras de materiales analizados de manera paralela con los materiales experimentados. Los ejemplos incluyen tejido o células obtenidas al mismo tiempo del mismo sujeto, por ejemplo partes de una única biopsia o partes de una única muestra de células del sujeto.

En el diagnóstico o la monitorización clínicos de pacientes con enfermedades mediadas por cMet, la detección de células con expresión de cMet o un aumento de los niveles de cMet, en comparación con los niveles en una muestra biológica correspondiente de un sujeto normal o de tejido no canceroso por lo general es indicativo de un paciente que presenta o se sospecha que presenta un trastorno mediado por cMet.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, la invención da a conocer un procedimiento para predecir la susceptibilidad al cáncer que comprende detectar el nivel de expresión de cMet en una muestra de tejido, donde su presencia indica la susceptibilidad al cáncer, donde el grado de expresión de cMet correlaciona con el grado de susceptibilidad. Por lo tanto, en formas de realización específicas, se examina la expresión de cMet, por ejemplo en tejidos prostáticos, tejido de osteosarcoma, tejido pulmonar, tejido pancreático, tejido de colon, tejido mamario, tejido de glioblastoma, tejidos ováricos o cualquier otro tejido que se sospeche que puede presentar células con expresión de cMet, donde la presencia de cMet en la muestra ofrece una indicación de susceptibilidad al cáncer o la emergencia o existencia de un tumor de tejidos específicos.

También se presenta un procedimiento para evaluar la agresividad de los tumores. En una forma de realización, un procedimiento para observar el progreso de una malignidad en un individuo en el tiempo comprende determinar el nivel de cMet expresado por las células en una muestra del tumor, comparar el nivel así determinado con el nivel de cMet expresado en una muestra de tejidos equivalente tomada del mismo individuo en un momento diferente, donde el grado de expresión de cMet en la muestra tumoral con el tiempo proporciona información del progreso del cáncer.

En otra de las formas de realización, la solicitud presenta procedimientos para determinar el protocolo terapéutico apropiado para un sujeto. Específicamente, los anticuerpos de la presente invención son de gran utilidad para monitorizar el curso de la mejora de una enfermedad maligna en un individuo, especialmente en circunstancias en que el sujeto está recibiendo tratamiento con un anticuerpo para cMet que no compite con los anticuerpos de la presente invención por la unión a cMet. La presencia o ausencia o un cambio de nivel de cMet de acuerdo con la presente invención puede ser indicativa de que es probable que el sujeto sufra una recaída o de un cáncer progresivo o persistente asociado a cMet. Por consiguiente, midiendo el aumento del número de células que expresan cMet o los cambios de concentración de cMet presente en diversos tejidos o células, es posible determinar si un régimen terapéutico específico destinado a mejorar una malignidad asociada a cMet es eficaz.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento *in vivo* para obtener imágenes de un trastorno oncógeno asociado a la expresión de cMet. Por ejemplo, dicho procedimiento se puede utilizar en un paciente que presenta síntomas de un trastorno oncógeno. Si el paciente tiene, por ejemplo, niveles de expresión de cMet incrementados, entonces es probable que el paciente sufra un trastorno canceroso. Además, el procedimiento puede ser de utilidad para monitorizar el progreso y/o la respuesta al tratamiento en pacientes a quienes ya se había diagnosticado un cáncer mediado por cMet. De acuerdo con el objetivo expuesto, la invención presenta un reactivo para imágenes *in vivo* que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención, o un fragmento funcional o derivado del mismo, preferentemente marcado, especialmente radiomarcado, y su uso en la obtención de imágenes médicas. Por consiguiente, un procedimiento general de acuerdo con la presente invención funciona administrando a un paciente una cantidad efectiva para la obtención de imágenes de un reactivo de obtención de imágenes tal como el anticuerpo monoclonal descrito anteriormente que ha sido marcado y un vehículo farmacéuticamente efectivo y a continuación detectando el agente una vez unido al cMet presente en la muestra. En ciertas formas de realización, el procedimiento consiste en administrar una cantidad efectiva para la captación de imágenes de un agente de captación de imágenes que comprende una porción de direccionamiento y una porción activa. El agente de captación de imágenes es administrado en una cantidad efectiva para una utilización de diagnóstico en un mamífero tal como un humano y a continuación se detecta la localización y acumulación del agente de captación de imágenes. La localización y acumulación del agente de captación de imágenes se puede detectar mediante captación de imágenes por radionúclidos, radiocentellografía, imágenes de resonancia magnética nuclear, tomografía computada, tomografía de emisión de positrones, tomografía axial computada, procedimiento de imágenes de rayos X o resonancia magnética, detección de fluorescencia y detección quimioluminiscente.

En lo que respecta al desarrollo de la terapia antitumoral dirigida, el diagnóstico con técnicas inmunohistológicas

proporciona, *in situ*, información sobre el nivel de expresión del receptor y, por lo tanto permite seleccionar pacientes susceptibles de ser tratados siguiendo el nivel de expresión de receptores necesarios para dicho tratamiento.

5 Para la inmunoterapia que utiliza anticuerpos monoclonales, la respuesta al tratamiento dependiendo del nivel de expresión dirigida al receptor como el tratamiento con trastuzumab en que la determinación de la sobreexpresión de Her2 en el carcinoma mamario es ahora de gran importancia clínica con la llegada del anticuerpo monoclonal anti-Her2 humanizado trastuzumab. La demostración de la sobreexpresión de Her2 es un prerrequisito para el tratamiento con trastuzumab, ya que actúa dirigiéndose a las células de carcinoma con sobreexpresión de Her2.
10 Las pruebas precisas de Her2 apuntan a garantizar que no se administre el tratamiento con trastuzumab, costoso y potencialmente tóxico, a pacientes con tumores sin sobreexpresión y que cada paciente que se pueda beneficiar con el trastuzumab reciba tratamiento apropiado.

15 La enseñanza con trastuzumab con respecto a la selección de pacientes con sobreexpresión de Her2 presenta el beneficio de determinar el nivel de expresión del receptor cuando se utiliza una terapia con un anticuerpo monoclonal y de desarrollar, al mismo tiempo que un anticuerpo monoclonal terapéutico, un anticuerpo monoclonal que se puede utilizar para la selección del paciente.

20 En consecuencia, la invención se refiere a un procedimiento para determinar el estado de cMet *in vitro* de un tumor de un sujeto, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes (1) determinar el nivel de expresión de cMet de acuerdo con lo descrito anteriormente, (2) puntuar dicho tumor con respecto al nivel de expresión de cMet y (3) comparar dicha puntuación con la obtenida de una muestra de control.

25 La expresión "estado de cMet", en el contexto de la presente invención, se relaciona con la clasificación de un tumor respecto de una clase cMet positivo [cMet(+)] o cMet negativo [cMet(-)] basándose en la determinación del nivel de expresión del gen cMet medida por cualquiera de procedimientos tales como inmunohistoquímica (IHC), hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH), hibridación colorimétrica *in situ* (CISH), chip génico u otros procedimientos conocidos por un experto en la materia.

30 En una forma de realización preferida, el anticuerpo para diagnóstico debe poder unirse al receptor considerado diana cuando las muestras de tejidos están fijadas con formalina e incluidas en parafina.

Más particularmente, el nivel de expresión de cMet se mide por inmunohistoquímica (IHC).

35 Por ejemplo, se pueden puntuar las muestras con respecto a los niveles de expresión de cMet en una escala de 0-3⁺ correspondiente a los niveles de tinción del anticuerpo, donde 0 es negativo y 1⁺-3⁺ representan la tinción positiva en cuatro etapas semicuantitativas de intensidad creciente. Se pueden registrar las puntuaciones de 1⁺-3⁺ como positivos, puesto que cada puntuación positiva puede estar asociado a un riesgo significativamente reducido de recaídas y enfermedad letal en comparación con una puntuación de 0 (negativa), pero la intensidad creciente entre las puntuaciones positivas puede aportar una mayor reducción del riesgo. Se puede utilizar cualquier procedimiento de análisis de riesgo convencional para estimar el valor pronóstico de cMet. Los procedimientos de análisis representativos incluyen el análisis de regresión de Cox, que es un procedimiento semiparamétrico para modelar datos de supervivencia o tiempo transcurrido hasta un evento en presencia de casos censados (Hosmer y Lemeshow, 1999; Cox, 1972). A diferencia de otros análisis de supervivencia, por ejemplo las tablas de Vida o Kaplan-Meyer, Cox permite la inclusión de variables de predicción (covariables) en los modelos. Utilizando un procedimiento de análisis convencional, por ejemplo Cox, se pueden analizar hipótesis con respecto a la correlación del estado de expresión de cMet de un tumor primario al momento del inicio de la recaída de la enfermedad (tiempo de supervivencia sin enfermedad, o tiempo hasta la enfermedad metastásica), o tiempo hasta la muerte por la enfermedad (tiempo de supervivencia total). El análisis de regresión de Cox también se conoce como análisis de riesgo proporcional. Este procedimiento es estándar para analizar el valor de pronóstico de un marcador tumoral con respecto al tiempo de supervivencia de un paciente. Cuando se utiliza en el modo multivariable, se analiza el efecto de varias covariables en forma paralela de manera que se puedan identificar las covariables individuales que tienen valor de pronóstico independiente, es decir, los marcadores más útiles. El término "estado de cMet" positivo o negativo [al que también se hace referencia como cMet(+) o cMet (-)] de tumores se refiere a puntuaciones de 0 a puntuaciones de 1⁺-3⁺, respectivamente.
50
55

Una muestra puede ser "puntuada" durante el diagnóstico o la monitorización del cáncer, como por ejemplo el cáncer de mama. En su forma más sencilla, la puntuación puede ser categóricamente negativa o positiva a juzgar por el examen visual de las muestras por inmunohistoquímica. La puntuación más cuantitativa conlleva juzgar la intensidad de tinción de los dos parámetros y la proporción de células teñidas ("positivas") que se muestrean. Basándose en estos dos parámetros se pueden asignar números que reflejan niveles crecientes de tinción positiva. Allred et al. (Allred, Harvey et al. 1998) han descrito una manera de obtener esto, que implicaba la puntuación de ambos parámetros en una escala de 0 (negativo) a 3⁺ y resumiendo las puntuaciones de los parámetros individuales en una puntuación general. Esto da lugar a una escala con posibles puntuaciones de 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. (Debe apreciarse que una puntuación de 1 no es posible en la escala de Allred). Un
60
65

procedimiento de puntuación algo más sencillo integra la intensidad de la tinción nuclear y la proporción de células que exhiben núcleos coloreados en una escala combinada de 0 a 3⁺. Se puede aplicar cualquiera de estos procedimientos de puntuación para puntuar la intensidad y proporción de tinción de Stat5 activado en los núcleos de las células. Los términos “estado de cMet” positivo o negativo de los tumores, utilizados en la presente memoria, se refieren a niveles de expresión de cMet que corresponden a las puntuaciones de 0 o 1⁺-3⁺ en la escala simplificada, respectivamente.

En general, los resultados de una prueba o ensayo de acuerdo con la invención se pueden presentar en cualquiera de entre una variedad de formatos. Los resultados se pueden presentar de manera cualitativa. Por ejemplo, el resultado de la prueba puede indicar sólo si se ha detectado un determinado polipéptido, tal vez también con una indicación de los límites de detección. Los resultados se pueden presentar de forma semicuantitativa. Por ejemplo, se pueden definir diversos intervalos, y se puede asignar una puntuación a los intervalos, (por ejemplo, 1⁺ a 3⁺) que proporciona un cierto grado de información cuantitativa. Ese tipo de puntuación puede reflejar diversos factores, por ejemplo, el número de células en las cuales se detecta cMet, la intensidad de la señal (que puede indicar el nivel de expresión de cMet o las células portadoras de cMet), etc. Los resultados se pueden presentar en forma cuantitativa, por ejemplo, en términos de porcentaje de células en las cuales se detecta el polipéptido (cMet), como concentración de la proteína, etc. Como apreciará un experto en la materia, el tipo de salida proporcionada por un análisis varía dependiendo de las limitaciones técnicas del análisis y de la significación biológica asociada a la detección del polipéptido. Por ejemplo, en el caso de ciertos polipéptidos, la detección de una salida puramente cualitativa (por ejemplo, si se detecta o no el polipéptido en un determinado nivel de detección) aporta información significativa. En otros casos es necesaria una salida más cuantitativa (por ejemplo, una relación del nivel de expresión del polipéptido en la muestra que se está analizando contra el nivel normal).

En una forma de realización más preferida, se gradúa la puntuación del nivel de expresión de cMet de 0 a 3⁺, basándose en la evaluación de la intensidad del producto de la reacción y el porcentaje de células positivas. Para mayor claridad, la tabla 5 expuesta a continuación resume estos parámetros. Sólo se considera la reactividad de la membrana circunferencial completa del tumor invasivo y con frecuencia se asemeja a un aspecto de “alambre de gallinero”. En líneas generales, las muestras puntuadas como límite (puntuación de 2⁺ o más) correspondientes a IHC de cMet se deben considerar cMet(+) y se requiere someterlas a una evaluación adicional. El análisis de IHC debe ser desechado y repetido o confirmado por FISH o cualquier otro procedimiento si, a título de ejemplo no limitativo, los controles no son los esperados, existen distorsiones que comprenden la mayor parte de la muestra y la muestra tiene una fuerte positividad membranosa de los conductos mamarios normales (controles internos), lo que sugiere una recuperación excesiva del antígeno.

Tabla 5

Estado de c-Met	Descripción IHC
0	Sin reactividad o reactividad membranosa en menos de 10% de las células tumorales
1 ⁺	Se detecta reactividad membranosa débil/escasamente perceptible en más de 10% de las células tumorales. Las células sólo son inmunorreactivas en parte de la membrana.
2 ⁺	Se observa reactividad membranosa débil a moderada en más de 10% de las células tumorales.
3 ⁺	Se observa reactividad membranosa fuerte y completa en más de 10% de las células tumorales.

En una forma de realización más preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, dicha puntuación comprende el uso de una escala apropiada basándose en dos parámetros que son la intensidad de la tinción y el porcentaje de células positivas.

En una forma de realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención, una escala apropiada es una escala de 0 a 3⁺ en la cual a la falta de reactividad membranosa de las células tumorales se asigna una puntuación de 0 y a la reactividad fuerte completa en más de 10% de las células tumorales se le asigna una puntuación de 3⁺.

Con mayor detalle, de acuerdo con lo descrito anteriormente, dicha escala apropiada es una escala de 0 a 3 en la cual se asigna 0 a la falta de reactividad membranosa de las células tumorales, se da una puntuación de 1⁺ a la reactividad membranosa tenuemente perceptible en más de 10% de las células tumorales; se da una puntuación de 2⁺ a la reactividad membranosa débil a moderada completa en más de 10% de las células tumorales y se da una puntuación de 3⁺ a la reactividad membranosa completa fuerte en más de 10% de las células tumorales.

En un aspecto específico de la invención, un tumor es cMet(+) con una puntuación de 2⁺.

En un aspecto específico de la invención, un tumor es cMet(+) con una puntuación de 3⁺.

En otro aspecto específico de la invención, un tumor es cMet(+) con una puntuación de 2⁺ o 3⁺.

5 La presente divulgación proporciona asimismo un procedimiento para determinar si un trastorno oncógeno es susceptible al tratamiento con un anticuerpo anti-cMet, o un fragmento o derivado del mismo, donde dicho procedimiento comprende las etapas siguientes (a) determinar *in vitro* el estado de cMet de un tumor de un sujeto de acuerdo con lo descrito anteriormente y (b) determinar que, si el estado es cMet(+), el trastorno oncógeno es susceptible al tratamiento con un anticuerpo anti-cMet o un fragmento o derivado del mismo.

10 En otro aspecto de la invención, se considera un kit útil para dicho procedimiento de diagnóstico o pronóstico, donde dicho kit comprende el anticuerpo de la invención.

15 Por conveniencia, una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para la ejecución del ensayo de diagnóstico, por ejemplo kits, también están dentro del alcance de la invención. El kit contiene los anticuerpos para la detección y cuantificación de cMet *in vitro*, por ejemplo en un ELISA o una transferencia Western. El anticuerpo de la presente invención se puede presentar en un kit para la detección y cuantificación de cMet *in vitro*, por ejemplo en un ELISA o una transferencia Western. En los casos en que el anticuerpo está conjugado a una enzima (por ejemplo, un sustrato precursor que aporta el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, se pueden incluir otros aditivos tales como estabilizadores, amortiguadores (por ejemplo, un amortiguador de bloqueo o un amortiguador de lisis) y demás. Ese tipo de kit puede comprender un
20 receptáculo que está compartimentado para recibir uno o más recipientes tales como frascos ampolla, tubos y demás, donde dichos recipientes contienen elementos separados de la invención. Por ejemplo, un recipiente puede contener un primer anticuerpo unido a un vehículo insoluble o parcialmente soluble. Un segundo recipiente puede contener un segundo anticuerpo soluble, marcado de manera detectable, en forma de liofilizado o en solución. El receptáculo puede contener además un tercer recipiente que contiene un tercer anticuerpo
25 marcado de manera detectable en forma liofilizada o en solución. Un kit de esta naturaleza se puede utilizar en el ensayo sándwich de la invención. La etiqueta o prospecto puede ofrecer una descripción de la composición, como así también instrucciones para el uso pretendido *in vitro* o de diagnóstico.

30 Las cantidades relativas de los diversos reactivos se pueden variar ampliamente para producir concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Específicamente, los reactivos se pueden presentar en forma de polvos secos, habitualmente liofilizados, e incluir excipientes que al disolverse producen una solución de los reactivos de la concentración apropiada.

35 En otro de los aspectos de la invención, se presentan anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión de los mismos de acuerdo con lo detallado en la presente memoria con una porción detectable, de tal manera que puedan ser envasados y utilizados, por ejemplo, en kits, para diagnosticar o identificar células con el antígeno mencionado anteriormente. Entre los ejemplos no limitativos de dichos marcadores se incluyen fluoróforos tales como isotiocianato de fluoresceína, cromóforos, radionúclidos o enzimas. Dichos anticuerpos marcados o
40 fragmentos de unión se pueden utilizar para la localización histológica del antígeno, ELISA, clasificación celular, como así también en otras técnicas inmunológicas para detectar o cuantificar cMet y las células que presentan este antígeno, por ejemplo.

45 También se presentan kits que son útiles como control positivo para ensayos de apoptosis, para la purificación o inmunoprecipitación de cMet de las células. Para el aislamiento y la purificación de cMet, el kit puede contener los anticuerpos descritos en la presente memoria o antígenos de unión al antígeno de los mismos acoplados a perlas (por ejemplo, perlas de sefarosa). Se pueden producir kits que contienen los anticuerpos para la detección y cuantificación de cMet *in vitro*, por ejemplo en un ELISA o una transferencia Western. Como en el caso del artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado al mismo. El recipiente contiene una composición que comprende por lo menos un anticuerpo anti-cMet o
50 fragmento de unión del mismo de acuerdo con la presente invención. Se pueden incluir otros recipientes que contienen, por ejemplo, diluyentes y amortiguadores, anticuerpos de control. La etiqueta o prospecto puede ofrecer una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso pretendido *in vitro* o de diagnóstico.

55 Más particularmente, la invención se refiere a un kit para la determinación del estado de cMet de un tumor por cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia. En una forma de realización preferida, como se describe en el ejemplo, la invención se refiere a un kit para la determinación del estado de cMet de un tumor por procedimientos de IHC.

60 En una forma de realización específica, la invención consiste en un kit que comprende por lo menos un anticuerpo anti-c-Met, o un fragmento funcional o derivado del mismo, según lo descrito anteriormente, donde dicho anticuerpo está preferentemente marcado.

65 Debe apreciarse que un experto en la materia puede utilizar cualquier procedimiento de marcado tal como, por ejemplo, el uso de los marcadores mencionados anteriormente.

En una forma de realización preferida, el kit de acuerdo con la invención, útil para detectar *in vitro* la presencia y/o la ubicación de un tumor con expresión de c-Met en un sujeto, comprende además un reactivo útil para detectar el grado de unión entre dicho anticuerpo anti-c-Met y c-Met.

5 En otra forma de realización preferida, el kit de la invención útil para determinar *in vitro* el nivel de expresión de c-Met en un tumor con expresión de c-Met, comprende además un reactivo provechoso para cuantificar el nivel de unión entre dicho anticuerpo marcado y c-Met.

10 En otra forma de realización adicional, el kit de acuerdo con la invención útil para determinar *in vitro* el estado de c-Met de un tumor, comprende además:

i) un reactivo útil para detectar el grado de unión entre dicho anticuerpo marcado y c-Met; y

15 ii) unas muestras de control positivas y negativas que sirven para la puntuación del nivel de expresión de c-Met.

Dicho kit para determinar *in vitro* el estado de c-Met de un tumor puede comprender además un anticuerpo policlonal específico para los anticuerpos murinos, preferentemente dicho anticuerpo policlonal específico para anticuerpos murinos está marcado.

20 Otras características y ventajas descritas en la presente memoria se ponen de manifiesto a continuación en la descripción mediante los ejemplos y las figuras cuyas leyendas están explicadas a continuación.

25 Figuras 1A y 1B:

Reconocimiento de c-Met según ELISA (figura A) y FACS (figura B) por el Mab m224D10.

30 Figura 2:

Experimentos de inhibición de la unión a $[^{125}\text{I}]$ -HGF. Se representó la unión específica total de $[^{125}\text{I}]$ -HGF (en %) en función de la concentración del ligando en un gráfico semilogarítmico. Los valores de unión específicos son el medio de los experimentos realizados por triplicado.

35 Figuras 3A y 3B:

Análisis IHC de secciones incluidas en parafina de tumores xenoinjertados U87-MG coloreados con un isotipo control (figura 3A) y el Mab m224D10 (figura 3B).

40 Figura 4:

Reconocimiento según FACS de c-Met por el Mab m221C9

45 Figuras 5A y 5B:

Curvas de titulación del Mab 221C9 Mab en la proteína c-Met dimérica (A) y monomérica (B) inmovilizada.

Figura 6:

50 Tinción por IHC de secciones incluidas en parafina de tejidos de tumores mamarios (A) y gástricos (B) que expresaban diversos niveles de c-Met con m224D10.

Figura 7:

55 Tinción por IHC de secciones incluidas en parafina de tejidos de tumores mamarios (A) y gástricos (B) que expresaban diversos niveles de c-Met con m221C9.

Figura 8:

60 Sensograma de inyecciones sucesivas de los Mabs 11E1 y 224D10 en 201,7 UR de c-Met-Fc capturado en la celda flujométrica 2 de un chip sensor CM5 activado por un anticuerpo anti-tag-His.

Figura 9:

65 Sensograma de inyecciones sucesivas de los Mabs 224G11 y 224D10 en 203,4 UR de c-Met-Fc capturado en la celda flujométrica 2 de un chip sensor CM5 activado por un anticuerpo anti-tag-His.

Figura 10:

5 Sensograma de inyecciones sucesivas de los Mabs 5D5 y 224D10 en 203,6 UR de c-Met-Fc capturado en la celda flujométrica 2 de un chip sensor CM5 activado por un anticuerpo anti-tag-His.

Figura 11:

10 Esquema de mapeo de epítomos de los 7 anticuerpos anti-cMet. Las flechas indican los tres experimentos realizados para este estudio. Los cuadrados grises indican que los anticuerpos no han sido analizados con 224D10.

Figura 12:

15 Ensayo de competencia de HGF con m221C9 Mab.

Ejemplo 1: Generación y selección de anticuerpos contra cMet que se podrían utilizar para fines de diagnóstico

20 - Etapa de inmunización

Para generar anticuerpos anti-cMet se inmunizaron ratones BALB/c de 8 semanas de edad 3 a 5 veces, por vía subcutánea, con una estirpe de células CHO transfectadas que expresaban cMet en su membrana plasmática (20x10⁶ células/dosis/ratón) o 2 a 3 veces con una proteína de fusión del dominio extracelular cMet (10-15 µg/dosis/ratón) (R&D Systems, # Catálogo 358MT) o fragmentos de esta proteína recombinante mezclados con adyuvante completo de Freund para la primera inmunización y adyuvante incompleto de Freund para los siguientes. También se ejecutaron protocolos mixtos en los cuales los ratones recibieron tanto células CHO-cMet como proteínas recombinantes. Tres días antes de la fusión de las células, se dio un refuerzo a los ratones por vía i.p. o i.v. con la proteína recombinante o fragmentos. A continuación se recogieron bazo de ratones y fueron fusionados a células de mieloma SP2/0-Ag14 (ATCC) y sometidos a selección por HAT. En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, especialmente de origen murino, es posible referirse a las técnicas que se describen en particular en el manual "Antibodies" (Harlow y 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).

35 - Etapa de cribado de 224D10

En un principio se clasificaron los hibridomas obtenidos por ELISA en la proteína recombinante cMet. Es decir, se revisió la proteína c-Met-Fc recombinante humana (R&D systems) de un día para otro a 4°C sobre placas Immulon II de 96 pocillos y, después de una etapa de bloqueo con una solución de gelatina al 0,5%, se agregó un intervalo de dosis del anticuerpo m224G10 durante 1 h más a 37°C. A continuación se lavaron las placas y se agregó IgG HRP específica de cabra antirratón (Jackson) durante 1 h a 37°C. Se realizó el desarrollo de la reacción empleando una solución sustrato de TMB. A continuación se realizó un segundo análisis de detección por análisis FACS en las estirpes celulares A459 y NCI-H441 que expresan niveles moderados a elevados de c-Met, a fin de garantizar que los anticuerpos producidos pudieran reconocer asimismo el receptor nativo en las células tumorales. Para ese fin se incubaron 2x10⁵ células con un intervalo de concentraciones de 224D10 Mab no conjugado o el isotipo control 9G4 (Mab isotipo control de IgG1) por espacio de 20 min a 4°C. Después de 3 lavados en salina con amortiguador de fosfato (PBS) suplementado con BSA al 1% y 0,01% de NaN₃, se incubaron las células con el anticuerpo secundario de cabra antirratón Alexa 488 (dilución 1/500) por espacio de 50 20 minutos a 4°C. Después de 3 adicionales en PBS suplementado con BSA al 1% y 0,1% de NaN₃, se analizaron las células por FACS (FacsCalibur, Becton-Dickinson). Se evaluaron por lo menos 5000 células para calcular el valor medio de intensidad de fluorescencia.

Se amplificaron los reactores positivos de estos 2 ensayos, fueron clonados y se recuperó una serie de hibridomas, fueron purificados y analizados para detectar su falta de competencia con HGF radiomarcado. En efecto, habitualmente se necesita un anticuerpo de diagnóstico tanto para la selección de pacientes como a título de biomarcador para seguir el comportamiento del receptor tomado como objetivo en pacientes tratados con un anticuerpo terapéutico. Con respecto a este último punto, el criterio principal que se debe considerar es que el anticuerpo de diagnóstico se debe unir a un epítomo diferente del reconocido por el anticuerpo terapéutico. Una de las metas para un anticuerpo terapéutico neutralizante dirigido contra un receptor de factor de crecimiento es inhibir la unión al ligando. En ese aspecto, durante la selección del anticuerpo de diagnóstico, se podrían seleccionar los que no interfieran con la unión al ligando. Para comprobar esa propiedad, se estableció un ensayo de competencia de los anticuerpos con HGF radiomarcado. En síntesis, se bloquearon microplacas de 96 pocillos FlashPlate (Perkin Elmer) con gelatina al 0,5% en PBS (2 h a temperatura ambiente) antes de revestirlas de un día para otro a 4°C con la proteína recombinante c-Met-Fc protein (R&D). Se saturaron además los sitios de proteína A con una hlgG pertinente durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS

después de cada etapa. En el caso de los ensayos de competencia, se midió la unión de [¹²⁵I]-HGF (actividad específica ~ 2,000 Ci/mmol) a 200 pM a c-Met inmovilizado en presencia de diversas concentraciones del anticuerpo monoclonal anti-c-Met que se va a analizar o HGF (R&D Systems) en el intervalo de 0,1 pM a 1 μM en PBS pH 7,4. Se introdujeron anticuerpos conocidos por su capacidad para desplazar HGF (224G11, 11E1 y 5D5) como controles positivos del experimento. El Mab 5D5 Mab es un anticuerpo generado por Genentech y disponible como hibridoma en la ATCC. Se utilizó una IgG1 murina, descrita como 9G4, como isotipo control. A continuación se incubaron las placas a temperatura ambiente por espacio de 6 h y se las sometió a recuento en un contador de centelleo en microplacas Packard Top Count. Se determinó la unión no específica en presencia de HGF 1 μM.

Por último, se seleccionaron los Mabs que cumplieran con los 3 criterios descritos anteriormente [i) reconocimiento de c-Met en un análisis ELISA, ii) unión al c-Met nativo y iii) ausencia de competencia con el ligando radiomarcado] para la prueba final de reconocimiento de c-Met en secciones incluidas en parafina de xenoinjertos de U87-MG, se desparafinó, rehidrató y colocó en amortiguador de recuperación Target Retrieval Buffer 1X (Dako S1699) en un baño hirviendo precalentado a 98°C para la recuperación de epítomos termoinducida a 98°C por espacio de 30 minutos y luego durante 30 minutos más en el amortiguador Target Retrieval Buffer. Después de 3 lavados en Salina con amortiguador de Tris-0,05% de tween 20 (TBS-T) (Dako S3006), se bloqueó la actividad endógena de peroxidasa utilizando reactivo de bloqueo de peroxidasa (Dako K4007) durante cinco minutos. Se lavaron las secciones con TBS-T y fueron incubadas con reactivo de bloqueo (UltraV block-TA-125UB- LabVision) durante 5 minutos antes de la adición del anticuerpo monoclonal de ratón c-Met que se debe analizar (5 μg/ml). Se utiliza una IgG1/kappa (5 μg/ml, X0931, Dako) de ratón como control negativo. A continuación se incubaron las secciones de un día para otro a 4°C, fueron lavadas con TBS-T e incubadas con ligante biotinilado universal (LSAB+, Dako K0679) por espacio de 15 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado con TBS-T, se incubaron las secciones durante 15 minutos más con el complejo universal de estreptavidina-peroxidasa (LSAB+, Dako K0679). Se utilizó diaminobenzidina para la revelación de un producto de reacción marrón.

Después de una serie de fusiones, se identificó el anticuerpo murino 224D10 (m224D10) como candidato para el diagnóstico de tumores c-Met positivos. Como se ejemplifica en la figura 1, el m224D10 puede reconocer c-Met tanto en un ensayo ELISA (Figura 1A) como en la superficie de las estirpes celulares A549 y NCI-H441 conocidas por su expresión de c-Met (Figura 1B).

A continuación se analizó el m224D10 en un ensayo de desplazamiento de HGF radiomarcado. En la figura 2, se representó el porcentaje de unión específica total de [¹²⁵I]-HGF en función de concentraciones de ligandos en gráficos semilogarítmicos y se determinaron gráficamente las concentraciones de los diversos inhibidores necesarias para inhibir la unión al radioligando en 50% (CI₅₀) a partir de las curvas sigmoidales de competencia. Como se estimaba, el HGF no marcado pudo desplazar por completo la unión de [¹²⁵I]-HGF a c-Met inmovilizado, en tanto que el anticuerpo control 9G4 no exhibió actividad de bloqueo de HGF. Los Mabs anti-c-Met 224G11, 11E1 y 5D5, utilizados como controles positivos, pudieron inhibir la unión de [¹²⁵I]-HGF a c-Met inmovilizado, con valores CI₅₀ de 3,6 nM, 42 nM y 4,4 nM, respectivamente. Mab m224D10 no pudo desplazar [¹²⁵I]-HGF y fue seleccionado para estudios de inmunohistoquímica (IHC).

Los resultados expuestos en la figura 3B demostraron que m224G10 puede reconocer c-Met en tumores U87-MG xenoinjertados conocidos por ser particularmente sensibles a una terapia dirigida a c-Met. Como se esperaba, no se observó tinción alguna con un isotipo control de IgG1 (Figura 3A). Basándose en estos resultados, se realizaron experimentos para determinar si se podía utilizar el Mab 224D10 para puntuar c-Met en tumores.

- Etapa de cribado de 221C9

Inicialmente se analizaron los hibridomas obtenidos por ELISA en la proteína recombinante cMet dimérica o monomérica. En pocas palabras, se aplicaron las proteínas recombinantes humanas c-Met (dimérica o monomérica) de un día para otro a 4°C en placas Immulon II de 96 pocillos y, al cabo de 1 h de una etapa de bloqueo con una solución de gelatina al 0,5%, se agregó el sobrenadante de hibridoma puro durante 1 h más a 37°C. A continuación se lavaron las placas y se agregó una IgG HRP específica de cabra antirratón (Jackson) durante 1 h a 37°C. Se realizó la revelación de la reacción utilizando la solución sustrato de TMB. A continuación se realizó un segundo análisis de detección por FACS en la estirpe celular A549 que expresa niveles moderados a altos de c-Met, para asegurarse de que los anticuerpos producidos pudieran reconocer también el receptor nativo en las células tumorales. Para ese fin se incubaron 2x10⁵ células con 10 μg/ml de m221C9 o m10D9 (Mab isotipo control de IgG1) por espacio de 20 min a 4°C. Después de 3 lavados en salina con amortiguador de fosfato (PBS) suplementada con BSA al 1% y 0,01% de NaN₃, se incubaron las células con el anticuerpo secundario de cabra antirratón Alexa 488 (dilución 1/500) durante 20 minutos a 4°C. Después de 3 lavados adicionales en PBS suplementado con BSA al 1% y 0,1% de NaN₃, se analizaron las células por FACS (FacsCalibur, Becton-Dickinson). Se evaluaron por lo menos 5000 células para calcular el valor medio de la intensidad de fluorescencia.

Se amplificaron los hibridomas positivos en estos dos ensayos, fueron clonados, determinaron los isotipos y fueron expandidos. Se recogieron los nuevos sobrenadantes de hibridomas, se determinó su contenido de IgG. Se realizó un análisis de citometría complementario en un panel de 5 estirpes celulares tumorales humanas (A549, BXP3, MCF7, U87MG y HepG2). Todas estas estirpes celulares fueron provistas por la ATCC. Los datos obtenidos se presentan en la figura 4 y los valores de MFI fueron presentados en la siguiente tabla 6.

Tabla 6

<i>Datos del análisis de citometría (MFI) ejecutado con el Mab 221C9 en 5 estirpes de células tumorales (ATCC)</i>					
	A549	BXPC-3	MCF7	U87MG	HepG2
Células solamente	13,98	11,87	9,87	9,10	10,52
Anticuerpo secundario	11,98	13,23	11,10	11,20	15,85
Isotipo control	11,83	14,77	12,06	11,56	18,12
221C9	243,59	375,57	31,95	71	233,58

Se realizaron unos experimentos complementarios con anticuerpo 221C9 purificado. Se llevó a cabo la titulación del primer anticuerpo tanto en la proteína c-Met monomérica como en la proteína c-Met dimérica.

Las curvas de titulación se presentan en la figura 5. Se observó una afinidad similar por ambas formas del receptor c-Met. Para realizar este ELISA se aplicó la proteína c-Met dimérica humana (R&D systems, cat# 358MT) en una concentración de 0,25 µg/ml en PBS de un día para otro a 4°C. Después de la saturación de las placas (Costar #3690) con una solución de gelatina a 0,5 % durante 2 horas a 37°C, se incubaron los sobrenadantes de hibridoma durante 1 hora a 37°C. Una vez enjuagado con PBS, se agrega el anticuerpo anti-ratón HRP (Jackson ImmunoResearch, # catálogo 115-035-164) a cada pocillo en una dilución de 1/5000 en amortiguador ELISA (0,1 % de gelatina/0,05 % de Tween 20 en PBS) y se incubaron las placas durante 1 hora a 37°C. Después de 3 lavados en PBS, se revela la actividad de la peroxidasa mediante la adición de 50 µl del sustrato TMB (Uptima). Se deja que la reacción se produzca durante 5 min a temperatura ambiente. Se detiene la reacción mediante la adición de 50 µl/pocillo de una solución de H₂SO₄ 1 M y se lee en un lector de placas a 450 nm. Se realizó el mismo tipo de protocolo en c-Met monomérico, aunque, en ese caso, la proteína fue aplicada a razón de 5 µg/ml.

Por último, 221C9 Mab había cumplido los 2 criterios descritos anteriormente (i) reconocimiento de c-Met en un ensayo ELISA, (ii) unión al c-Met nativo expresado en la superficie de las estirpes celulares tumorales humanas.

Ejemplo 2: Puntuación de tejidos con respecto a la expresión de c-Met con los Mabs m224D10 y m221C9

Usando el protocolo descrito anteriormente, se coloreó una serie de tejidos tumorales humanos incluidos en parafina, que expresaban niveles variables de c-Met con los Mabs m224D10 y m221C9, respectivamente.

Los resultados expuestos en la figura 6 correspondiente al m224D10 y la figura 7 correspondiente al Mab m221C9 demostraron, en los dos tipos de tumores, que tanto m224D10 como m221C9 pueden discriminar tumores humanos con niveles variables de c-Met. Usando estos anticuerpos, se pudieron puntuar los tumores de la siguiente manera:

- 0 o neg: tumores negativos en los cuales no se observó tinción alguna de las membranas o células con membrana menos de 10% positiva,
- 1⁺: tinción apenas perceptible en más de 10% de las células tumorales,
- 2⁺: Se observó una tinción moderada completa de las membranas en más de 10% de las células tumorales,
- 3⁺: Una potente tinción completa de más de 10% de las células tumorales.

Ejemplo 3: 224D10 Experimentos de competencia

Como se expone anteriormente, también se podría utilizar un Mab de diagnóstico como "marcador de respuesta" para anticuerpos terapéuticos que induzcan la regulación a menos del receptor objetivo. Con respecto a ese punto, se podrían realizar biopsias de sangre en pacientes tratados y analizarlas para determinar el estado de c-Met. Para ese fin, el anticuerpo de diagnóstico que se debe utilizar debe reconocer un epítipo diferente del tomado como diana por el anticuerpo terapéutico. Como los anticuerpos terapéuticos habitualmente pueden desplazar HGF, la selección del anticuerpo de diagnóstico que no compite por el desplazamiento del ligando podría ser de utilidad como marcador de respuesta para todos los Mabs terapéuticos.

En este ejemplo se realizaron experimentos de competencia entre 224D10 y muchos Mabs terapéuticos para

demostrar que se podría utilizar 224D10 como marcador de respuesta.

Se estudiaron los Mabs anti-c-Met 11E1, 227H1, 224G11 y el Mab 5D5, que es una forma murina del 5D5 de un brazo, existente en el comercio como híbridoma en la ATCC, en un experimento de biacore. En pocas palabras, se activa un chip sensor CM5 en una celda flujométrica 1 y 2 mediante el acoplamiento covalente del Mab antipoli-histidina utilizando el kit de acoplamiento de aminas siguiendo las instrucciones del proveedor. El amortiguador de funcionamiento es el amortiguador HBS-EP. Los experimentos se llevan a cabo a 25°C a una velocidad de flujo de 30 µl/min. Se utiliza la proteína quimérica HGF-R/Fc en una concentración de 10 µg/ml en el amortiguador de funcionamiento y se inyecta durante 1 minuto en la celda flujométrica 2. Por lo general, se capturaron aproximadamente 190 UR de c-Met-Fc. La celda flujométrica 1 sirvió como referencia para el cálculo de la unión no específica de los Mabs. Se inyecta el primer Mab (20 µg/ml) durante 2 minutos en ambas células de flujo. A continuación se inyectó el segundo anticuerpo (20 µg/ml) en ambas celdas flujométricas. Se registra la señal de resonancia diferencial Fc2-Fc1. Al final de cada ciclo, se regeneró el chip sensor descartando las proteínas c-Met y los Mabs con una inyección del amortiguador de regeneración de Glicina, pH 1,5 en ambas celdas flujométricas durante medio minuto.

El primer experimento se lleva a cabo con 11E1 como primer anticuerpo y 224D10 como segundo anticuerpo (ver la figura 8). Este experimento demuestra que 11E1 y 224D10 se unen a dos regiones de epítopos distantes en la superficie de la molécula de c-Met-Fc. El experimento se lleva a cabo con 224G11 como primer anticuerpo y 224D10 como segundo anticuerpo (ver la figura 9). Este experimento demuestra que 224G11 y 224D10 se unen también a dos regiones distantes. El tercer experimento se lleva a cabo con 5D5 como primer anticuerpo y 224D10 como segundo anticuerpo (ver la figura 10). Una vez más, este experimento demuestra que 5D5 y 224D10 se unen a dos regiones distantes. En conclusión 224D10 se une a una región distante, en la molécula de c-Met, de los sitios de unión de 11E1, 224G11 y 5D5. Dado que los datos preliminares obtenidos con el mismo tipo de protocolo El protocolo Biacore demostró que el anticuerpo 13.3.2 anti-c-Met de Pfizer pertenece al mismo grupo de mapeo de epítopos que 11E1 (Figura 11), se puede sospechar que 224D10 y 13.3.2 se pueden unir simultáneamente a la misma molécula de c-Met incluso si esta combinación no ha sido estudiada. Del mismo modo con respecto a 227H1 que pertenece al mismo grupo de epítopos que 224G11 (Figura 11), es probable que tanto el anticuerpo 227H1 como el 224D10 se unan simultáneamente a c-Met. Por último, 223C4, que pertenece al mismo grupo de mapeo de epítopos que 5D5 (Figura 11) podría unirse probablemente a c-Met simultáneamente con 224D10.

Ejemplo 4: Experimentos de competencia de HGF realizados en presencia del anticuerpo 221C9

Para caracterizar adicionalmente los Mabs de diagnóstico, se llevan a cabo ensayos de competencia de HGF. Se preparan primeras mezclas de reacción que comprenden la proteína c-Met en presencia, o no, de los Mabs que se deben analizar en una placa saturada separada (0,5% de gelatina en PBS 1X). Se efectúan diluciones en serie 1: 2 (comenzando con 40 µg/ml en 12 columnas) de anticuerpos murinos (los referencia y Mabs que se deben estudiar). A continuación se agregan 0,8 µg/ml de la proteína rh c-Met-Fc (RD Systems, ref. 358-MT/CF), excepto por la estirpe control negativo que contiene sólo el diluyente de ELISA (0,1% de gelatina, 0,05% de Tween 20 en PBS 1X). Después de la homogeneización, se cargan las muestras de competencia en placas revestidas con HGF con una solución de 0,3 µg/ml de rhHGF en PBS (RDSystems, ref. 294-HGN/CF). Después de una incubación y varios lavados, se detectan las proteínas c-Met unidas utilizando una IgG-HRP de cabra antihumana (Jackson, ref. 109-035-098). Una vez unido, se agrega el sustrato de TMB a las placas. Se detiene la reacción mediante la adición de una solución ácida de H₂SO₄ se leen las densidades ópticas obtenidas a 450 nm utilizando un instrumento lector de microplacas.

El experimento se lleva a cabo con 221C9 en presencia o ausencia de la proteína recombinante c-Met-Fc (ver la figura 12). Este experimento demuestra que 221C9 puede competir por la unión a c-Met en su receptor ligado inmovilizado. Sin embargo, en presencia de 20 µg/ml de 221C9, sólo se observa una unión parcial de c-Met.

Listado de secuencias

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT
 <120> NUEVO ANTICUERPO ANTI-cMET Y SU UTILIZACIÓN PARA LA DETECCIÓN Y EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER
 <130> D27752
 <150> EP 09305777.6
 <151> 2009-08-21
 <150> US 61/235.864
 <151> 2009-08-21

<150> US 61/348.005
<151> 2010-05-25

<160> 60

5 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 5
10 <212> PRT
<213> mus musculus

<400> 1

Thr Ser Ala Tyr Phe
15 **1 5**
<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> mus musculus

20 <400> 2

Ile Asn Tyr Asp Gly Thr Asn
1 **5**
25 <210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 3

30 **Asp Arg Thr Phe Ala Tyr**
1 5
<210> 4
<211> 6
<212> PRT
35 <213> mus musculus

<400> 4

Gln Arg Ile Tyr Asn Tyr
40 **1 5**
<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> mus musculus

45 <400> 5

Tyr Ala Ser
1
<210> 6
<211> 9
50 <212> PRT
<213> mus musculus

<400> 6

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr
55 **1 5**
<210> 7
<211> 9
<212> PRT
60 <213> mus musculus

ES 2 692 522 T3

<400> 7

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala Tyr Phe
 1 5

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

10 <400> 8

Thr Arg Asp Arg Thr Phe Ala Tyr
 1 5

15 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> mus musculus

20 <400> 9

Thr Ser Ala Tyr Phe Trp Ser
 1 5

25 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> mus musculus

30 <400> 10

Phe Ile Asn Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15

35 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 11

40 Arg Ala Ser Gln Arg Ile Tyr Asn Tyr Leu His
 1 5 10

<210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> mus musculus

45 <400> 12

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 1 5

50 <210> 13
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> mus musculus

55 <400> 13

ES 2 692 522 T3

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

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

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

Met Gly Phe Ile Asn Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Val Ser Ala
115

<210> 14
<211> 107
5 <212> PRT
<213> mus musculus

<400> 14

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

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Tyr Asn Tyr
20 25 30

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

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95

10 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg
100 105

<210> 15
<211> 15
<212> **ADN**
15 <213> mus musculus

<400> 15

ES 2 692 522 T3

	accagtgctt atttc	15
5	<210> 16 <211> 21 <212> ADN <213> mus musculus	
	<400> 16	
10	ataaactacg acggtaccaa t	21
15	<210> 17 <211> 18 <212> ADN <213> mus musculus	
	<400> 17	
20	gatcggacct ttgcttat	18
25	<210> 18 <211> 18 <212> ADN <213> mus musculus	
	<400> 18	
30	caaagaattt acaactac	18
35	<210> 19 <211> 9 <212> ADN <213> mus musculus	
	<400> 19	
	tatgcttcc	9
40	<210> 20 <211> 27 <212> ADN <213> mus musculus	
45	<400> 20	
	caacagagta acagctggcc tctcacg	27
50	<210> 21 <211> 27 <212> ADN <213> mus musculus	
	<400> 21	
55	ggctactcca tcaccagtgc ttatttc	27
60	<210> 22 <211> 24 <212> ADN <213> mus musculus	
	<400> 22	
65	acaagagatc ggacctttgc ttat	24

ES 2 692 522 T3

	<210> 23	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> mus musculus	
5	<400> 23	
	accagtgctt atttctggag c	21
10	<210> 24	
	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> mus musculus	
15	<400> 24	
	ttcataaact acgacggtac caataactac aaccatctc tcaaaaat	48
20	<210> 25	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> mus musculus	
25	<400> 25	
	agggccagtc aaagaattta caactaccta cac	33
30	<210> 26	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> mus musculus	
35	<400> 26	
	tatgcttccc agtccatctc t	21
40	<210> 27	
	<211> 345	
	<212> ADN	
	<213> mus musculus	
	<400> 27	
	gatctacagc ttcaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac ettctcagtc tctgtctctc	60
	acctgctctg tcaactggcta ctccatcacc agtgcttatt tctggagctg gatccggcag	120
	tttccaggaa acaaactgga atggatgggc ttcataaact acgacggtac caataactac	180
	aaccatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgata catctaagaa ccagtttttc	240
	ctgaggttga attctgtgac tactgacgac acagctacgt attactgtac aagagatcgg	300
45	acctttgctt attggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca	345
	<210> 28	
	<211> 321	
	<212> ADN	
	<213> mus musculus	
50	<400> 28	

ES 2 692 522 T3

```

gatattgtgt taactcagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtcagt      60
ctttcctgca gggccagtca aagaatttac aactacctac actggtatca acaaaaatca      120
catgagtctc caaggcttct catcaagtat gcttcccagt ccatctctgg gatcccctcc      180
aggttcagtg gcagtggtctc agggacagat ttcattctca ctatcaacag tgtggagact      240
gaagattttg gaatgtattt ctgtcaacag agtaacagct ggctctcac gttcgggtgct      300
gggaccaagc tggagctgag a                                              321

<210> 29
<211> 8
5 <212> PRT
   <213> Mus musculus

<400> 29

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
10 1              5

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
15 <213> Mus musculus

<400> 30

Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr
20 1              5

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
25 <213> Mus musculus

<400> 31

Ala Arg Arg Val Gly Tyr Leu Met Asp Tyr
30 1              5              10

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

35 <400> 32

Ser Ser Val Ser Tyr
1              5

<210> 33
<211> 3
40 <212> PRT
   <213> Mus musculus

<400> 33

45 Asp Thr Ser
   1

<210> 34
<211> 9
50 <212> PRT
   <213> Mus musculus

```

ES 2 692 522 T3

<400> 34
 Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr
 1 5

5 <210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 35
 Ser Tyr Trp Met His
 1 5

15 <210> 36
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <400> 36
 Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe Arg
 1 5 10 15

Thr

25 <210> 37
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 37
 Arg Val Gly Tyr Leu Met Asp Tyr
 1 5

35 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 38
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

45 <210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

50 <400> 39
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

55 <210> 40
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 40

ES 2 692 522 T3

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

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Arg Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Ala Lys Ser Ser Ile Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Val Thr Ala Pro Gln
115

- 5 <210> 41
- <211> 106
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

10 <400> 41

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

- 15 <210> 42
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Mus musculus

20 <400> 42

ES 2 692 522 T3

	ggctacacct tcaccagcta ctgg	24
	<210> 43	
	<211> 24	
5	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
	<400> 43	
10	attaatccta gcaacggtcg tact	24
	<210> 44	
	<211> 30	
15	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
	<400> 44	
20	gcaagaaggg ttggtacct catggactac	30
	<210> 45	
	<211> 15	
	<212> ADN	
25	<213> Mus musculus	
	<400> 45	
	tcaagtgtaa gttac	15
30	<210> 46	
	<211> 9	
	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
35	<400> 46	
	gacacatcc	9
	<210> 47	
40	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
	<400> 47	
45	cagcagtgga atagtaacct acccaccg	27
	<210> 48	
	<211> 15	
50	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
	<400> 48	
55	agctactgga tgcac	15
	<210> 49	
	<211> 51	
	<212> ADN	
60	<213> Mus musculus	
	<400> 49	
65	gagattaatc ctagcaacgg tcgtactcac tacaatgaga agttcaggac c	51
	<210> 50	

ES 2 692 522 T3

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5 <400> 50

agggttgggtt acctcatgga ctac 24

10 <210> 51
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15 <400> 51

agtgccagct caagtgaag ttacatgcac 30

20 <210> 52
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

25 <400> 52

gacacatcca aactggcttc t 21

30 <210> 53
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

35 <400> 53

cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagctg 60

tcctgcgaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120

cctggacaag gccttgagtg gattggagag attaatccta gcaacggtcg tactcactac 180

aatgagaagt tcaggaccaa ggccacactg actgttgcca aatcctccat cacagcctac 240

atgcaactca gcaccctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaagggtt 300

ggttacctca tggactactg ggggtcaagga acctcagtca ccgctcctca g 351

40 <210> 54
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

45 <400> 54

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcagggc 120

acctccccca aaagattgat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctctac tctctcaciaa tcagcagcat ggaggctgaa 240

gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg aatagtaacc caccacggtt cgggtgctggg 300

accaagctgg agctgaaa 318

45 <210> 55
 <211> 9
 <212> **PRT**
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de CDR-H1

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es S o T

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es I o F

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es A o está ausente

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa es F o W

25 <400> 55

Gly Tyr Xaa Xaa Thr Ser Xaa Tyr Xaa
 1 5

30 <210> 56
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial

35 <220>
 <223> Secuencia de CDR-H2

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es Y o P

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es D o S

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es N o está ausente

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es T o R

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es N o T

<400> 56

Ile Asn Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa
 1 5

<210> 57
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia de CDR-H3

 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es T o A

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es D o R

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es R o V

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es T o G

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es F o Y

 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es A o L

 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es M o está ausente

 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa es D o está ausente

 50 <400> 57

 Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr
 1 5 10

 <210> 58
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 60 <223> Secuencia de CDR-L1

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 65 <223> Xaa es Q o está ausente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 5 <223> Xaa es R o S

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 10 <223> Xaa es I o S

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 15 <223> Xaa es Y o V

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 20 <223> Xaa es N o S

<400> 58

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr
1 5

25 <210> 59
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de CDR-L2

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es Y o D

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es A o T

<400> 59

45 **Xaa Xaa Ser**
1
 <210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de CDR-L3

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es S o W

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es W o N

ES 2 692 522 T3

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa es L o P

5

<400> 60

Gln Gln Xaa Asn Ser Xaa Pro Xaa Thr
1 5

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo, o fragmento funcional o derivado del mismo, apto para unirse a c-Met, estando dicho anticuerpo caracterizado por que se selecciona de entre el grupo que consiste en:
- 5
- a) un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, que comprende:
- una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes como se define según IMGT, respectivamente CDR-H1 que presenta la secuencia SEC ID nº 7, CDR-H2 que presenta la secuencia SEC ID nº 2 y CDR-H3 que presenta la secuencia SEC ID nº 8, y
 - una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes como se define según IMGT, respectivamente CDR-L1 que presenta la secuencia SEC ID nº 4, CDR-L2 que presenta la secuencia SEC ID nº 5 y CDR-L3 que presenta la secuencia SEC ID nº 6; y
- 10
- 15
- b) un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, que comprende:
- una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes como se define según IMGT, respectivamente CDR-H1 que presenta la secuencia SEC ID nº 29, CDR-H2 que presenta la secuencia SEC ID nº 30 y CDR-H3 que presenta la secuencia SEC ID nº 31; y
 - una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes como se define según IMGT, respectivamente CDR-L1 que presenta la secuencia SEC ID nº 32, CDR-L2 que presenta la secuencia SEC ID nº 33 y CDR-L3 que presenta la secuencia SEC ID nº 34.
- 20
- 25
2. Anticuerpo, o fragmento funcional o derivado del mismo, según la reivindicación 1, caracterizado por que se selecciona de entre el grupo que consiste en:
- a) un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, que comprende un dominio variable de cadena pesada de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 13 y un dominio variable de cadena ligera de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 14; y
- 30
- b) un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, que comprende un dominio variable de cadena pesada de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 40 y un dominio variable de cadena ligera de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 41.
- 35
3. Anticuerpo, o fragmento funcional o derivado del mismo, según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que es un anticuerpo murino.
- 40
4. Anticuerpo, o fragmento funcional o derivado del mismo, según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que no bloquea la unión del ligando HGF a la proteína c-Met.
5. Hibridoma murino apto para secretar un anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 4, siendo dicho hibridoma murino seleccionado de entre el hibridoma depositados en la CNCM, Institut Pasteur, Paris, Francia el 12 de marzo de 2008 con el número I-3949 y el hibridoma depositado en la CNCM, Institut Pasteur, Paris, Francia el 14 de enero de 2010 con el número I-4273.
- 45
6. Ácido nucleico aislado, caracterizado por que codifica un anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 4.
- 50
7. Ácido nucleico según la reivindicación 6, caracterizado por que comprende una secuencia de ADN que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 15 a 26 o 42 a 52, o comprende una secuencia de ADN que comprende las secuencias SEC ID nº 27, 28, 53 o 54.
8. Procedimiento de detección *in vitro* de la presencia y/o la ubicación de un tumor que expresa c-Met en un sujeto, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de (a) poner en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, según una de las reivindicaciones 1 a 4 y (b) detectar la unión de dicho anticuerpo con la muestra.
- 55
9. Procedimiento de determinación *in vitro* del nivel de expresión de c-Met en un tumor que expresa c-Met de un sujeto, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de (a') poner en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, según una de las reivindicaciones 1 a 4 y (b') cuantificar el nivel de unión de anticuerpo a c-Met en dicha muestra.
- 60
10. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que se mide el nivel de expresión de c-Met por inmunohistoquímica (IHC).
- 65

- 5 11. Procedimiento de diagnóstico *in vitro* de un tumor que expresa c-Met o determinación *in vitro* del pronóstico para desarrollar un tumor que expresa c-Met en un sujeto, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de (i) determinar el nivel de expresión de c-Met según la reivindicación 9 y (ii) comparar el nivel de expresión de la etapa (i) con un nivel de expresión de referencia de c-Met del tejido normal.
- 10 12. Procedimiento de determinación *in vitro* del estado de c-Met de un tumor de un sujeto, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de (1) determinar el nivel de expresión de c-Met según la reivindicación 9, (2) puntuar dicho tumor para el nivel de expresión de c-Met y (3) comparar dicha puntuación con la obtenida de una muestra de control.
- 15 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicha puntuación comprende utilizar una escala apropiada basada en dos parámetros que son la intensidad de la tinción y el porcentaje de células positivas.
- 20 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicha escala apropiada es una escala de 0 a 3⁺ en la que sin reactividad membranosa de las células tumorales puntúa 0 y una reactividad completa fuerte en más de 10% de las células tumorales puntúa 3⁺.
- 25 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que dicha escala apropiada es una escala de 0 a 3 en la que sin reactividad membranosa de las células tumorales puntúa 0; puntúa 1⁺ una reactividad membranosa perceptible débil en más de 10% de las células tumorales; la reactividad membranosa completa leve a moderada en más de 10% de las células tumorales puntúa 2⁺; y la reactividad completa fuerte en más de 10% de las células tumorales puntúa 3⁺.
- 30 16. Procedimiento según la reivindicación 14 o 15, en el que un tumor es c-Met(+) con una puntuación de 2⁺ o 3⁺.
- 35 17. Procedimiento para determinar si un trastorno oncógeno es susceptible de tratamiento con un anticuerpo anti-c-Met, o un fragmento o derivado del mismo, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de (a) determinar *in vitro* el estado de c-Met de un tumor de un sujeto según la reivindicación 16 y (b) determinar que, si el estado es c-Met(+), el trastorno oncógeno es susceptible de tratamiento con un anticuerpo anti-c-Met, o un fragmento o derivado del mismo.
- 40 18. Kit que comprende por lo menos un anticuerpo anti-c-Met, o un fragmento funcional o derivado del mismo, según una de las reivindicaciones 1 a 4, estando dicho anticuerpo preferentemente marcado.
- 45 19. Kit según la reivindicación 18 para detectar *in vitro* la presencia y/o la ubicación de un tumor que expresa c-Met en un sujeto, comprendiendo además dicho kit un reactivo útil para detectar el grado de unión entre dicho anticuerpo anti-c-Met y c-Met.
- 50 20. Kit según la reivindicación 18 para determinar *in vitro* el nivel de expresión de c-Met en un tumor que expresa c-Met, comprendiendo además dicho kit un reactivo útil para cuantificar el nivel de unión entre dicho anticuerpo anti-c-Met y c-Met.
21. Kit según la reivindicación 18 o 19 para determinar *in vitro* el estado de c-Met de un tumor, comprendiendo además dicho kit:
- i) un reactivo útil para detectar el grado de unión entre dicho anticuerpo anti-c-Met y c-Met; y
 - ii) unas muestras de control positivas y negativas útiles para la puntuación del nivel de expresión de c-Met.
22. Kit según la reivindicación 21 para determinar *in vitro* el estado de c-Met de un tumor, comprendiendo además dicho kit un anticuerpo policlonal específico para anticuerpos murinos, estando preferentemente dicho anticuerpo policlonal específico para anticuerpos murinos marcado.

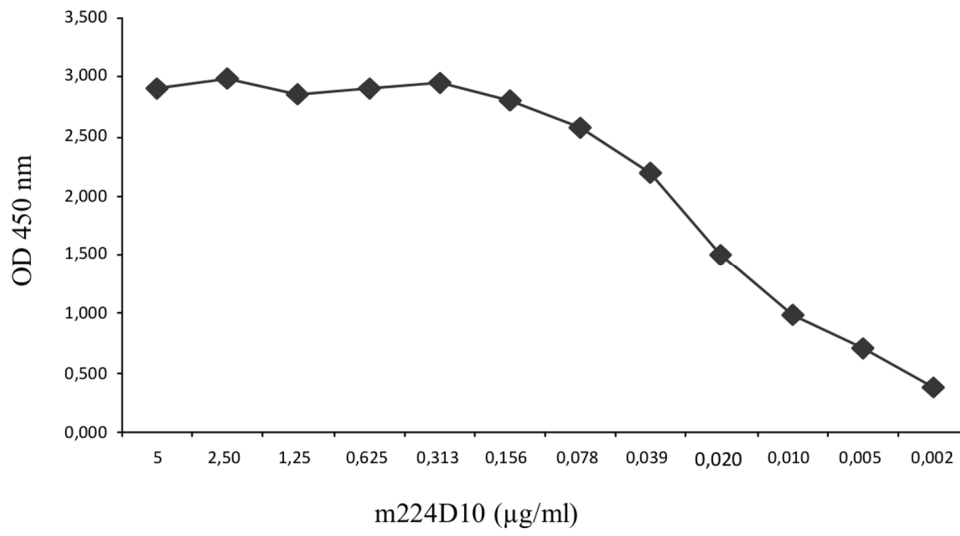


FIGURA 1A

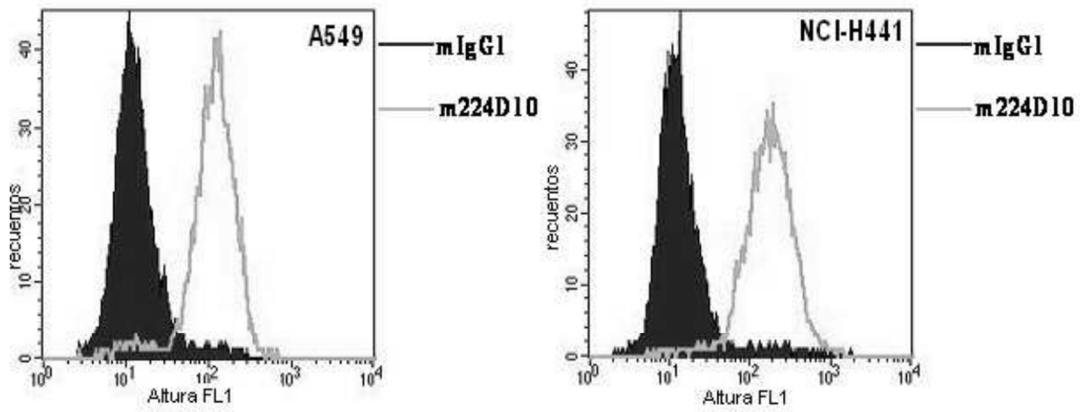


FIGURA 1B

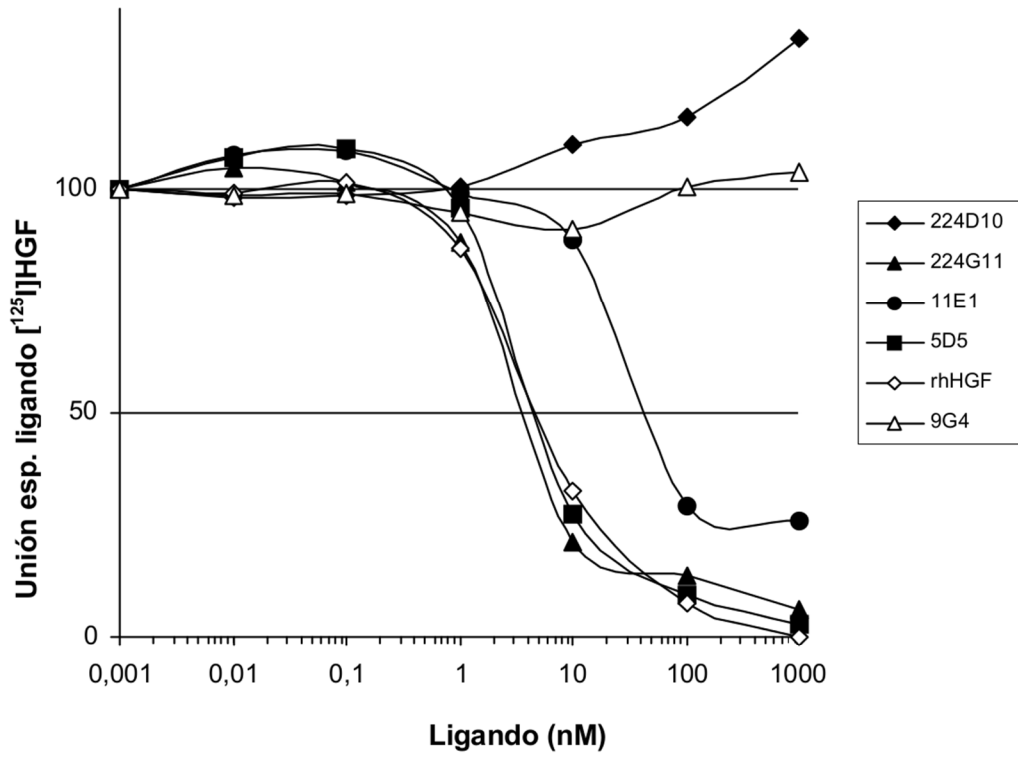


FIGURA 2

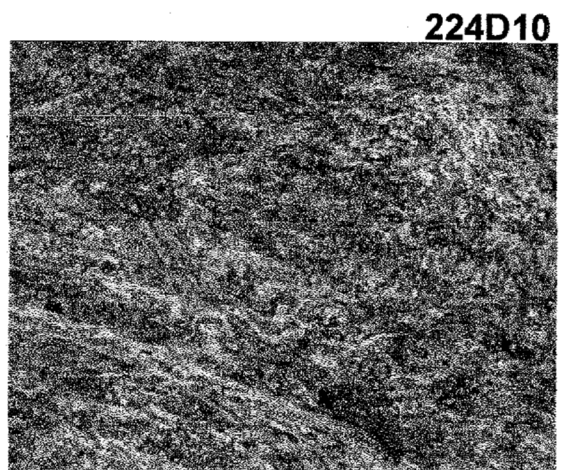
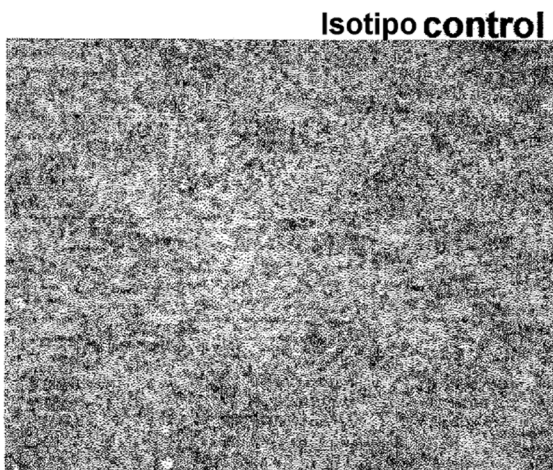


FIGURA 3A

FIGURA 3B

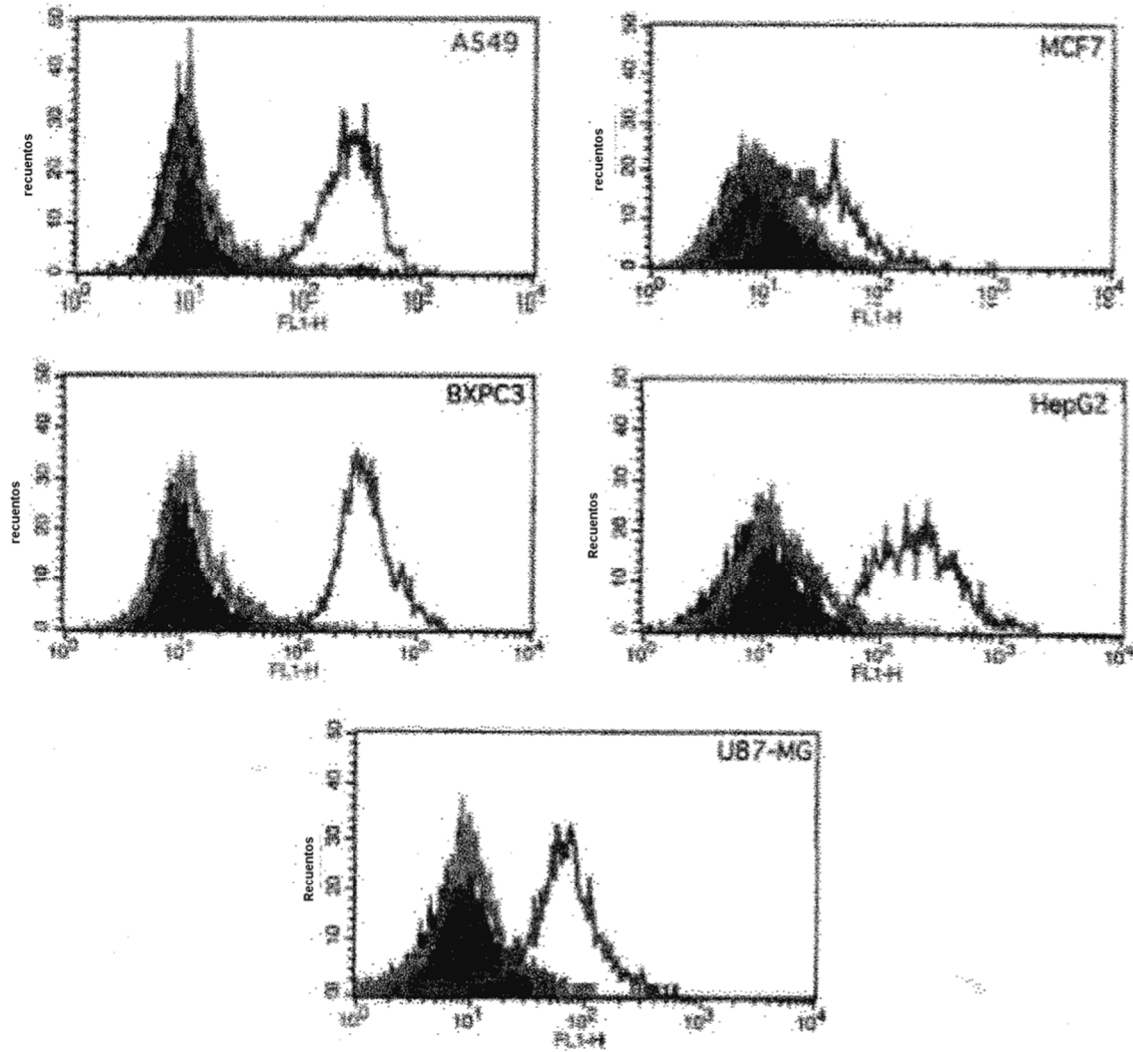


FIGURA 4

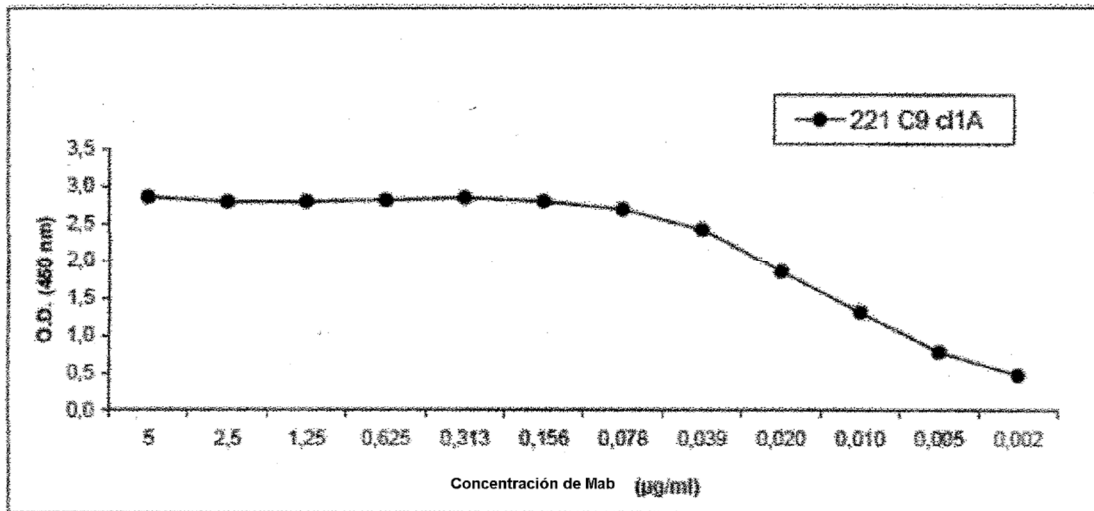


FIGURA 5 A

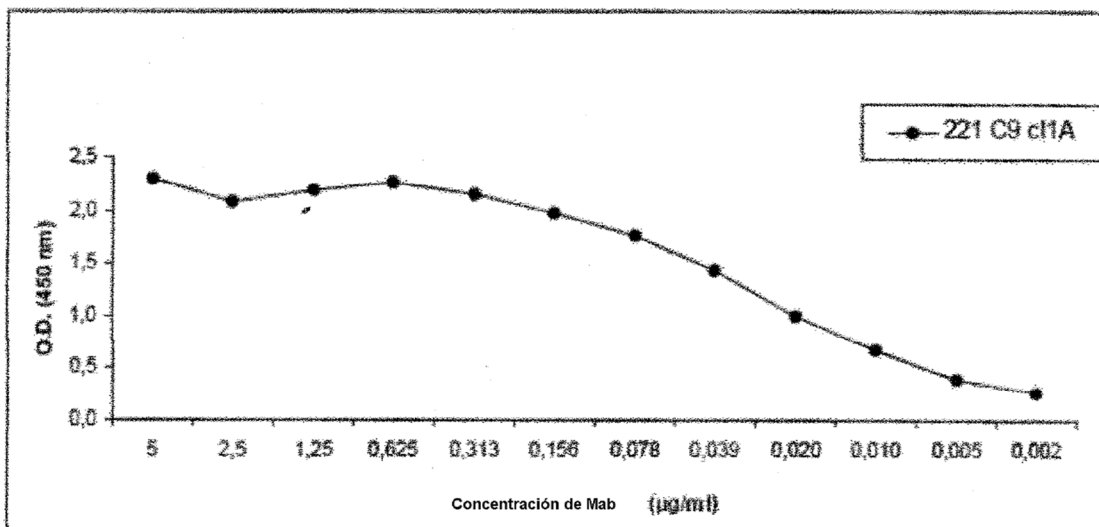
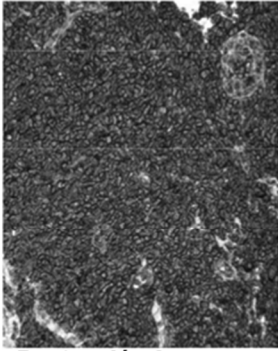
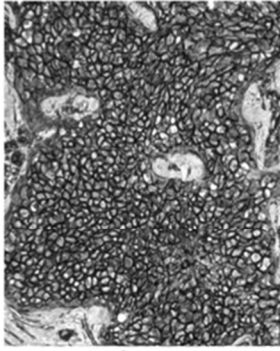


FIGURA 5 B

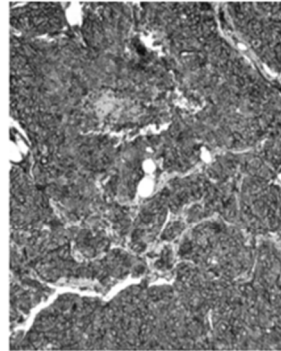
A) Cáncer de mama



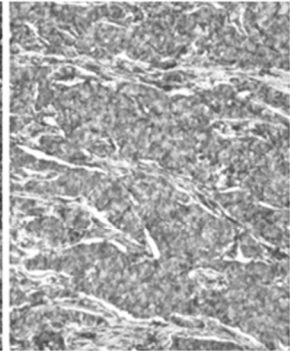
Puntuación 3+



Puntuación 2+

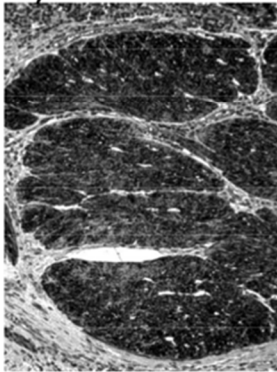


Puntuación 1+

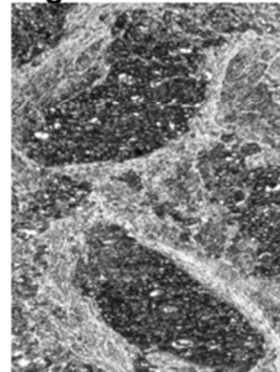


Puntuación 0

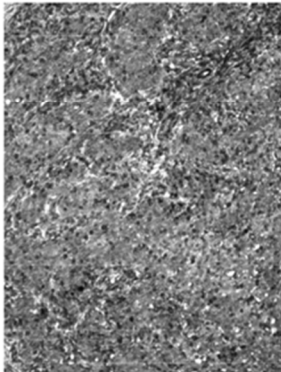
B) Cáncer de estómago



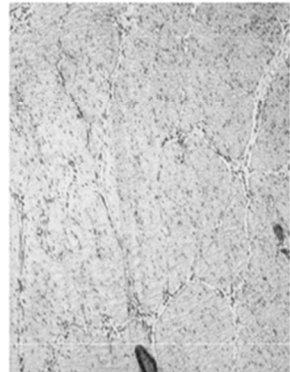
Puntuación 3+



Puntuación 2+



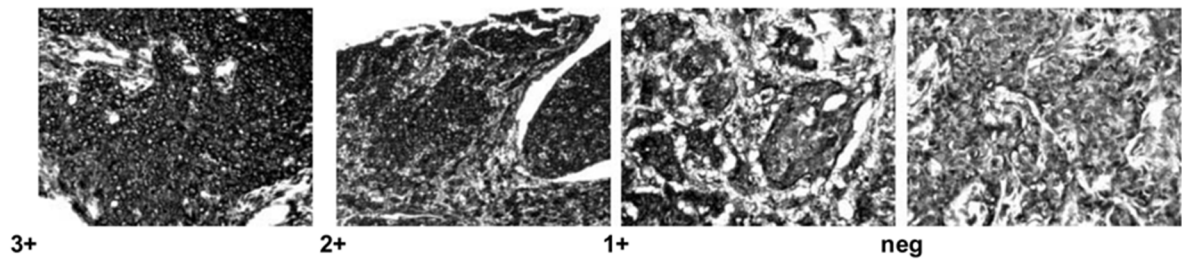
Puntuación 1+



Puntuación 0

FIGURA 6

A) Cáncer de mama



B) Cáncer de estómago

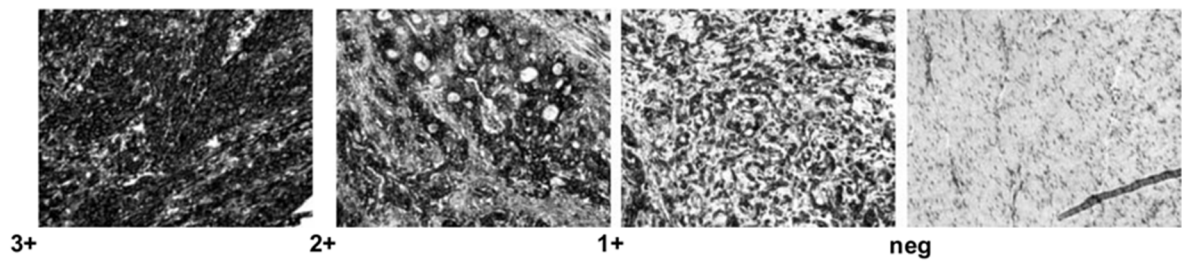


FIGURA 7

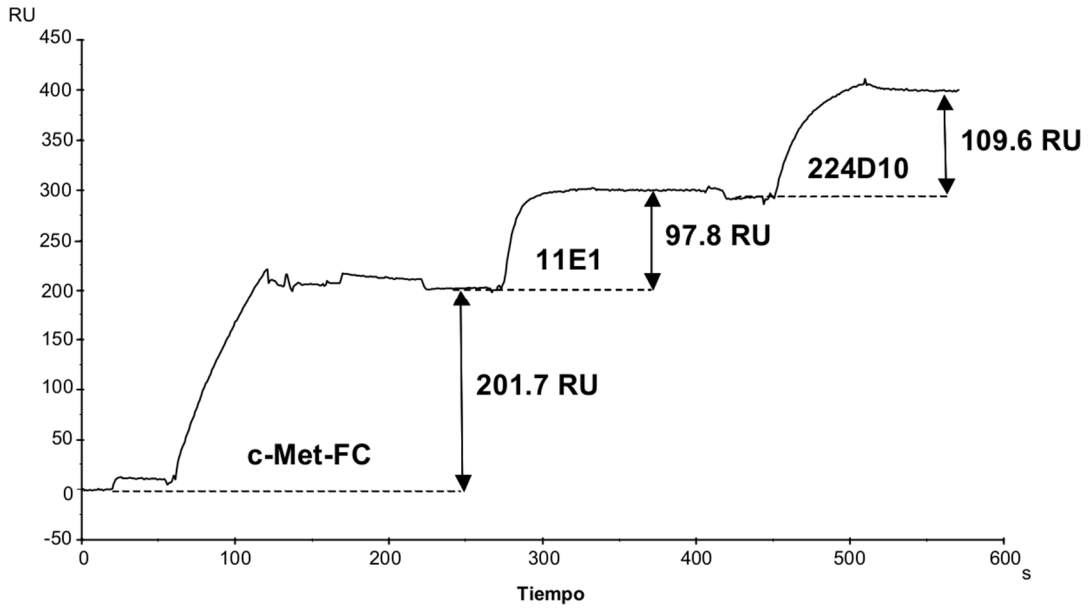


FIGURA 8

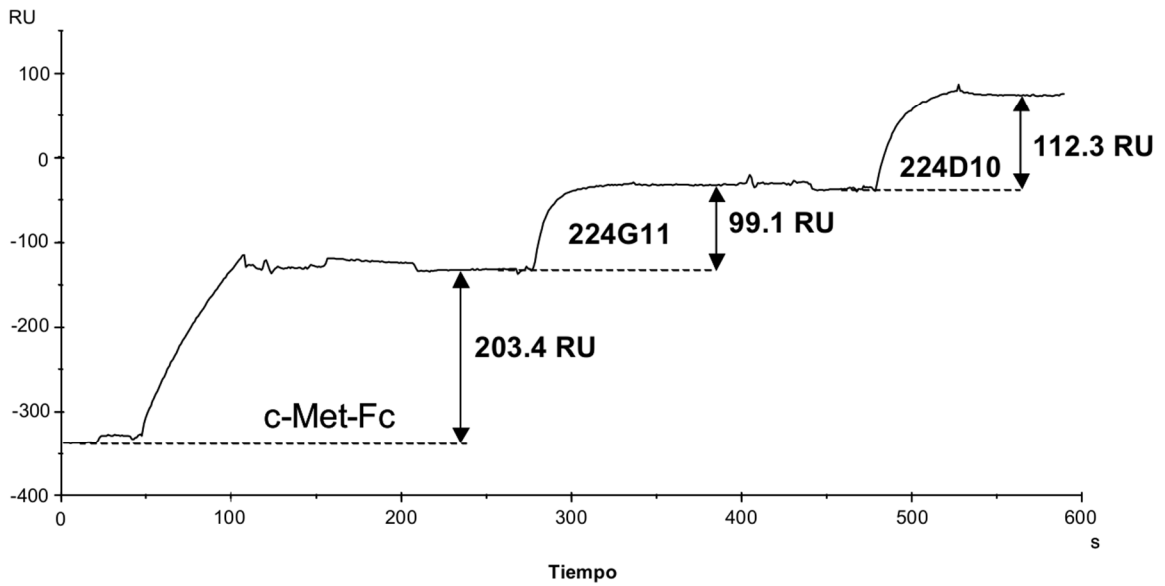


FIGURA 9

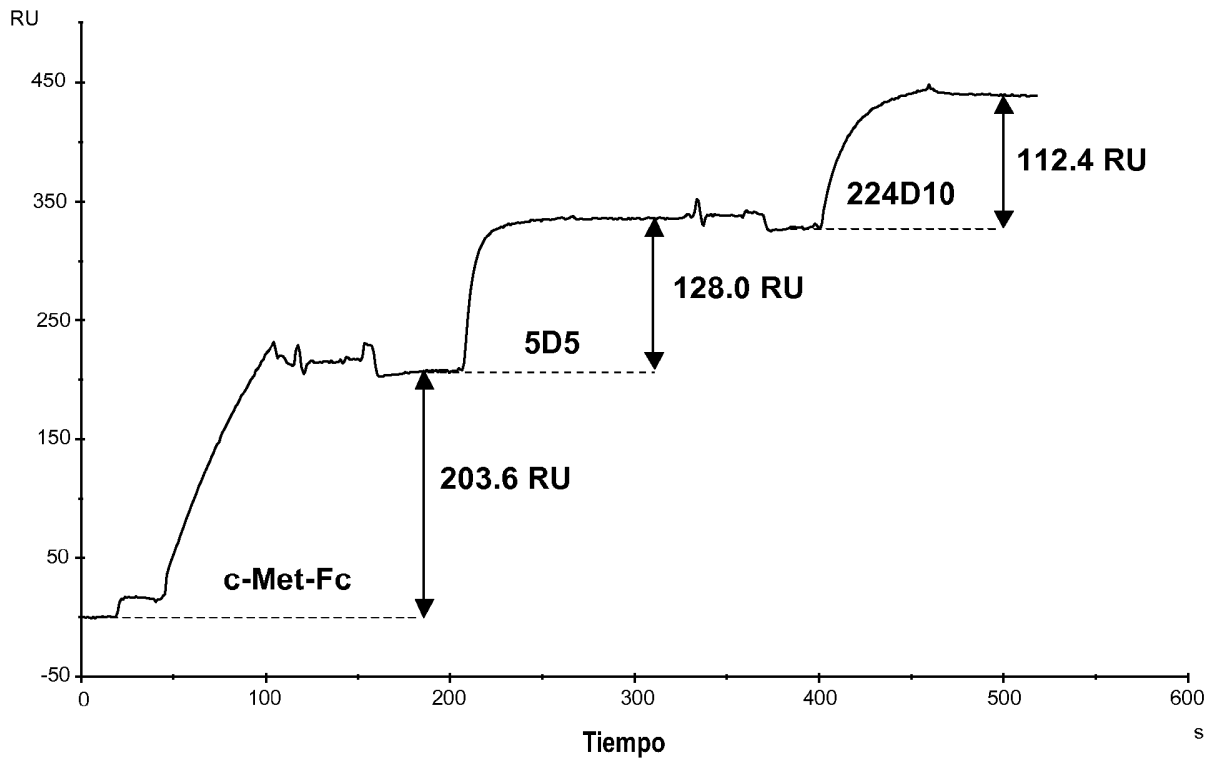


FIGURA 10

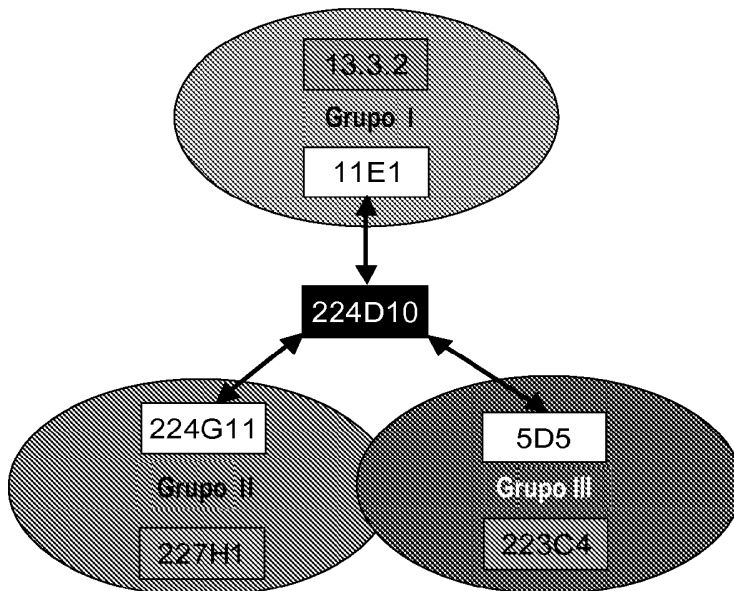


FIGURA 11

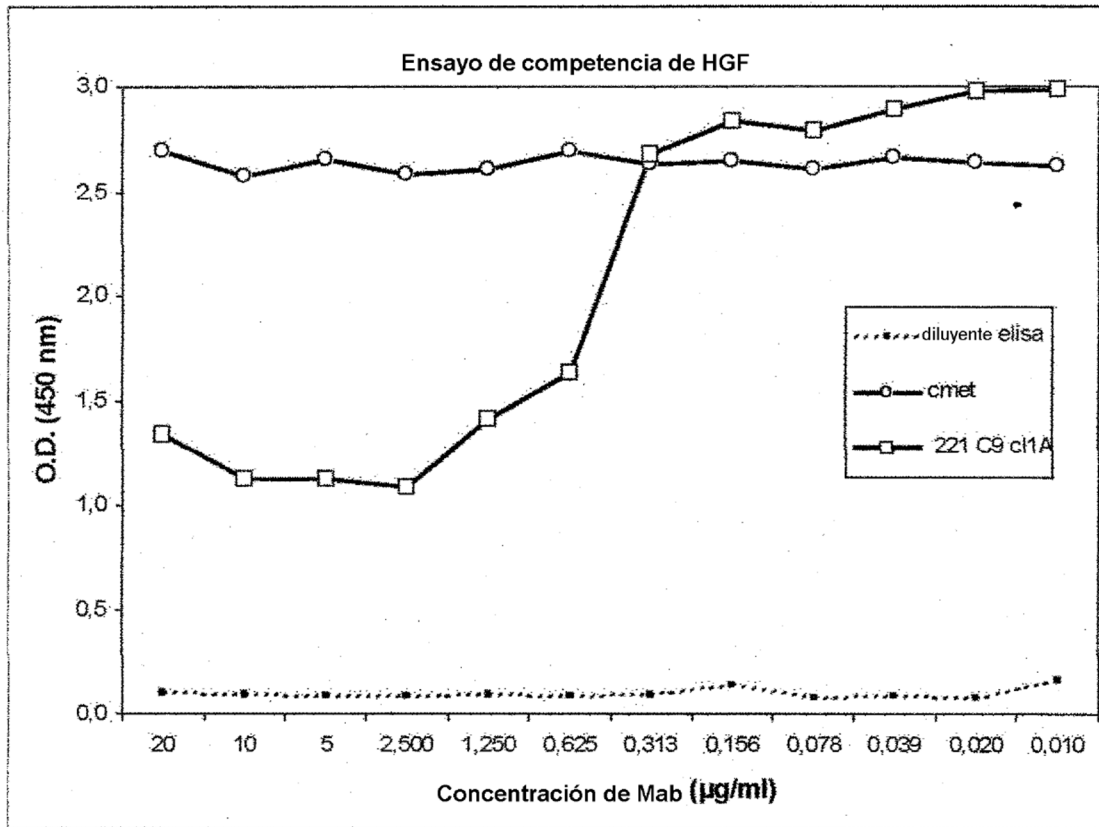


FIGURA 12