

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 295**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2015 PCT/IB2015/002110**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2016 WO16042412**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2015 E 15804578 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3194444**

54 Título: **Anticuerpos anti-MET y composiciones**

30 Prioridad:

**16.09.2014 US 201462051190 P**

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

**16.03.2020**

73 Titular/es:

**SYMPHOGEN A/S (100.0%)**

**Pederstrupvej 93  
2750 Ballerup, DK**

72 Inventor/es:

**BOUQUIN, THOMAS;  
PEDERSEN, MIKKEL, WANDAHL;  
JACOBSEN, HELLE, JANE;  
POULSEN, THOMAS, TUXEN;  
GRANDAL, MICHAEL, MONRAD;  
KOEFOED, KLAUS;  
KRAGH, MICHAEL;  
ERIKSEN, KARSTEN, WESSEL y  
CONROTTO, PAOLO**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 748 295 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-MET y composiciones

### Campo de la Invención

5 Esta invención se refiere a anticuerpos anti-MET y composiciones de anticuerpos y sus usos para el tratamiento del cáncer.

### Antecedentes de la Invención

10 MET (también conocido como c-MET) es un receptor de tirosina quinasa que comprende una subunidad  $\alpha$  de 50 kDa y una subunidad  $\beta$  de 145 kDa. El único ligando conocido para MET es el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), que también se conoce como factor de dispersión. La unión de HGF a MET conduce a dimerización del receptor y autofosforilación de los residuos de subunidad  $\beta$  Y1349 y Y1356, que activan las vías de señalización en dirección 3' que incluyen la vía de fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)-proteína quinasa B (Akt), la vía del transductor de señal y activador del factor de transcripción (STAT), la vía de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), y la vía del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB). Esto conduce en última instancia al aumento de la mitogénesis, proliferación celular, supervivencia celular y motilidad celular. La desregulación de la actividad de MET o HGF puede ocurrir, por ejemplo, mediante sobreexpresión, amplificación génica, mutación o empalme alternativo de MET, o mediante señalización de bucle autocrino/paracrino inducida por ligando de HGF. Esa desregulación juega un papel en muchos cánceres facilitando la invasividad del cáncer, angiogénesis, metástasis y crecimiento tumoral, conduciendo así a un fenotipo de cáncer más agresivo y un peor pronóstico.

20 También se sabe que MET interactúa con las vías de señalización que implica otros receptores, tales como EGFR, TGF- $\beta$ , y HER3, y puede jugar un papel en la resistencia a los tratamientos dirigidos a esos receptores. Los inhibidores de MET, tales como anticuerpos anti-MET, por lo tanto pueden ser eficaces en combinación con otros inhibidores de receptores para superar los fenotipos resistentes.

25 Los inhibidores de MET actuales incluyen tanto anticuerpos monoclonales, que pueden ser dirigidos ya sea a MET o su ligando, HGF, e inhibidores de la quinasa de molécula pequeña. Los anticuerpos conocidos dirigidos a la vía MET incluyen el anticuerpo anti-MET humanizado onartuzumab (OA-5D5, OAM4558g, MetMAb); el anticuerpo anti-HGF humanizado ficlatuzumab (AV-299); el anticuerpo anti-HGF humano rilotumumab (AMG102); el anticuerpo anti-HGF humanizado TAK701; el anticuerpo IgG4 anti-c-MET humanizado LY2875358/LA480; el anticuerpo anti-c-MET humanizado ABT-700 (H224G11); y el anticuerpo anti-c-MET ARGX-111 (36C4). Los inhibidores del receptor de tirosina quinasa de molécula pequeña anti-MET conocidos incluyen tivantinib, cabozantinib, foretinib, golvatinib y crizotinib. Sin embargo, no se han aprobado anticuerpos anti-MET para uso terapéutico. Se han evaluado anticuerpos anti-met en varios modelos de xenoinjerto de ratón (documentos WO 2012/059562, WO 2010/059654, WO 2009/142738 y Van der Horst et al. (2009), Neoplasia 11(4):355-364). En ninguno de estos modelos se observó regresión tumoral.

30 En vista del papel fundamental de MET en la progresión del cáncer, hay una necesidad de nuevas y mejores terapias que se dirigen a MET.

### Sumario de la Invención

35 La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos recombinantes dirigidos a MET, así como composiciones que comprenden dos o más de estos anticuerpos, y el uso de los anticuerpos y composiciones para el tratamiento de cánceres incluyendo el cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, cáncer esofágico, cáncer colorrectal, carcinoma de células papilares de riñón, glioblastoma, carcinoma adrenocortical, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y otros cánceres que expresan o sobreexpresan MET o se basan en la activación de la vía MET. En comparación con los tratamientos actualmente disponibles para esos cánceres, incluyendo tratamientos de anticuerpos, se contempla que los anticuerpos de la invención proveen una respuesta clínica superior ya sea solos o en una composición que comprende dos o más de esos anticuerpos. La invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

45 Se describe en el presente documento una composición de anticuerpos que comprende un primer anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo y un segundo anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo.

50 El primer anticuerpo anti-MET puede competir por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24, 25 y 26, respectivamente, y el segundo anticuerpo anti-MET compete por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 27, 28, 29, 30, 31 y 32, respectivamente.

55 El primer anticuerpo anti-MET se puede unir al mismo epítipo de MET humano como un anticuerpo que tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24, 25 y 26, respectivamente, y el segundo anticuerpo anti-MET se une al mismo epítipo de MET

humano como un anticuerpo que tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 27, 28, 29, 30, 31 y 32, respectivamente. En algunas modalidades, el primer anticuerpo MET puede unirse a SEMA- $\alpha$  hoja 3, y el segundo anticuerpo MET puede unirse a SEMA- $\alpha$  hoja 2. Una combinación de estos anticuerpos se dirige a ambos epítomos y produce efectos inhibidores sinérgicos sorprendentes sobre la vía de señalización de MET. Los inventores de la presente han descubierto que el direccionamiento combinado de estos epítomos produce una actividad inhibidora sorprendentemente alta sobre la vía de señalización MET.

Tal como se describe en el presente documento, el primer anticuerpo anti-MET comprende una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23. Tal como se describe en el presente documento, el primer anticuerpo anti-MET comprende una H-CDR1, H-DR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 21, 22 y 23, respectivamente. Tal como se describe en el presente documento, el primer anticuerpo anti-MET comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que es por lo menos 90% idéntico en secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o 14. Tal como se describe en el presente documento, el primer anticuerpo anti-MET comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o 14. Tal como se describe en el presente documento, el primer anticuerpo anti-MET comprende una cadena pesada (HC) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34.

Tal como se describe en el presente documento, el primer anticuerpo anti-MET comprende una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. Tal como se describe en el presente documento, el primer anticuerpo anti-MET comprende una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, 25 y 26, respectivamente. Tal como se describe en el presente documento, el primer anticuerpo anti-MET comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que es por lo menos 90% idéntico en secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o 16. Tal como se describe en el presente documento, el primer anticuerpo anti-MET comprende un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o 16. Tal como se describe en el presente documento, el primer anticuerpo anti-MET comprende una cadena ligera (LC) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33.

Tal como se describe en el presente documento, el primer anticuerpo anti-MET comprende una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. En la invención, el primer anticuerpo anti-MET comprende una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, 25 y 26, respectivamente. En algunas modalidades, el primer anticuerpo anti-MET comprende un VH que es por lo menos 90% idéntico en secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o 14 y un VL que es por lo menos 90% idéntico en secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o 16. En algunas modalidades, el primer anticuerpo anti-MET comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o 14 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o 16. En algunas modalidades, el primer anticuerpo anti-MET comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, el primer anticuerpo anti-MET comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. En algunas modalidades, el primer anticuerpo anti-MET comprende una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33.

Tal como se describe en el presente documento, el segundo anticuerpo anti-MET comprende una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29. Tal como se describe en el presente documento, el segundo anticuerpo anti-MET comprende una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 27, 28 y 29, respectivamente. Tal como se describe en el presente documento, el segundo anticuerpo anti-MET comprende un VH que es por lo menos 90% idéntico en secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 18. Tal como se describe en el presente documento, el segundo anticuerpo anti-MET comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 18. Tal como se describe en el presente documento, el segundo anticuerpo anti-MET comprende una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

Tal como se describe en el presente documento, el segundo anticuerpo anti-MET comprende una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. Tal como se describe en el presente documento, el segundo anticuerpo anti-MET comprende una L-CDR1, L-CDR2 Y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 30, 31 y 32, respectivamente. Tal como se describe en el presente documento, el segundo anticuerpo anti-MET comprende un VL que es por lo menos 90% idéntico en secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o 20. Tal como se describe en el presente documento, el segundo anticuerpo anti-MET comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o 20. Tal como se describe en el presente documento, el segundo anticuerpo anti-MET comprende una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

Tal como se describe en el presente documento, el segundo anticuerpo anti-MET comprende una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. En la invención, el segundo anticuerpo anti-MET comprende una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 27, 28, 29, 30, 31

5 y 32, respectivamente. En algunas modalidades, el segundo anticuerpo anti-MET comprende un VH que es por lo menos 90% idéntico en secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 18 y un VL que es por lo menos 90% idéntico en secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o 20. En algunas modalidades, el segundo anticuerpo anti-MET comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 18 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o 20. En algunas modalidades, el segundo anticuerpo anti-MET comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En algunas modalidades, el segundo anticuerpo anti-MET comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, el segundo anticuerpo anti-MET comprende una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

Las composiciones de anticuerpos que comprenden cualquier combinación del primer y segundo anticuerpos anti-MET también se describen en este documento.

15 Tal como se describe en el presente documento, el primer anticuerpo anti-MET tiene una H-CDR3 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 23 y 26, respectivamente, y el segundo anticuerpo anti-MET tiene una H-CDR3 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 29 y 32, respectivamente. En la invención, el primer anticuerpo anti-MET tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3 y L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24, 25 y 26, respectivamente, y el segundo anticuerpo anti-MET tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3 y L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 27, 28, 29, 30, 31 y 32, respectivamente.

25 En algunas modalidades, el VH y VL del primer anticuerpo anti-MET son por lo menos 90% idénticos en secuencia a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 6 y 8, respectivamente, y el VH y VL del segundo anticuerpo anti-MET son por lo menos 90% idénticos en secuencia a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 10 y 12, respectivamente. En algunas modalidades, el VH y VL del primer anticuerpo anti-MET son por lo menos 90% idénticos en secuencia a las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 14 y 16, respectivamente, y el VH y VL del segundo anticuerpo anti-MET por lo menos 90% idénticos en secuencia a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 18 y 20, respectivamente. En algunas modalidades, el VH y VL del primer anticuerpo anti-MET comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 8, respectivamente, y el VH y VL del segundo anticuerpo anti-MET comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 10 y 12, respectivamente. En algunas modalidades, el VH y VL del primer anticuerpo anti-MET comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y 16, respectivamente, y el VH y VL del segundo anticuerpo anti-MET comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 18 y 20, respectivamente. En algunas modalidades, el HC y LC del primer anticuerpo anti-MET comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y 33, respectivamente, y el HC y LC del segundo anticuerpo anti-MET comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 36 y 35, respectivamente.

35 En algunas modalidades de las composiciones de anticuerpos anti-MET descritos en este documento, el primer anticuerpo anti-MET, el segundo anticuerpo anti-MET, o ambos, son de isotipo IgG. En ciertas modalidades, el primer anticuerpo anti-MET, el segundo anticuerpo anti-MET, o ambos, son de la subclase de isotipo IgG1.

40 En algunas modalidades, por lo menos uno, por lo menos dos, o todos de los anticuerpos anti-MET en una composición descrita en la presente memoria inhiben el crecimiento tumoral *in vivo* y preden, además, tener por lo menos una propiedad, o cualquier combinación de propiedades, seleccionadas del grupo constituido por:

- no se une a MET de ratón o de pollo;
- se une a un epítipo de MET humano que comprende residuos que están presentes en el dominio SEMA;
- induce la degradación del MET;
- se une a MET humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-9}$  M o menos;

45 • inhibe el crecimiento *in vitro* de por lo menos una línea celular seleccionada de SNU5, EBC1, MKN45, Kat5, OE33 y Okajima;

- inhibe la fosforilación de MET;
- inhibe la señalización en dirección 3' de MET; e
- inhibe la proliferación de células endoteliales primarias en presencia o ausencia de HGF.

50 En algunas modalidades, cualquiera de las composiciones de anticuerpos anti-MET descritos en este documento inhiben el crecimiento tumoral *in vivo* y preden, además, tener por lo menos una propiedad, o cualquier combinación de propiedades, seleccionadas del grupo constituido por:

- induce la degradación del MET;

- inhibe el crecimiento *in vitro* de por lo menos una línea celular seleccionada de SNU5, EBC1, MKN45, Katoll, OE33 y Okajima;
- inhibe la fosforilación de MET;
- inhibe la señalización en dirección 3' de MET; e

5 • inhibe la proliferación de células endoteliales primarias en presencia o ausencia de HGF.

La presente invención también provee una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las composiciones de anticuerpos anti-MET descritos en este documento y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 La presente invención también provee un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo o porción puede competir por la unión a MET humano con un anticuerpo cuyas H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24, 25 y 26, respectivamente. El anticuerpo o porción puede competir por la unión a MET humano con un anticuerpo cuyas H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NOs: 27, 28, 29, 30, 31 y 32, respectivamente.

15 El anticuerpo o porción se puede unir al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo cuyas H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24, 25 y 26, respectivamente. El anticuerpo o porción se puede unir al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo, cuyas H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31 y 32, respectivamente.

20 Tal como se describe en el presente documento, el anticuerpo comprende una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y/o una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22 y 23, respectivamente y/o una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 24, 25 y 26, respectivamente, un VH con una identidad de secuencia de por lo menos 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o 14 y/o un VL con una identidad de secuencia de por lo menos 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o 16; o un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o 14 y/o un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o 16. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33.

25 Tal como se describe en el presente documento, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22 y 23, respectivamente; un VH con por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o 14; un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o 14; o una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; y que comprende además una cadena ligera que comprende una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 24, 25 y 26, respectivamente; un VL con por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o 16; un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o 16; o una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33.

30 Tal como se describe en el presente documento, el anticuerpo comprende una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y/o una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 27, 28 y 29, respectivamente y/o una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 30, 31 y 32, respectivamente; un VH con por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 18; y/o un VL con por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o 20; o un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 18 y/o un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o 20. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

35 Tal como se describe en el presente documento, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 27, 28 y 29, respectivamente; un VH con por lo menos

- 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 18; un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 18; o una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; y comprende además una cadena ligera que comprende una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, 31 y 32, respectivamente; un VL con por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o 20; un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o 20; o una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.
- 5 En la invención, el anticuerpo tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24, 25 y 26, respectivamente.
- 10 En la invención, el anticuerpo tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 27, 28, 29, 30, 31 y 32, respectivamente.
- En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un dominio variable de cadena pesada (VH) con por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o 14 y un dominio variable de cadena ligera (VL) con por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o 16.
- 15 En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un dominio variable de cadena pesada (VH) con por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 18 y un dominio variable de cadena ligera (VL) con por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o 20.
- En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
- 20 En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.
- En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.
- 25 En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
- 30 En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una cadena pesada (HC) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera (LC) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33.
- En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una cadena pesada (HC) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera (LC) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.
- 35 La invención también provee versiones humanizadas de anticuerpos quiméricos y porciones de unión a antígeno aquí descritas, en particular los anticuerpos y porciones de unión a antígeno con secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera en relación con SEQ ID NOs: 6 y 8, respectivamente, o SEQ ID NOs: 10 y 12, respectivamente.
- En algunas modalidades de los anticuerpos y porciones de unión a antígeno que se describen en el presente documento, el anticuerpo puede ser de isotipo IgG. En ciertas modalidades, el anticuerpo es de la subclase de isotipos IgG1.
- 40 En algunas modalidades, el anticuerpo inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* y puede, además, tener por lo menos una propiedad, o cualquier combinación de propiedades, seleccionada del grupo constituido por:
- no se une a MET de ratón o de pollo;
  - se une a un epítipo de MET humano que comprende residuos que están presentes en el dominio SEMA;
  - induce la degradación de MET;
- 45
- se une a MET humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-9}$  M o menos;
  - inhibe el crecimiento *in vitro* de por lo menos una línea celular seleccionada de SNU5, EBC1, MKN45, Katoll, OE33 y Okajima;
  - inhibe la fosforilación de MET;
  - inhibe la señalización en dirección 3' de MET; e

- inhibe la proliferación de células endoteliales primarias en presencia o ausencia de HGF.

La presente invención también provee una composición farmacéutica que comprende ambos de los anticuerpos anti-MET o porciones de unión a antígeno de los mismos descritos en este documento y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 También se describe en el presente documento una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno del mismo, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno del mismo, o ambos, de un anticuerpo anti-MET descrito en el presente documento. La molécula de ácido nucleico aislada puede comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 o 19.

10 La presente invención también provee un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada, en donde el vector comprende además una secuencia de control de expresión.

También se describe en el presente documento una célula hospedera que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno de la misma, o ambos, de un anticuerpo anti-MET descrito en el presente documento. La célula hospedera comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 o 19.

También se describe en el presente documento un animal transgénico no humano o planta que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno de la misma, o ambos, de un anticuerpo anti-MET descrito en el presente documento, en donde el animal o planta expresa la secuencia o secuencias de nucleótidos. El animal o planta puede comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 o 19.

La presente invención también provee un método para producir un anticuerpo anti-MET o parte de unión a antígeno del mismo descrito en este documento, que comprende proveer la célula hospedera descrita anteriormente, cultivar la célula hospedera en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo o porción, y aislar el anticuerpo o porción resultante.

La presente invención también provee un método para producir una composición de anticuerpos anti-MET descrita en este documento, que comprende proveer una primera célula hospedera capaz de expresar un primer anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno como se describe en este documento y una segunda célula hospedera capaz de expresar un segundo anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno como se describe en este documento, cultivar la primera y segunda células hospederas en condiciones adecuadas para la expresión de los anticuerpos o porciones, y aislar los anticuerpos o porciones resultantes. En ciertas modalidades, la primera y segunda células hospederas se cultivan en un biorreactor único. En otras modalidades, la primera y segunda células hospederas se cultivan en biorreactores separados.

35 La presente invención también provee una línea celular policlonal capaz de expresar una composición de anticuerpos anti-MET, en donde la línea celular policlonal comprende una primera célula hospedera capaz de expresar un primer anticuerpo anti-MET o parte de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento y una segunda célula hospedera capaz de expresar un segundo anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo como se describe en este documento.

40 La presente invención también provee una molécula de unión biespecífica que tiene las especificidades de unión del primer y segundo anticuerpos anti-MET o porciones de unión a antígeno de los mismos de una composición de anticuerpos anti-MET se describe aquí. En ciertas modalidades, la molécula de unión biespecífica comprende una porción de unión a antígeno de un anticuerpo cuyas H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nos: 21, 22, 23, 24, 25 y 26, respectivamente; y una porción de unión a antígeno de un anticuerpo cuyas H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nos: 27, 28, 29, 30, 31 y 32, respectivamente.

También se describe en el presente documento un uso de la composición de anticuerpos anti-MET como se describe en el presente documento o la composición farmacéutica que comprende la composición de anticuerpos anti-MET para tratar a un paciente con un trastorno mediado por MET.

50 También se describe en el presente documento un uso de anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno como se describe en el presente documento o la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno para tratar a un paciente con un trastorno mediado por MET.

La presente invención también provee una composición de anticuerpos anti-MET como se describe en el presente documento o una composición farmacéutica que comprende la composición de anticuerpos anti-MET para uso en el tratamiento contra el cáncer. En algunas modalidades, el cáncer depende de la activación de MET. El cáncer puede ser cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, cáncer de esófago, cáncer

colorrectal, cáncer de células papilares de riñón, glioblastoma, carcinoma de células renales, cáncer de próstata o carcinoma adrenocortical.

La presente invención también provee un anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno como se describe en el presente documento o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno para uso en el tratamiento contra el cáncer. También se describe en el presente documento los usos de un anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno como se describe en el presente documento o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer. En algunas modalidades, el cáncer depende de la activación MET. El cáncer puede ser cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de células papilares de riñón, glioblastoma, carcinoma de células renales, cáncer de próstata o carcinoma adrenocortical. El uso médico puede comprender también la administración de un agente quimioterapéutico, un agente antineoplásico, un agente antiangiogénico, un inhibidor de tirosina quinasa u otro inhibidor de la vía MET.

En algunos de los usos médicos descritos en el presente documento, el paciente es un mamífero. El paciente puede ser un primate. En modalidades particulares, el paciente es un ser humano.

### **Breve Descripción de los Dibujos**

La figura 1 muestra una matriz de competencia por trece anticuerpos de MET probados unos contra otros. Una inhibición de por lo menos 50% se usó para diferenciar pre-clasificadores de epítipo (cuadros grises). Cuadros punteados: competencia unidireccional. Cuadros enmarcados negros: competencia con anticuerpos idénticos.

La figura 2 muestra un resumen de la unión de anticuerpos de MET para diferentes constructos de MET humanos, de ratón, de pollo y quiméricos expresados en células HEK293. Los números de secuencia de aminoácidos (AA) se refieren a la secuencia de MET humano que fue intercambiada ya sea a la de pollo o de ratón. Se muestran ilustraciones esquemáticas de los diferentes constructos. Los dominios o subdominios individuales se indican. SP: péptido señal. SV5-GPI: secuencia del péptido SV5 seguido de enlazador de glicina-serina y anclaje de GPI. Cabe notar que la ilustración de la ubicación de las mutaciones es aproximada. Cuadros blancos: secuencia de MET humano. Cuadros grises: la secuencia de pollo. Cuadros rayados: secuencia de ratón. La unión positiva a las células transfectadas se indica como +. La unión débil, como (+). Sin unión como -.

La figura 3 muestra los resultados de un análisis Western Blot de los niveles del receptor de MET en líneas celulares tratadas con el anticuerpo de control negativo, 9006, 9338 o 9006+9338 durante 24 o 48 horas.

La figura 4 muestra los resultados de un análisis Western simple de los niveles de MET en líneas celulares tratadas con el anticuerpo de control negativo, 9006+9338, o el anticuerpo C8-H241 durante 24 horas.

Las figuras 5A-5B muestran un análisis Western simple de los niveles de fosforilación de MET en las líneas de células tratadas con anticuerpos quiméricos 9006 o 9338, o la mezcla de anticuerpos 9006+9338.

Las figuras 6A-6B muestran un análisis Western simple de los niveles de fosforilación de AKT y ERK2 en líneas de células tratadas con anticuerpos quiméricos 9006 o 9338 o la mezcla de anticuerpos 9006+9338.

La figura 7A muestra el número de HUVECs después del tratamiento con anticuerpo quimérico 9006 o 9338, la mezcla de anticuerpos 9006+9338, o un anticuerpo de control. Se usa 25 µg/ml de anticuerpo total (tanto individualmente como en la mezcla de anticuerpos). La figura 7B ilustra los resultados del ensayo en el punto de tiempo final de 404 horas de incubación. Los datos se normalizaron a las células no tratadas (100%).

La figura 8A muestra el número de HUVECs después del tratamiento con anticuerpo quimérico 9006 o 9338, la mezcla de anticuerpos 9006+9338, o un anticuerpo de control, en presencia de HGF a 20 ng/ml. Se usa 25 µg/ml de anticuerpo total (tanto individualmente como en la mezcla de anticuerpos). La figura 8B representa los resultados del ensayo en el punto de tiempo final de 404 horas de incubación/estimulación con HGF. Los datos se normalizaron a las células no tratadas (100%).

Las figuras 9A-9B muestran curvas de titulación de la cantidad de HUVECs después del tratamiento con cantidades variables de anticuerpos quiméricos 9338 y 9006 (A y B, respectivamente).

La figura 10 muestra las curvas de valoración del número de HUVECs después del tratamiento con cantidades variables de la mezcla de anticuerpos 9006+9338.

La figura 11 ilustra los resultados en el punto de tiempo final de las Figuras 9 y 10. Los datos se normalizan a las células no tratadas.

Las figuras 12A-12C muestran los resultados de un ensayo de actividad metabólica que indica el efecto antiproliferativo de quimérico (panel izquierdo) o humanizado (panel derecho) 9006, 9338 o 9006+9338 sobre las líneas celulares HCC827R1\_cet#3 (12A), HCC827R1\_cet#1 (12B) y MKN45 (12C).

Las figuras 13A-13C muestran los resultados de un ensayo de actividad metabólica que indica el efecto antiproliferativo

de quimérico (panel izquierdo) o humanizado (panel derecho) 9006, 9338 o 9006+9338 sobre las líneas celulares EBC-1 (13A), Katoll (13B) y Okajima (13C).

La figura 14 muestra los resultados de viabilidad de las titulaciones de los anticuerpos Hu9338+Hu9006, 13-MET, 28-MET y 13-MET +28-MET en las líneas celulares EBC1, MKN45, SNU5 y Katoll.

5 La figura 15 muestra el efecto del tratamiento con 9006, 9338, 9006+9338, o vehículo quimérico sobre el crecimiento tumoral de xenoinjertos de la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas humanas EBC-1 en ratones. El área gris indica el período de tratamiento.

10 La figura 16 muestra el efecto del tratamiento con quimérico 9006+9338 en cuatro concentraciones diferentes en comparación con el tratamiento con vehículo sobre el crecimiento tumoral de xenoinjertos de la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas humanas EBC-1 en ratones. El área gris indica el período de tratamiento.

La figura 17 muestra el efecto del tratamiento con 9006, 9338, 9006+9338, o vehículo quimérico sobre el crecimiento tumoral de xenoinjertos de la línea celular de cáncer gástrico humano MKN-45 en ratones. El área gris indica el período de tratamiento.

15 La figura 18 muestra el efecto del tratamiento con quimérico 9006, 9338, 9006+9338, o vehículo sobre el crecimiento tumoral de xenoinjertos de la línea celular de cáncer gástrico humano SNU5 en ratones. El área gris indica el período de tratamiento.

La figura 19 muestra el efecto del tratamiento con mezcla de anticuerpos quiméricos 9006+9338 o vehículo sobre el crecimiento tumoral de xenoinjertos del modelo de xenoinjerto LI1037 derivado de paciente con HCC humano en ratones. El área gris indica el período de tratamiento.

20 La figura 20 muestra el efecto de 9006+9338, Hu9006+Hu9338 o tratamiento con vehículo sobre el crecimiento tumoral de xenoinjertos de la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas humanas EBC-1. El área gris indica el período de tratamiento.

25 La figura 21 muestra el efecto del tratamiento con quimérico 9006+9338, 9006+9338 humanizado (Hu9006+Hu9338), o vehículo sobre el crecimiento de tumores de xenoinjertos de la línea celular de cáncer de esófago-gástrica humana OE33. El área gris indica el período de tratamiento.

La figura 22 muestra el efecto del tratamiento con C8-H241, Hu9006+Hu9338 o vehículo sobre el crecimiento tumoral de xenoinjertos de la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas humanas EBC-1 (n = 10 ratones por grupo). Las áreas grises indican los períodos de tratamiento. Línea de puntos marca el inicio de un nuevo tratamiento de los ratones restantes (n = 4) en el grupo tratado con C8-H241 Hu9006+Hu9338.

30 La figura 23 muestra el efecto del tratamiento con C8-H241, Hu9006, Hu9338, Hu9006+Hu9338 o vehículo sobre el crecimiento tumoral de xenoinjertos de la línea celular de cáncer gástrico humano Hs746T (n = 8 ratones por grupo). El área gris indica el período de tratamiento inicial. La línea punteada indica el re-tratamiento de dosis única con Hu9006+Hu9338 de ratones restantes en los grupos C8-H241, Hu9006 y Hu9338.

35 La figura 24 muestra el efecto del tratamiento con C8-H241, Hu9006+Hu9338 o vehículo sobre el crecimiento del tumor en cuatro modelos de xenoinjerto derivado de pacientes (n = 5 ratones por grupo para LU0858, L1901 y LU2503; n = 8 ratones por grupo para LXFA0526). El área gris denota el período de tratamiento.

La figura 25 muestra el efecto de proporciones equilibradas o sesgadas de Hu9006+Hu9338 o vehículo sobre el crecimiento de tumores de xenoinjertos de la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano EBC-1 (n = 8 ratones por grupo). El área gris indica el período de tratamiento.

40 La figura 26 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de dominio variable de cadenas pesada y ligera del anticuerpo quimérico 9006 (SEQ ID NOS: 5-8). Las CDRs (SEQ ID NOS: 21-26) están marcadas por flechas.

La figura 27 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de dominio variable de cadenas pesada y ligera del anticuerpo quimérico 9338 (SEQ ID NOS: 9-12). Las CDRs (SEQ ID NOS: 27-32) están marcadas por flechas.

45 La figura 28 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de dominio variable de cadenas pesada y ligera del anticuerpo humanizado 9006 (SEQ ID NOS: 13-16). Las CDRs están marcadas por las flechas (SEQ ID NOS: 21-26).

La figura 29 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de dominio variable de cadenas pesada y ligera del anticuerpo humanizado 9338 (SEQ ID NOS: 17-20). Las CDRs (SEQ ID NOS: 27-32) están marcadas por flechas.

50 La figura 30 muestra las secuencias de aminoácidos de cadenas pesada y ligera completas del anticuerpo humanizado 9006 (SEQ ID NOS: 33 y 34, respectivamente) y el anticuerpo humanizado 9338 (SEQ ID NOS: 35 y 36, respectivamente). Las CDRs están marcadas por flechas.

La figura 31 muestra la estructura de MET.

### Descripción Detallada de la Invención

#### Definiciones y técnicas generales

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que son entendidos comúnmente por los expertos en la técnica. Métodos y materiales ilustrativos se describen a continuación. En caso de conflicto, se optará por lo que dicte la presente especificación, incluyendo las definiciones. Aunque un número de documentos se citan en el presente documento, esta cita no constituye una admisión de que cualquiera de estos documentos forma parte del conocimiento general común en la técnica.

Además, a menos que sea requerido por el contexto, los términos singulares incluirán el plural y los términos en plural incluirán el singular. En general, la nomenclatura usada en relación con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química analítica, química orgánica sintética, química medicinal y farmacéutica, y química de proteínas y de ácidos nucleicos e hibridación descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante, como comúnmente se logra en la técnica o como se describe en el presente documento.

A lo largo de esta especificación y modalidades, las palabras “tienen” y “comprenden”, o variaciones tales como “tiene”, “que tiene”, “comprende” o “que comprende” se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros determinados pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

#### Definiciones relacionadas con anticuerpos

A menos que se indique lo contrario, como se usa en este documento, “MET” se refiere a MET humano (también conocido como c-MET humano). Una secuencia de polipéptido MET humano está disponible bajo el No. de Acceso a NCBI NM\_000245.2, mostrado aquí como SEQ ID NO: 1. A menos que se especifique lo contrario, “MET humano” se refiere a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. MET humano también existe en una isoforma diferente (isoforma 2; SEQ ID NO: 2) en la cual 19 aminoácidos se insertan en dominio de IPT 3 (755 a 755: S → STWWKEPLNIVSFLFCFAS (SEQ ID NO: 2)).

El término “anticuerpo” (Ab) o “inmunoglobulina” (Ig), tal como se usa en el presente documento, se refiere a un tetrámero que comprende dos cadenas pesadas (H) (aproximadamente 50-70 kDa) y dos cadenas ligeras (L) (aproximadamente 25 kDa) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta de un dominio variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH). Cada cadena ligera está compuesta de un dominio variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). Los dominios VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas “regiones determinantes de complementariedad” (CDRs), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas “regiones de marco” (FRs). Cada VH y VL está compuesta por tres CDRs (H-CDR en el presente documento designa una CDR de la cadena pesada; y L-CDR en el presente documento designa una CDR de la cadena ligera) y cuatro FRs, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La asignación de aminoácidos a cada región puede estar de acuerdo con definiciones de IMGTT® (Lefranc et al., *Dev Comp Immunol* 27 (1): 55-77 (2003), o las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 y 1991)); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987), o Chothia et al., *Nature* 342: 878-883 (1989).

El término “anticuerpo recombinante” se refiere a un anticuerpo que se expresa a partir de una línea celular o célula que comprende la(s) secuencia(s) de nucleótidos que codifican el anticuerpo, en donde la(s) secuencia(s) de nucleótidos no se asocia(n) naturalmente con la célula.

El término “composición de anticuerpos” se refiere a una combinación de dos o más anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos. Una composición de anticuerpos puede ser monoclonal (es decir, que consta de anticuerpos idénticos o moléculas de la porción de unión a antígeno) o policlonales (es decir, que consta de dos o más diferentes anticuerpos o porciones de unión a antígeno que reaccionan con los mismos o diferentes epítopos en el mismo antígeno o incluso sobre distintos, antígenos diferentes).

El término “proteína aislada”, “péptido aislado” o “anticuerpo aislado” se refiere a una proteína, polipéptido o anticuerpo que en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no está asociado con componentes asociados que de manera natural lo acompañan en su estado nativo, (2) está libre de otras proteínas de la misma especie, (3) es expresado por una célula de una especie diferente, o (4) no ocurre en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que es sintetizado químicamente o que es sintetizado en un sistema celular diferente de la célula de la cual se origina de forma natural será “aislado” a partir de sus componentes asociados de forma natural. Una proteína también puede volverse sustancialmente libre de componentes asociados de manera natural por aislamiento, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica.

Como se usa en este documento, el término “línea germinal” se refiere a las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los genes de anticuerpos y los segmentos de genes, a medida que son transmitidos de padres a hijos a través de las

5 células germinales. Las secuencias de la línea germinal se distinguen de las secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos en células B maduras, que han sido alterados por los eventos de recombinación e hipermutación en el transcurso de la maduración de células B. Un anticuerpo que “utiliza” una secuencia de línea germinal particular tiene una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos que se alinea con la secuencia de línea germinal de nucleótidos o con la secuencia de aminoácidos que especifica más de cerca que con cualquier otra secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de la línea germinal.

10 El término “afinidad” se refiere a una medida de la atracción entre un antígeno y un anticuerpo. El atractivo intrínseco del anticuerpo para el antígeno se expresa normalmente como el de unión constante de afinidad de equilibrio ( $K_D$ ) de una interacción particular anticuerpo-antígeno. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la  $K_D$  es  $\leq 1$  mM, preferiblemente  $\leq 100$  nM. Una constante de afinidad de unión  $K_D$  se puede medir, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón superficial (BIAcore™) o interferometría de bio-capa, por ejemplo usando el sistema Octet™.

El término “ $K_{dis}$ ” se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno. Una constante de velocidad de disociación  $K_{dis}$  se puede medir por interferometría de bio-capa, por ejemplo usando el sistema Octet™ o por resonancia de plasmón superficial (BIAcore™).

15 El término “epítopo”, como se usa en este documento, se refiere a una porción (determinante) de un antígeno que se une específicamente a un anticuerpo o una molécula relacionada tal como una molécula de unión biespecífica. Los determinantes epitópicos consisten generalmente de agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o carbohidratos o cadenas laterales de azúcares y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un epítopo puede ser “lineal” o “conformacional”. En un epítopo lineal, todos los puntos de interacción entre una proteína (por ejemplo, un antígeno) y una molécula de interacción (tal como un anticuerpo) se producen linealmente a lo largo de la primaria secuencia de aminoácidos de la proteína. En un epítopo conformacional, los puntos de interacción se producen a través de residuos de aminoácidos en la proteína que están separados unos de otros en la secuencia primaria de aminoácidos. Una vez que se determina un epítopo en un antígeno deseado, es posible generar anticuerpos para ese epítopo usando técnicas bien conocidas en la técnica. Además, la generación y caracterización de anticuerpos pueden dilucidar información acerca de epítopos deseables. A partir de esta información, es posible entonces detectar competitivamente anticuerpos por la unión a los mismos o similares epítopos, por ejemplo, al realizar estudios de competencia para encontrar anticuerpos que compiten por la unión al antígeno.

20 Se puede determinar si un anticuerpo se une al mismo epítopo o compete en forma cruzada por la unión con un anticuerpo anti-MET mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se permite que el anticuerpo anti-MET de la invención se una a MET bajo condiciones de saturación y luego se mide la capacidad del anticuerpo de prueba para unirse a MET. Si el anticuerpo de prueba es capaz de unirse a MET, al mismo tiempo que el anticuerpo de referencia anti-MET, entonces el anticuerpo de prueba se une a un epítopo diferente que el anticuerpo de referencia anti-MET. Sin embargo, si el anticuerpo de prueba no es capaz de unirse a MET, al mismo tiempo, entonces el anticuerpo de prueba se une al mismo epítopo, un epítopo de solapamiento, o un epítopo que se encuentra en las proximidades del epítopo unido por el anticuerpo anti-MET de la invención. Este experimento se puede realizar usando ELISA, RIA, BIAcore™, interferometría de bio-capa o citometría de flujo. Para probar si un anticuerpo anti-MET compete en forma cruzada con otro anticuerpo anti-MET, se puede usar el método de competencia descrito anteriormente en dos direcciones, es decir, determinar si el anticuerpo conocido bloquea el anticuerpo de prueba y viceversa. En un aspecto preferido de la divulgación, el experimento se realiza usando Octet™.

25 El término “anticuerpo quimérico” se refiere en su sentido más amplio a un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de uno o más de otros anticuerpos, normalmente un anticuerpo que es parcialmente de origen humano y parcialmente de origen no humano, es decir, derivado en parte de un animal no humano, por ejemplo un ratón, rata u otro roedor, o un ave tal como un pollo. Los anticuerpos quiméricos son preferibles a los anticuerpos no humanos con el fin de reducir el riesgo de una respuesta anti-anticuerpo humano, por ejemplo, una respuesta de anticuerpo anti-ratón humano en el caso de un anticuerpo de murino. Un ejemplo de un anticuerpo quimérico típico es uno en el cual las secuencias de región variable son de murino mientras que las secuencias de la región constante son de humano. En el caso de un anticuerpo quimérico, las partes no humanas pueden ser sometidas a una alteración adicional con el fin de humanizar el anticuerpo. Los anticuerpos quiméricos que se describen en este documento tienen secuencias de dominio variable de murino y secuencias de dominios constantes de humano.

30 El término “humanizar” se refiere al hecho de que, cuando un anticuerpo es totalmente o parcialmente de origen no humano, por ejemplo un anticuerpo de murino obtenido a partir de la inmunización de ratones con un antígeno de interés o un anticuerpo quimérico con base en el anticuerpo de murino, es posible reemplazar ciertos aminoácidos, en particular en las regiones de marco y los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera, con el fin de evitar o reducir al mínimo una respuesta inmunitaria en seres humanos. La especificidad de una interacción del anticuerpo con un antígeno objetivo radica principalmente en los residuos de aminoácidos situados en las seis CDRs de las cadenas pesada y ligera. Las secuencias de aminoácidos dentro de las CDRs son por lo tanto mucho más variables entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDRs. Debido a que las secuencias de CDRs son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que simulan las propiedades de un anticuerpo de origen natural específico, o en forma más general cualquier anticuerpo específico con una determinada secuencia de aminoácidos, por ejemplo, mediante la construcción de vectores de

expresión que expresan secuencias de CDR procedentes del anticuerpo específico injertado en secuencias de marco de un anticuerpo diferente. Como resultado, es posible “humanizar” un anticuerpo no humano y todavía mantener sustancialmente la especificidad de unión y afinidad del anticuerpo original. Aunque no es posible predecir con precisión la inmunogenicidad y de esta manera la respuesta anti-anticuerpo humano de un anticuerpo particular, los anticuerpos no humanos tienden a ser más inmunogénicos que los anticuerpos humanos. Los anticuerpos quiméricos, en los que las regiones constantes extrañas (por lo general de roedores) han sido reemplazadas por secuencias de origen humano, se ha mostrado que son generalmente menos inmunogénicos que los anticuerpos de origen totalmente extraños, y la tendencia de los anticuerpos terapéuticos es hacia los anticuerpos humanizados o completamente humanos. Los anticuerpos quiméricos u otros anticuerpos de origen no humano por lo tanto pueden humanizarse para reducir el riesgo de una respuesta anti-anticuerpo humano.

Para los anticuerpos quiméricos, la humanización normalmente implica la modificación de las regiones de marco de las secuencias de región variable. Los residuos de aminoácidos que forman parte de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) más a menudo no serán alterados en relación con la humanización, aunque en ciertos casos, puede ser deseable alterar residuos de aminoácidos de CDR individuales, por ejemplo para eliminar un sitio de glicosilación, un sitio de desamidación, un sitio de isomerización de aspartato o un residuo de cisteína o metionina no deseado. La glicosilación ligada a N se produce mediante la unión de una cadena de oligosacárido a un residuo de asparagina en la secuencia de tripéptido Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro. La eliminación de un sitio de N-glicosilación se puede lograr mediante la mutación ya sea del residuo Asn o el residuo Ser/Thr a un residuo diferente, preferiblemente por medio de sustitución conservativa. La desamidación de residuos de asparagina y glutamina puede ocurrir dependiendo de factores tales como el pH y la exposición de la superficie. Los residuos de asparagina son particularmente susceptibles a la desamidación, principalmente cuando están presentes en la secuencia Asn-Gly, y en menor medida en otras secuencias de dipéptidos tales como Asn-Ala. Cuando ese sitio de desamidación, en particular Asn-Gly, está presente en una secuencia de CDR, por lo tanto puede ser deseable remover el sitio, normalmente mediante sustitución conservativa para remover uno de los residuos implicados.

Se conocen en la técnica numerosos métodos para la humanización de una secuencia de anticuerpo; véase, por ejemplo, la revisión por parte de Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13: 1619-1633 (2008). Un método usado comúnmente es injertar CDR, que, por ejemplo, para un anticuerpo quimérico derivado de murino implica la identificación de las contrapartes de genes de línea germinal humana a los genes de región variable de murino e injertar las secuencias de CDR de murino en este marco. El injerto de CDR se puede basar en las definiciones de Kabat de CDR, aunque una publicación más reciente (Magdelaine-Beuzelin et al., *Crit Rev. Oncol Hematol.* 64:210-225 (2007)) ha sugerido que la definición IMGT® (the international ImMunoGeneTics information system®, www.imgt.org) puede mejorar el resultado de la humanización (ver Lefranc et al., *Dev Comp Immunol.* 27:55-77 (2003)). En algunos casos, el injerto de CDR puede reducir la especificidad de unión y afinidad, y por lo tanto la actividad biológica, de un anticuerpo no humano injertado con CDR, en comparación con el anticuerpo progenitor del cual se obtienen las CDRs. Mutaciones de retroceso (a veces referidas como “reparación de marco”) pueden ser introducidas en las posiciones seleccionadas del anticuerpo injertado con CDR, normalmente en las regiones de marco, con el fin de restablecer la especificidad de unión y afinidad del anticuerpo progenitor. La identificación de posiciones para posibles mutaciones de retroceso se puede realizar usando la información disponible en la literatura y en las bases de datos de anticuerpos. Los residuos de aminoácidos que son candidatos para mutaciones de retroceso son generalmente aquellos que se encuentran en la superficie de una molécula de anticuerpo, mientras que los residuos que están enterrados o que tienen un bajo grado de exposición en la superficie normalmente no son alterados. Una técnica de humanización alternativa al injerto de CDR y la retromutación es la re-superficialización, en la cual los residuos no expuestos en la superficie de origen no humano son conservados, mientras que residuos en la superficie son alterados a los residuos humanos.

En ciertos casos, puede ser también deseable alterar uno o más residuos de aminoácidos de CDR con el fin de mejorar la afinidad de unión al epítipo objetivo. Esto se conoce como “maduración de afinidad” y opcionalmente se puede realizar en relación con la humanización, por ejemplo, en situaciones en las que la humanización de un anticuerpo conduce a la reducción de la especificidad de unión o afinidad y no es posible mejorar suficientemente la especificidad de unión o afinidad por las mutaciones de retroceso solas. Diversos métodos de maduración de afinidad son conocidos en la técnica, por ejemplo el método de mutagénesis de saturación de exploración *in vitro* descrito por Burks et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 412-417 (1997), y el método de afinidad de maduración paso a paso *in vitro* de Wu et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 6037-6042 (1998).

El término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “porción de unión”), como se usa en el presente documento, se refiere a una o más partes o fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, MET humano, o una parte del mismo). Se ha demostrado que ciertos fragmentos de un anticuerpo de longitud completa pueden realizar la función de unión a antígeno del anticuerpo. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “porción de unión a antígeno” incluyen (i) un fragmento Fab: un fragmento monovalente constituido por los dominios V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> y C<sub>H1</sub>; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>: un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento F<sub>d</sub> constituido por los dominios V<sub>H</sub> y C<sub>H1</sub>; (iv) un fragmento F<sub>v</sub> constituido por los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb, constituido por un dominio V<sub>H</sub>; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, capaz de unirse específicamente a un antígeno. Además, aunque los dos dominios del fragmento F<sub>v</sub>, V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>, son codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite ser hechos como una única cadena de proteína en la cual el par de regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> forman moléculas

monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv)). También dentro de la invención están las moléculas de unión a antígeno que comprenden un V<sub>H</sub> y/o un V<sub>L</sub>. En el caso de un V<sub>H</sub>, la molécula puede comprender también uno o más de una región CH1, bisagra, CH2 o CH3. También se pretende incluir esos anticuerpos de cadena sencilla dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de esta manera los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

Porciones de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>, se pueden preparar a partir de anticuerpos enteros usando técnicas convencionales, tales como digestión de anticuerpos completos papaína o pepsina. Por otra parte, anticuerpos, porciones de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse usando técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo, como se describe en el presente documento.

En una modalidad, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal. Como se usa en este documento, el acrónimo "mAb" se refiere a un anticuerpo monoclonal, es decir, un anticuerpo sintetizado y secretado por una población clonal individual de células. La población clonal puede ser una población clonal de células inmortalizadas. En algunas modalidades, las células inmortalizadas de la población clonal son células híbridas -hibridomas- producidas normalmente por la fusión de los linfocitos B individuales de un animal inmunizado con células individuales de un tumor linfocítico.

La clase (isotipo) y la subclase de anticuerpos anti-MET se pueden determinar por cualquier método conocido en la técnica. En general, la clase y subclase de un anticuerpo se pueden determinar usando anticuerpos que son específicos para una clase y subclase de anticuerpo particular. Esos anticuerpos están comercialmente disponibles. La clase y subclase se pueden determinar por ELISA, Western Blot, así como otras técnicas. Alternativamente, la clase y subclase se pueden determinar mediante secuenciación de todos o una porción de los dominios constantes de las cadenas pesada y/o ligera de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinando la clase y subclase de los anticuerpos.

**Anticuerpos anti-MET**

La presente invención se refiere a un anticuerpo dirigido contra MET humano, o una porción de unión a antígeno de ese anticuerpo. La invención provee nuevos anticuerpos anti-MET 9006 y 9338 tanto en formas quiméricas como humanizadas. Las figuras 26-30 ilustran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la cadena pesada y ligera de longitud larga (HC y LC) y dominio variable (VH y VL) de estos anticuerpos. La tabla 1 siguiente provee las SEQ ID NOs de estas secuencias. La tabla 2 siguiente provee las SEQ ID NOs para las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada y ligera de los anticuerpos 9006 y 9338 (que son los mismos entre las formas quimérica y humanizada). Las secuencias de CDR fueron asignados de acuerdo con definiciones de IMGT®.

**Tabla 1: SEQ ID NOs para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los dominios variables de cadenas pesada y ligera de anticuerpos 9006 y 9338**

	quimérico				humanizado					
	VH		VL		VH		VL		HC	LC
	ADN	proteína	AD N	proteína	ADN	proteína	AD N	proteína	proteína	proteína
9006	5	6	7	8	13	14	15	16	34	33

	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
9006	21	22	23	24	25	26
9338	27	28	29	30	31	32

También se describen en el presente documento:

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24, 25 y 26, respectivamente;

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24, 25 y 26, respectivamente;

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un

- anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
- 5 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;
- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
- 10 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 27, 28, 29, 30, 31 y 32, respectivamente;
- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 27, 28, 29, 30, 31 y 32, respectivamente;
- 15 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;
- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- 20 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;
- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- 25 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33;
- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35;
- 30 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33; y
- 35 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.
- También se describe en el presente documento un anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 o 29. También se describe en el presente documento un anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo que tiene una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 o 32. Tal como se describe en el presente documento el anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo, tiene una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 o 29 y una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 o 32. Tal como se describe en el presente documento el anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo comprende:
- 40 - la secuencia de H-CDR3 de SEQ ID NO: 23 y la secuencia de L-CDR3 de SEQ ID NO: 26; o
- la secuencia de H-CDR3 de SEQ ID NO: 29 y la secuencia de L-CDR3 de SEQ ID NO: 32.
- 45 Tal como se describe en el presente documento el anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo comprende:
- 50 - una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 21, 22 y 23, respectivamente; o

## ES 2 748 295 T3

- una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 27, 28 y 29, respectivamente.

Tal como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo comprende:

5 - una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 24, 25 y 26, respectivamente; o

- una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 30, 31 y 32, respectivamente.

En una modalidad, el anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo comprende:

10 - una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 21, 22 y 23, respectivamente, y una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 24, 25 y 26, respectivamente; o

15 - una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 27, 28 y 29, respectivamente, y una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 30, 31 y 32, respectivamente.

Tal como se describe en el presente documento el anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo, tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 10, 14 o 18. Tal como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo tiene un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 12, 16 o 20. Tal como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 10, 14 o 18 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 12, 16 o 20. En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo comprende:

20 - un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

- un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;

- un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; o

30 - un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33.

35 En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

40 También se describe en el presente documento una variante de un anticuerpo o porción del mismo como se describió anteriormente, en donde la variante difiere del anticuerpo o porción del mismo, por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos.

45 También se describe en el presente documento un anticuerpo anti-MET que comprende un dominio variable de cadena pesada que es por lo menos 90% idéntico en secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 6, 10, 14 o 18, o una porción de unión a antígeno de ese anticuerpo. Tal como se describe en el presente documento el dominio variable de cadena pesada es de por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico en secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 6, 10, 14 o 18. También se describe en el presente documento un anticuerpo anti-MET que comprende un dominio variable de cadena ligera que es por lo menos 90% idéntico en secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 8, 12, 16 o 20, o una porción de unión a antígeno de ese anticuerpo. Tal como se describe en el presente documento el dominio variable de cadena ligera es de por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico en secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 8, 12, 16 o 20. El anticuerpo anti-MET también puede comprender cualquier combinación de los dominios variables de cadena pesada y ligera referenciados anteriormente.

50 También se describe en el presente documento un anticuerpo anti-MET que comprende una cadena pesada que es por lo menos 90% idéntica en secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 34 o 36, o una porción de unión a antígeno de

- ese anticuerpo. Tal como se describe en el presente documento, la cadena pesada es de por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica en secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 34 o 36. También se describe en el presente documento un anticuerpo anti-MET que comprende una cadena ligera que es por lo menos 90% idéntica en secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 33 o 35, o una porción de unión a antígeno de ese anticuerpo.
- 5 Tal como se describe en el presente documento la cadena ligera es de por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica en secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 33 o 35. El anticuerpo anti-MET también puede comprender cualquier combinación de los dominios variables de cadena pesada y ligera referenciados anteriormente.
- 10 La similitud de secuencia para polipéptidos, que también se denomina identidad de secuencia, se mide normalmente usando software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteínas hace coincidir secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, GCG contiene programas tales como "Gap" y "Bestfit" que se pueden usar con los parámetros por defecto para determinar homología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o
- 15 entre proteína de tipo silvestre y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Secuencias de polipéptido también pueden compararse usando FASTA que utiliza parámetros por defecto o recomendados; un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) provee alineaciones y por ciento de identidad de secuencia de las regiones de mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000)). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente blastp o tblastn, usando parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997).
- 20 La longitud de secuencias de polipéptido comparadas para la homología generalmente será de por lo menos aproximadamente 16 residuos de aminoácidos, normalmente por lo menos aproximadamente 20 residuos, muy habitualmente por lo menos aproximadamente 24 residuos, normalmente por lo menos aproximadamente 28 residuos, y preferiblemente más de aproximadamente 35 residuos.
- 25 De conformidad con la invención, un tipo de sustitución de aminoácidos que se pueda hacer es cambiar una o más cisteínas en el anticuerpo, que pueden ser químicamente reactivo, a otro residuo, tal como, sin limitación, alanina o serina. En una modalidad, hay una sustitución de una cisteína no canónica. La sustitución puede hacerse en una región CDR o de marco de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. En algunas modalidades, la cisteína es canónica.
- 30 Otro tipo de sustitución de aminoácidos que puede hacerse es remover los sitios proteolíticos potenciales en el anticuerpo. Esos sitios pueden aparecer en una región de CDR o de marco de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. La sustitución de residuos de cisteína y la eliminación de los sitios proteolíticos puede disminuir el riesgo de heterogeneidad en el producto de anticuerpo y por lo tanto aumentar su homogeneidad.
- 35 Otro tipo de sustitución de aminoácidos es eliminar los pares de asparagina-glicina, que forman sitios de desamidación potenciales, mediante la alteración de uno o ambos de los residuos.
- 40 Otro tipo de sustitución de aminoácidos que se puede hacer en una de las variantes de conformidad con la invención es una sustitución conservativa de aminoácidos. Una "sustitución conservativa de aminoácidos" es una en la cual un residuo de aminoácido es sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o carácter hidrófobo). En general, una sustitución conservativa de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservativas, el por ciento de identidad de secuencia o
- 45 grado de similitud pueden ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243:307-31 (1994).
- 50 Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales de hidroxilo alifático: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución conservativa de aminoácidos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, y asparagina-glutamina.
- 55 Como alternativa, un reemplazo conservativo puede definirse como cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrito en Gonnet et al., *Science* 256:1443-1445 (1992). Un reemplazo "meramente conservativo" es cualquier cambio que tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

En ciertas modalidades, las sustituciones de aminoácidos a un anticuerpo o porción de unión a antígeno de la invención son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para la formación de complejos de proteínas, y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de los análogos, pero todavía conservan la unión específica a MET humano. Los análogos pueden incluir diversas sustituciones en la secuencia del péptido que se produce normalmente. Por ejemplo, sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples, preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas, se pueden hacer en la secuencia que se produce normalmente, por ejemplo en la porción del polipéptido fuera del dominio(s) que forman contactos intermoleculares. Las sustituciones de aminoácidos también pueden hacerse en el dominio(s) que forma contactos intermoleculares que pueden mejorar la actividad del polipéptido. Una sustitución conservativa de aminoácidos no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia progenitora; por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe alterar la lámina  $\beta$  anti-paralela que constituye el dominio de unión a inmunoglobulina que se produce en la secuencia progenitora, o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracteriza la secuencia progenitora. En general, la glicina y la prolina no se usarían en una lámina  $\beta$  anti-paralela. Ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds, Garland Publishing, Nueva York, Nueva York (1991)); y Thornton et al., *Nature* 354:105 (1991).

En otro aspecto de la invención, el anticuerpo puede ser desimmunizado para reducir su inmunogenicidad usando las técnicas descritas en, por ejemplo, las publicaciones del PCT WO 98/52976 y WO 00/34317.

En algunas modalidades, cualquiera de los anticuerpos anti-MET o porciones de unión a antígeno que se describen en este documento inhiben el crecimiento tumoral *in vivo* y también pueden tener por lo menos una propiedad funcional seleccionada del grupo constituido por:

- no se une a MET de ratón o de pollo;
- se une a un epítipo de MET humano que comprende residuos que están presentes en el dominio de SEMA;
- induce la degradación de MET;
- se une a MET humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-9}$  M o menos; y
- inhibe el crecimiento *in vitro* de por lo menos una línea celular seleccionada de SNU5, EBC1, MKN45, Katoll, OE33 y Okajima;

o cualquier combinación de esas propiedades funcionales. En algunas modalidades, la unión de uno o más anticuerpos o porciones de unión a antígeno de la invención (y en particular una composición de anticuerpos anti-MET de la invención) a MET puede inhibir el crecimiento y proliferación de células que expresan los receptores (es decir, las células tumorales).

En algunas modalidades, cualquiera de los anticuerpos anti-MET o porciones de unión a antígeno que se describen en este documento pueden inhibir la unión de HGF alfa o HGF beta a MET. En algunas modalidades, los anticuerpos o porciones pueden inhibir la unión de HGF sin procesar a MET.

Como se usa en este documento, el término "inhibe el crecimiento" (por ejemplo, en referencia a las células) está destinado a incluir cualquier disminución medible en la proliferación (aumento del número de células) o el metabolismo de una célula cuando entra en contacto con un anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno o composición de anticuerpos anti-MET en comparación con el crecimiento de las mismas células en ausencia del anticuerpo o composición, por ejemplo, la inhibición de crecimiento de un cultivo celular en por lo menos aproximadamente 10%, y muy preferiblemente, tal como por lo menos aproximadamente 20% o 30%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 40% o 50%, tal como por lo menos aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99%, o incluso aproximadamente 100%. La inhibición del crecimiento se puede determinar en líneas celulares de cáncer pertinentes, por ejemplo, como se describe en los siguientes ejemplos.

La clase de un anticuerpo anti-MET obtenido por los métodos descritos en el presente documento puede ser conmutada con otra clase. Una molécula de ácido nucleico que codifica VL o VH se aísla usando procedimientos bien conocidos en la técnica tal que no incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican CL o CH. Las moléculas de ácido nucleico que codifican VL o VH entonces se enlazan operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una CL o CH, respectivamente, de una clase diferente de molécula de inmunoglobulina. Esto se puede conseguir usando un vector o molécula de ácido nucleico que comprende una cadena CL o CH, como se describió anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-MET que originalmente era IgM puede ser cambiado a la clase IgG. Además, el cambio de clase puede usarse para convertir una subclase IgG a otra, por ejemplo de IgG1 a IgG2. Un método preferido para producir un anticuerpo de la invención con un isotipo deseado comprende los pasos de aislar una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo anti-MET y una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-MET, obteniendo el dominio variable de la cadena pesada, ligando el dominio variable de la cadena pesada con el dominio constante de una cadena pesada del isotipo deseado, expresando la cadena ligera y la cadena pesada ligada en una célula, y recogiendo el anticuerpo anti-MET con el isotipo deseado.

El anticuerpo anti-MET de la invención puede ser una IgG, una IgM, una IgE, una IgA, o una molécula de IgD. En una modalidad, el anticuerpo anti-MET es una molécula de IgG y es de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En ciertas modalidades, el anticuerpo es de la subclase IgG1.

5 En ciertas modalidades, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la invención puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión mayor, formada por enlaces covalentes o asociación no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos. Ejemplos de esas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región del núcleo de estreptavidina para hacer una molécula tetramérica scFv (Kipriyanov et al., *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101 (1995)) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para hacer moléculas de scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov et al., *Mol Immunol.* 31:1047-1058 (1994)). Otros ejemplos incluyen en donde las CDR de un anticuerpo se incorporan en una molécula ya sea covalentemente o no covalentemente para que sea una inmunoadhesina que se une específicamente a un antígeno de interés. En esas modalidades, las CDR se pueden incorporar como parte de una cadena polipeptídica más grande, puede ser unida covalentemente a otra cadena polipeptídica, o puede incorporarse de manera no covalente.

15 En otra modalidad, un anticuerpo de fusión o inmunoadhesina puede estar hecho de modo que comprenda la totalidad o una porción de un anticuerpo anti-MET de la invención enlazado a otro polipéptido. En ciertas modalidades, sólo los dominios variables del anticuerpo anti-MET se enlazan al polipéptido. En ciertas modalidades, el dominio VH de un anticuerpo anti-MET es enlazado a un primer polipéptido, mientras que el dominio VL de un anticuerpo anti-MET es enlazado a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de una manera tal que los dominios VH y VL pueden interactuar entre sí para formar un sitio de unión a antígeno. En otra modalidad preferida, el dominio VH se separa del dominio VL por un enlazador de modo que los dominios VH y VL pueden interactuar entre sí (por ejemplo, anticuerpos de cadena única). El anticuerpo VH-enlazador-VL se enlaza después al polipéptido de interés. Además, se pueden crear anticuerpos de fusión en los cuales dos (o más) anticuerpos de cadena única son enlazados el uno al otro. Esto es útil si se quiere crear un anticuerpo divalente o polivalente en una única cadena polipeptídica, o si se quiere crear un anticuerpo biespecífico.

25 Para crear un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), los fragmentos de ADN que codifican VH y VL están unidos operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser)3, de tal manera que la secuencias de VH y VL se pueden expresar como una proteína de cadena sencilla contigua, con los dominios VL y VH unidos por el enlazador flexible. Véase, por ejemplo, Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); y McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990). El anticuerpo de cadena sencilla puede ser monovalente, si sólo se usa VH y VL sencillos; bivalente, si se usan dos VH y VL; o polivalente, si se usan más de dos VH y VL. Se pueden generar anticuerpos biespecíficos o polivalentes que se unen específicamente, por ejemplo, a MET humano y a otra molécula.

35 En otras modalidades, otros anticuerpos modificados se pueden preparar usando moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo anti-MET. Por ejemplo, "cuerpos kappa" (Ill et al., *Protein Eng.* 10:949-57 (1997)) (Martin et al., *EMBO J.* 13:5303-9 (1994)), "diacuerpos" (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)), o "Janusins" (Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991) y Traunecker et al., *Int. J. Cancer* (Supl.) 7: 51-52 (1992)) se pueden preparar usando técnicas de biología molecular convencionales siguiendo las enseñanzas de la especificación.

40 Un anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno de la invención se puede derivar o enlazar a otra molécula (por ejemplo, otro péptido o proteína). En general, los anticuerpos o partes de los mismos se derivan de tal manera que la unión a MET no se ve afectada negativamente por la derivación o el etiquetado. Por consiguiente, se pretende que los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención incluyan tanto las formas intactas como modificadas de los anticuerpos anti-MET humanos descritos en este documento. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se puede enlazar funcionalmente (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región núcleo de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

50 Un tipo de anticuerpo derivado se produce mediante reticulación de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los reticulantes adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos claramente reactivos separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncional (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Esos engarces están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

55 Un anticuerpo anti-MET también se puede derivar con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo carbohidrato. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para aumentar la vida media en suero.

Un anticuerpo de conformidad con la presente invención también puede ser etiquetado. Como se usa en el presente documento, los términos "etiqueta" o "etiquetado" se refieren a la incorporación de otra molécula en el anticuerpo. En una modalidad, la etiqueta es un marcador detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de porciones biotinilo que pueden ser detectadas por avidina marcada (por ejemplo,

- estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede ser detectada por métodos ópticos o colorimétricos). En otra modalidad, la etiqueta o el marcador puede ser terapéutico, por ejemplo, un conjugado de fármaco o toxina. Varios métodos de marcaje de polipéptidos y glicoproteínas son conocidos en la técnica y pueden ser usados. Ejemplos de etiquetas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, 3H, 14C, 15N, 35S, 90Y, 99Tc, 111In, 125I, 131I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotínico, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un reportero secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopos), agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio, toxinas tales como la toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracinaodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. En algunas modalidades, los marcadores se unen por brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.
- En ciertas modalidades, los anticuerpos de la invención pueden estar presentes en una forma neutra (incluyendo formas zwitteriónicas) o como una especie positiva o con carga negativa. En algunas modalidades, los anticuerpos pueden formar complejos con un contraión para formar una sal farmacéuticamente aceptable.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a un complejo que comprende uno o más anticuerpos y uno o más contraiones, en donde los contraiones se derivan de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables.

Las bases inorgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen iones metálicos que incluyen, pero no se limitan a, sales de metal alcalino apropiadas, sales de metal alcalinotérreo y otros iones de metales aceptables fisiológicos. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen aluminio, amonio, calcio, cobalto, níquel, molibdeno, vanadio, manganeso, cromo, selenio, estaño, cobre, férrico, ferroso, litio, magnesio, sales mangánicas o de manganeso, potasio, rubidio, sodio y zinc, por ejemplo, en sus valencias usuales.

Las sales ácidas de adición farmacéuticamente aceptables de los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar a partir de los siguientes ácidos, incluyendo, sin limitación, ácido fórmico, acético, acetamidobenzoico, adípico, ascórbico, bórico, propiónico, benzoico, alcanfórico, carbónico, ciclámico, dehidrocólico, malónico, edético, etilsulfúrico, fendizoico, metafosfórico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, tánico, cítrico, nítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fólico, fumárico, propiónico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, lisina, isocítrico, trifluoroacético, pamoico, propiónico, antranílico, mesílico, orótico, oxálico, oxalacético, oleico, esteárico, salicílico, aminosalicílico, silicato, p-hidroxibenzoico, nicotínico, fenilacético, mandélico, embónico, sulfónico, metanosulfónico, fosfórico, fosfónico, etanosulfónico, etanodisulfónico, amonio, benzenosulfónico, pantoténico, naftalenosulfónico, toluenosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, sulfanílico, sulfúrico, nítrico, nitroso, éster monometílico del ácido sulfúrico, ciclohexilaminosulfónico, β-hidroxibutírico, glicina, glicilglicina, glutámico, cacodilato, diaminohexanoico, alcanforsulfónico, glucónico, tiocianico, oxoglutárico, 5-fosfato de piridoxal, clorofenoxiacético, undecanoico, N-acetil-L-aspártico, galactárico y galacturónico.

Las bases orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen trimetilamina, dietilamina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dibencilamina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina), procaína, aminos cíclicas, cationes de amonio cuaternario, arginina, betaína, cafeína, clemizol, 2-etilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanodiamina, butilamina, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, etilglucamina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, imidazol, isopropilamina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piridina, piridoxina, neodimio, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, tripropilamina, trietanolamina, trometamina, metilamina, taurina, colato, 6-amino-2-metil-2-heptanol, 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol, 2-amino-2-metil-1-propanol, ácidos alifáticos mono- y dicarboxílico, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, estroncio, tricina, hidrazina, fenilciclohexilamina, 2-(N-morfolino)- etanosulfónico, bis(2-hidroxietyl)amino-tris(hidroxietyl)- metano, ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico, ácido 1,4-piperazinadietanosulfónico, ácido 3-morfolino-2-hidroxiopropanosulfónico, 1,3-bis[tris(hidroxietyl)-metilamino]propano, ácido 4-morfolinopropanosulfónico, ácido 4-(2-hidroxietyl)piperazina-1-etanosulfónico, ácido 2-[(2-hidroxi-1,1-bis(hidroxietyl)etyl)amino]etanosulfónico, ácido N,N-bis(2-hidroxietyl)-2-aminoetanosulfónico, ácido 4-(N-morfolino)butanosulfónico, ácido 3-(N,N-bis[2-hidroxietyl]amino)-2-hidroxiopropanosulfónico, ácido 2-hidroxi-3-[tris(hidroxietyl)metilamino]-1-propanosulfónico, ácido 4-(2-hidroxietyl)piperazina-1-(2-hidroxiopropanosulfónico), dihidrato de ácido piperazina-1,4-bis(2-hidroxiopropanosulfónico), ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinapropanosulfónico, N,N-bis(2-hidroxietyl)glicina, ácido N-(2-hidroxietyl)piperazina-N'-(4-butanosulfónico), ácido N-[tris(hidroxietyl)metil]-3-aminopropanosulfónico, ácido N-tris(hidroxietyl)metil-4-aminobutanosulfónico, ácido N-(1,1-dimetil-2-hidroxietyl)-3-amino-2-hidroxiopropanosulfónico, ácido 2-(ciclohexilamino) etanosulfónico, ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfónico, ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico, ácido N-(2-acetamido)iminodiacético, ácido 4-(ciclohexilamino)-1-butanosulfónico, N-[tris (hidroxietyl)metil]glicina, 2-amino-2-(hidroxietyl)-1,3-propanodiol, y trometamol.

60 Composiciones de anticuerpos anti-MET

En un aspecto, la invención provee una composición de anticuerpos que comprende por lo menos dos anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención. El término "composición de anticuerpos anti-MET" se refiere a una composición que comprende por lo menos dos anticuerpos anti-MET o porciones de unión a antígeno de los mismos.

5 En una modalidad, la composición de anticuerpo comprende un primer anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo y un segundo anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo, donde el primer anticuerpo anti-MET se selecciona del grupo constituido por:

10 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22 y 23, respectivamente, y una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 24, 25 y 26, respectivamente;

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

15 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; y

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33;

20 y donde el segundo anticuerpo anti-MET se selecciona del grupo constituido por:

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 27, 28 y 29, respectivamente, y una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, 31 y 32, respectivamente;

25 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; y

30 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

35 Tal como se describe en la presente la composición de anticuerpos comprende un primer anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo y un segundo anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde el primer anticuerpo anti-MET se selecciona del grupo constituido por:

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24, 25 y 26, respectivamente;

40 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24, 25 y 26, respectivamente;

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

45 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;

50 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de

- SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23;
  - 5 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26;
  - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26;
  - 10 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 21, 22 y 23, respectivamente;
  - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 24, 25 y 26, respectivamente;
  - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o 14; y
  - 15 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o 16;
- y en donde el segundo anticuerpo anti-MET se selecciona del grupo constituido por:
- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 27, 28, 29, 30, 31 y 32, respectivamente;
  - 20 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 27, 28, 29, 30, 31 y 32, respectivamente;
  - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;
  - 25 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
  - 30 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;
  - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
  - 35 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29;
  - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32;
  - 40 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32;
  - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 27, 28 y 29, respectivamente;
  - 45 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 30, 31 y 32, respectivamente;
  - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 18; y
  - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena ligera

que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o 20;

Se contempla cualquier combinación del primer y segundo anticuerpos anti-MET anteriores.

La composición de anticuerpos puede comprender:

5 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24, 25 y 26, respectivamente; y

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 27, 28, 29, 30, 31 y 32, respectivamente.

10 La composición de anticuerpos puede comprender:

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24, 25 y 26, respectivamente; y

15 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene una H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 27, 28, 29, 30, 31 y 32, respectivamente.

La composición de anticuerpos puede comprender:

20 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; y

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

La composición de anticuerpos puede comprender:

25 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; y

30 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

La composición de anticuerpos puede comprender:

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33; y

35 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a MET humano con un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

La composición de anticuerpos puede comprender:

40 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; y

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

45 La composición de anticuerpos puede comprender:

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; y

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

La composición de anticuerpos puede comprender:

5 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33; y

10 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de MET humano que un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

Tal como se describe en el presente documento, la composición de anticuerpos comprende:

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; y

15 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29.

Tal como se describe en el presente documento, la composición de anticuerpos comprende:

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; y

20 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32.

Tal como se describe en el presente documento, la composición de anticuerpos comprende:

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; y

25 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y una L-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32.

Tal como se describe en el presente documento, la composición de anticuerpos comprende:

30 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 21, 22 y 23, respectivamente; y

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 27, 28 y 29, respectivamente.

Tal como se describe en el presente documento, la composición de anticuerpos comprende:

35 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 24, 25 y 26, respectivamente; y

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 30, 31 y 32, respectivamente.

Tal como se describe en el presente documento, la composición de anticuerpos comprende:

40 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 21, 22 y 23, respectivamente, y una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 24, 25 y 26, respectivamente; y

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 27, 28 y 29, respectivamente, y una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 30, 31 y 32, respectivamente.

45 En la invención, la composición de anticuerpos comprende:

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un dominio variable de cadena ligera que comprende

la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; y

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

5 En una modalidad, la composición de anticuerpos comprende:

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; y

10 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

En una modalidad, la composición de anticuerpos comprende:

15 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33; y

- un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

En una modalidad, la composición de anticuerpos comprende:

20 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un dominio variable de cadena ligera por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; y

25 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de cadena ligera por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

Se contempla cualquier combinación de los porcentajes de identidad anteriores del primer y segundo anticuerpos.

En una modalidad, la composición de anticuerpos comprende:

30 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; y

35 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un dominio variable de cadena ligera por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

Se contempla cualquier combinación de los porcentajes de identidad anteriores del primer y segundo anticuerpos.

En una modalidad, la composición de anticuerpos comprende:

40 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una cadena pesada por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO : 33; y

45 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una cadena pesada por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

Se contempla cualquier combinación de los porcentajes de identidad anteriores del primer y segundo anticuerpos.

Moléculas de unión biespecíficas

En un aspecto adicional, las especificidades de unión de cualquiera de los dos anticuerpos individuales descritos en este documento pueden ser combinados en una molécula de unión biespecífica. Por ejemplo, una molécula de unión biespecífica puede tener las especificidades de unión de anticuerpos anti-MET 9006 y 9338. En algunas modalidades, la molécula de unión biespecífica puede tener las especificidades de unión de:

5 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 21, 22 y 23, respectivamente, y una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 24, 25 y 26, respectivamente; y

10 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 27, 28 y 29, respectivamente, y una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 30, 31 y 32, respectivamente.

En algunas modalidades, la molécula de unión biespecífica puede tener las especificidades de unión de:

15 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; y

15 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En algunas modalidades, la molécula de unión biespecífica puede tener las especificidades de unión de:

20 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; y

25 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, la molécula de unión biespecífica puede tener las especificidades de unión de:

30 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33; y

30 - un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

La molécula de unión biespecífica puede ser un anticuerpo dual dominio variable, es decir, en donde los dos brazos del anticuerpo comprenden dos dominios variables diferentes, o pueden estar en la forma de un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab biespecífico o un scFv biespecífico.

### 35 Moléculas de ácido nucleico y vectores

La presente invención también provee moléculas de ácido nucleico y secuencias que codifican anticuerpos anti-MET o porciones de unión a antígeno de los mismos descritos en este documento. En algunas modalidades, diferentes moléculas de ácido nucleico codifican las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y de cadena pesada del anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo. En otras modalidades, la misma molécula de ácido nucleico codifica las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y de cadena pesada del anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo.

Una referencia a una secuencia de nucleótidos abarca su complemento a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, debe entenderse que una referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular abarca su hebra complementaria, con su secuencia complementaria. El término "polinucleótido", como se refiere en este documento, significa una forma polimérica de nucleótidos de por lo menos 10 bases de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de hebra sencilla y doble.

También se describen en el presente documento secuencias de nucleótidos que son por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idénticas a una o más de las secuencias de nucleótidos anteriormente mencionadas o a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOS: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 33-36. El término "por ciento de identidad de secuencia", en el contexto de secuencias de ácido nucleico, se refiere a los residuos en dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima. La comparación de la identidad de longitud de la secuencia puede ser sobre un tramo de por

lo menos aproximadamente nueve nucleótidos, habitualmente por lo menos aproximadamente 18 nucleótidos, muy habitualmente por lo menos aproximadamente 24 nucleótidos, normalmente por lo menos aproximadamente 28 nucleótidos, muy normalmente por lo menos aproximadamente 32 nucleótidos, y preferiblemente por lo menos aproximadamente 36, 48 o más nucleótidos. Hay un número de diferentes algoritmos conocidos en la técnica que se puede usar para medir la identidad de secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos se pueden comparar usando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas en Wisconsin Package Versión 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, que incluye, por ejemplo, los programas FASTA2 y FASTA3, provee alineaciones y por ciento de identidad de secuencia de las regiones de la mejor superposición entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132: 185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol* 266: 227-258 (1996); Pearson, *J. Mol Biol.* 276:71-84 (1998). A menos que se especifique lo contrario, se usan los parámetros por defecto para un programa o algoritmo particular. Por ejemplo, el por ciento de identidad de secuencia entre secuencias de ácido nucleico se puede determinar usando FASTA con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación) o usando Gap con sus parámetros por defecto según se provee en GCG Versión 6.1.

También se describe en el presente documento una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico puede comprender las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NOs: 5 y 7, 9 y 11, 13 y 15, o 17 y 19.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un vector adecuado para la expresión de ambas cadenas de un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento. El término "vector", como se usa en este documento, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. En algunas modalidades, el vector es un plásmido, es decir, una pieza de doble hebra circular de ADN en donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. En algunas modalidades, el vector es un vector viral, en donde segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. En algunas modalidades, los vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedera en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episómicos de mamífero). En otras modalidades, los vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedera tras la introducción en la célula hospedera, y de ese modo se replican junto con el genoma del hospedero. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están operativamente ligados. Esos vectores se denominan en este documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión").

También se describen o se reivindican en el presente documento vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada de un anticuerpo anti-MET de la invención o una porción de unión a antígeno del mismo, la cadena ligera de un anticuerpo anti-MET de la invención o una porción de unión a antígeno del mismo, o ambas de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo anti-MET de la invención o una porción de unión a antígeno del mismo. La invención provee además vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpo, y sondas de los mismos.

Una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo anti-MET o porción del mismo puede aislarse de cualquier fuente que produzca un anticuerpo o porción de este tipo. En diversas modalidades, las moléculas de ácido nucleico se aíslan de células B que expresan un anticuerpo anti-MET aislado de un animal inmunizado con un antígeno de MET humano, o de una célula inmortalizada producida a partir de la célula B. Los métodos de aislamiento de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo son bien conocidos en la técnica. El ARNm se puede aislar y usar para producir ADNc para usarse en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o clonación de ADNc de genes de anticuerpos. En ciertas modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención puede ser sintetizada en vez de ser aislada.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio VH de un anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno de la invención unida en marco a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de cadena pesada de cualquier fuente. De manera similar, una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio VL de un anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno de la invención unida en marco a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de cadena ligera de cualquier fuente.

En un aspecto adicional de la invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican el dominio variable de las cadenas pesada (VH) y/o ligera (VL) pueden ser "convertidas" en genes de anticuerpos de longitud completa. En una modalidad, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios VH o VL son convertidas en genes de anticuerpos de longitud completa por la inserción en un vector de expresión que ya codifican dominios constantes de cadena pesada (CH) o constante de cadena ligera (CL), respectivamente, de manera que el segmento VH se une operativamente al segmento(s) CH dentro del vector, y el segmento VL se une operativamente al segmento CL dentro del vector. En otra modalidad, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios VH y/o VL son convertidas en genes de anticuerpos de longitud completa mediante el enlace de, por ejemplo, ligando, una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio VH y/o VL de una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio CH y/o CL usando técnicas de biología molecular estándares. Las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y/o ligera de longitud completa entonces se pueden expresar a partir de una célula en la cual se han introducido y el anticuerpo

anti-MET se puede aislar.

Las moléculas de ácido nucleico pueden usarse para expresar de manera recombinante grandes cantidades de anticuerpos anti-MET. Las moléculas de ácido nucleico también se pueden usar para producir anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos de hebra sencilla, inmunoadhesinas, diacuerpos, anticuerpos mutados y derivados de anticuerpos, como se describe en el presente documento.

Una molécula de ácido nucleico de la invención se puede utilizar como una sonda o cebador de PCR para una secuencia de anticuerpo específico. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede usar como una sonda en los métodos de diagnóstico o como un cebador de PCR para amplificar regiones de ADN que podrían usarse, entre otras cosas, para aislar moléculas de ácido nucleico adicionales que codifican los dominios variables de los anticuerpos anti-MET. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser oligonucleótidos. Los oligonucleótidos pueden ser de dominios altamente variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de interés. Los oligonucleótidos pueden codificar toda o una parte de una o más de las CDRs de los anticuerpos anti-MET o porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención como se describe en este documento.

En otra modalidad, las moléculas de ácido nucleico y vectores se pueden usar para producir anticuerpos anti-MET mutados. Los anticuerpos pueden ser mutados en los dominios variables de las cadenas pesada y/o ligera, por ejemplo, para alterar una propiedad de unión del anticuerpo. Una mutación puede hacerse en una o más de las regiones CDR para aumentar o disminuir la  $K_D$  del anticuerpo anti-MET, para aumentar o disminuir  $k_{dis}$ , o para alterar la especificidad de unión del anticuerpo. En otra modalidad, una o más mutaciones se realizan en un residuo de aminoácido que se sabe que es cambiado en comparación con la línea germinal en un anticuerpo monoclonal de la invención. Las mutaciones se pueden hacer en una región CDR o marco de la región de un dominio variable, o en un dominio constante. En una modalidad preferida, las mutaciones se hacen en un dominio variable. En algunas modalidades, una o más mutaciones se hacen en un residuo de aminoácido que se sabe que es cambiado en comparación con la línea germinal en una región marco de un dominio variable de un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la invención.

En otra modalidad, la región(es) de marco son mutadas de modo que la región(es) de marco resultante tiene la secuencia de aminoácidos del gen de la línea germinal correspondiente. Una mutación puede hacerse en una región marco o dominio constante para aumentar la vida media del anticuerpo anti-MET. Véase, por ejemplo, la publicación del PCT WO 00/09560. Una mutación en una región marco o dominio constante también se puede hacer para alterar la inmunogenicidad del anticuerpo, y/o para proveer un sitio para unión covalente o no covalente a otra molécula. De conformidad con la invención, un solo anticuerpo puede tener mutaciones en uno cualquiera o más de las regiones de marco del dominio variable o en el dominio constante.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-MET de la invención o porciones de unión a antígeno de los mismos se expresan mediante la inserción de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de longitud parcial o completa, obtenidas como se describió anteriormente, en vectores de expresión de tal manera que los genes son enlazados operativamente a secuencias de control de expresión necesarias, tales como secuencias de control de transcripción y traducción. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), virus de plantas tales como el virus mosaico de la coliflor, virus del mosaico del tabaco, cósmidos, YACs, episomas derivados de EBV, y similares. El gen del anticuerpo se puede ligar en un vector tal que las secuencias de control de la transcripción y de la traducción dentro del vector sirven su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión o las secuencias de control de expresión se pueden escoger para ser compatibles con la célula hospedera de expresión usada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo pueden insertarse en vectores separados. En una modalidad, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se pueden insertar en el vector de expresión por métodos estándares (por ejemplo, la ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y el vector, o ligación de extremos romos si no hay sitios de restricción presentes).

Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia de inmunoglobulina de CH o CL humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados diseñados de modo que cualquier secuencia de VH o VL pueda ser fácilmente insertada y expresada, como se describió anteriormente. En esos vectores, el empalme se produce habitualmente entre el sitio donante de empalme en la región J insertada y el sitio aceptor de empalme que precede al dominio C humano, y también en las regiones de empalme que se producen dentro de los exones CH humanos. La poliadenilación y la terminación de la transcripción pueden ocurrir en sitios cromosómicos nativos cadena en dirección 3' de las regiones codificantes. El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo a partir de una célula hospedera. El gen de la cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de modo que el péptido señal se una en fase al extremo amino terminal de la cadena de inmunoglobulina. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de la cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden llevar secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula hospedera. Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedera que ha de ser

transformada, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células hospederas de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de LTR retrovirales, citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/potenciador de CMV), virus simiano 40 (Simian Virus 40 o SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)), polioma y promotores fuertes de mamíferos tales como promotores de inmunoglobulina y actina nativos. Para una descripción adicional de elementos reguladores virales, y secuencias de los mismos, véase, por ejemplo, las patentes de E.U.A. 5,168,062, 4,510,245 y 4,968,615. Los métodos para expresar anticuerpos en plantas, incluyendo una descripción de los promotores y vectores, así como la transformación de plantas, son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de E.U.A. 6,517,529. Métodos de expresión de polipéptidos en células bacterianas o células fúngicas, por ejemplo, células de levadura, también son bien conocidos en la técnica.

Además de los genes de la cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospederas (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospederas en las que se ha introducido el vector (véase, por ejemplo, las patentes de E.U.A. 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017). Por ejemplo, normalmente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedera en la cual se ha introducido el vector. Por ejemplo, los genes marcadores seleccionables incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usarse en células dhfr-hospederas con selección/amplificación con metotrexato), el gen neo (para selección con G418), y el gen de la glutamato sintetasa.

El término "secuencia de control de expresión", como se usa en el presente documento, significa secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las cuales están ligadas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias de iniciación de la transcripción, terminación, promotoras y potenciadoras apropiadas; señales de procesamiento del ARN eficaces tales como las señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficacia de traducción (es decir, secuencia consenso Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de esas secuencias de control difieren dependiendo del organismo hospedero; en procariotas, esas secuencias de control incluyen generalmente secuencias de promotor, sitio de unión ribosomal, y de terminación de la transcripción; en eucariotas, generalmente, esas secuencias de control incluyen secuencias de promotor y de terminación de la transcripción. Se pretende que el término "secuencias de control" incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de parejas de fusión.

#### Métodos de hibridoma para producir anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención

También se divulgan métodos para producir una línea celular que produce un anticuerpo monoclonal humano o una porción de unión a antígeno del mismo dirigido contra MET, que comprende (a) inmunizar un animal transgénico no humano con MET, una porción de MET o una célula o tejido que expresa MET; (b) permitir que el animal transgénico monte una respuesta inmunitaria a MET; (c) aislar las células productoras de anticuerpos a partir del animal transgénico; (d) immortalizar las células productoras de anticuerpos; (e) crear poblaciones monoclonales individuales de las células productoras de anticuerpos immortalizadas; y (f) cribar las células productoras de anticuerpos immortalizadas para identificar un anticuerpo dirigido contra MET.

En otro aspecto, la invención provee una línea celular que produce un anticuerpo anti-MET humano. En algunas modalidades, la línea celular es una línea celular de hibridoma. En algunas modalidades, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se describió anteriormente. En otras modalidades, los hibridomas se producen en una especie no humana, especies diferentes al ratón tales como ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado vacuno o caballos. En otra modalidad, los hibridomas son hibridomas humanos.

Un animal transgénico puede ser inmunizado con un antígeno MET, células primarias, por ejemplo, células B de bazo o sangre periférica, aisladas del animal transgénico inmunizado y células individuales productoras de anticuerpos específicos para el antígeno deseado pueden ser identificadas. El ARNm poliadenilado de cada célula individual puede aislarse y una reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) se puede llevar a cabo usando los cebadores sentido de que hibridan con secuencias de dominio variable, por ejemplo, cebadores degenerados que reconocen la mayor parte o todas las regiones FR1 de cadena pesada y ligera humana los genes de dominio variable y cebadores antisentido que hibridan con secuencias de la región constante o de unión. Los ADNc de los dominios variables de cadena pesada y ligera pueden entonces clonarse y expresarse en cualquier célula hospedera adecuada, por ejemplo, una célula de mieloma, como anticuerpos quiméricos con regiones constantes de inmunoglobulina respectivas, tales como los dominios constantes de cadena pesada y  $\kappa$  o  $\lambda$ . Véase Babcook et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7843-48 (1996). Los anticuerpos anti-MET pueden ser entonces identificados y aislados como se describe en este documento.

#### Bibliotecas de presentación en fagos

También se describe en el presente documento un método para producir un anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo que comprende los pasos de sintetizar una biblioteca de anticuerpos humanos en fagos, cribar la biblioteca con MET o una porción de unión de anticuerpos del mismo, aislar el fago que se une a MET, y obtener el anticuerpo del fago. A modo de ejemplo, un método para la preparación de la biblioteca de anticuerpos para su uso en técnicas de presentación en fagos comprende los pasos de inmunizar un animal no humano con MET o una porción antigénica de la misma para crear una respuesta inmunitaria, extraer células productoras de anticuerpos del animal inmunizado; aislar ARN que codifica las cadenas pesada y ligera de anticuerpos de la invención de las células extraídas, someter a transcripción inversa el ARN para producir ADNc, amplificar el ADNc usando cebadores, e insertar el ADNc en un vector de presentación en fagos tal que los anticuerpos se expresen en el fago. Los anticuerpos anti-MET recombinantes de la invención pueden obtenerse de esta manera.

Los anticuerpos anti-MET humanos recombinantes de la invención se pueden aislar por cribado de una biblioteca de anticuerpos combinatoria recombinante. Preferiblemente, la biblioteca es una biblioteca de presentación en fagos de scFv, generada usando los ADNc de VL y VH humanos preparados a partir de ARNm aislado de células B. Los métodos para preparar y cribar esas bibliotecas se conocen en la técnica. Los kits para generar bibliotecas de presentación en fagos están disponibles comercialmente (por ejemplo, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, no. de catálogo 27-9400-01; y el kit de presentación en fagos Stratagene SurfZAP™, no. de catálogo 240612). También hay otros métodos y reactivos que se pueden usar en la generación y selección de bibliotecas de presentación de anticuerpos (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 5,223,409; Publicaciones PCT. WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, y WO 92/09690; Fuchs et al., *Bio/Technology* 9: 1370-1372 (1991); Hay et al., *Hum Antibod Hybridomas* 3: 81-85 (1992); Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J* 12:725-734 (1993); Hawkins et al., *J Mol Biol* 226:889-896 (1992); Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991); Gram et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3576-3580 (1992); Garrad et al., *Bio/Technology* 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nuc Acid Res* 19:4133-4137 (1991); y Barbas et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7978-7982 (1991).

Con el fin de aislar y producir anticuerpos anti-MET humanos con las características deseadas, un anticuerpo anti-MET humano como se describe en el presente documento se puede usar primero para seleccionar secuencias de cadena pesada y ligera humanas que tienen actividad de unión similar hacia MET, usando los métodos de impronta de epítipo descritos en la publicación PCT WO 93/06213. Las bibliotecas de anticuerpos usadas en este método son preferiblemente bibliotecas de scFv preparadas y examinadas como se describe en la publicación PCT WO 92/01047, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); y Griffiths et al., *EMBO J* 12:725-734 (1993). Las bibliotecas de anticuerpos scFv se seleccionan preferiblemente usando MET humano como antígeno.

Una vez que se seleccionan los dominios VL y VH humanos iniciales, se pueden realizar experimentos de "mezclar y coincidir", en donde diferentes pares de los segmentos VL y VH inicialmente seleccionados se criban para unión de MET para seleccionar combinaciones de pares VL/VH preferidas. Además, para mejorar aún más la calidad del anticuerpo, los segmentos VL y VH del par(es) VL/VH preferido se pueden mutar al azar, preferiblemente dentro de la región CDR3 de VH y/o VL, en un proceso análogo al proceso de mutación somática *in vivo* responsable de la maduración de afinidad de los anticuerpos durante una respuesta inmunitaria natural. Esta maduración de afinidad *in vitro* puede lograrse mediante la amplificación de los dominios VH y VL usando cebadores de PCR complementarios a la CDR3 de VH o CDR3 de VL, respectivamente, esos cebadores han sido "fortalecidos" con una mezcla aleatoria de las cuatro bases nucleotídicas en ciertas posiciones de tal manera que los productos resultantes de la PCR codifican segmentos VH y VL en los cuales las mutaciones al azar han sido introducidas en las regiones CDR3 de VH y/o VL. Estos segmentos VH y VL mutados aleatoriamente pueden ser cribados nuevamente para la unión a MET.

Después del cribado y aislamiento de un anticuerpo anti-MET de la invención a partir de una biblioteca de presentación de inmunoglobulinas recombinantes, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo seleccionado se puede recuperar del paquete de presentación (por ejemplo, del genoma del fago) y subclonar en otros vectores de expresión por técnicas de ADN recombinante estándares. Si se desea, el ácido nucleico puede además manipularse para crear otras formas de anticuerpo de la invención, como se describe en el presente documento. Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado mediante cribado de una biblioteca combinatoria, el ADN que codifica el anticuerpo se clona en un vector de expresión recombinante y se introduce en una célula hospedera de mamífero, como se describe en el presente documento.

#### Células hospederas que no son híbridoma y métodos de producción de anticuerpos y composición de anticuerpos

Un aspecto adicional de la invención se refiere a métodos para producir las composiciones de anticuerpos y anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención. Una modalidad de este aspecto de la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo como se define aquí, que comprende proveer una célula hospedera recombinante capaz de expresar el anticuerpo, cultivar la célula hospedera en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y aislar el anticuerpo resultante. Los anticuerpos producidos por la expresión en esas células hospederas recombinantes se denominan aquí "anticuerpos recombinantes". La invención también provee células de la progenie de esas células hospederas, y los anticuerpos producidos por las mismas.

El término "célula hospedera recombinante" (o simplemente "célula hospedera"), como se usa aquí, significa una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. La invención provee células hospederas que pueden

comprender, por ejemplo, un vector de conformidad con la invención descrita anteriormente. La invención también provee células hospederas que comprenden, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno de la misma, o ambas, de un anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo de la invención. Debe entenderse que “célula hospedera recombinante” y “célula hospedera” significan no sólo la célula objeto particular, sino también la progenie de la célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, esa progenie, de hecho, puede no ser idéntica a la célula progenitora, pero todavía se incluye dentro del alcance del término “célula hospedera” como se usa en el presente documento.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-MET y vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico se pueden usar para la transfección de una célula de mamífero, vegetal, célula hospedera bacteriana o de levadura adecuada. La transformación puede ser mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedera. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa de ADN en los núcleos. Además, las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en células de mamífero por vectores virales. Los métodos de transformación de células son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, patentes de E.U.A. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461 y 4,959,455. Los métodos de transformación de células de plantas son bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación biolística, inyección directa, electroporación y transformación viral. Los métodos de transformación de células bacterianas y de levadura son también bien conocidos en la técnica.

Las líneas de células de mamífero disponibles como hospederos para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC). Estas incluyen, entre otras cosas, células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0, células SP2, células HEK-293T, células 293 Freestyle (Invitrogen), células NIH-3T3, células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células de riñón de mono verde africano (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549, y un número de otras líneas celulares. Las líneas celulares de preferencia particular se seleccionan determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión. Otras líneas celulares que pueden usarse son líneas celulares de insecto, tales como células Sf9 o Sf21. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos se introducen en células hospederas de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospederas durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospederas o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en donde se cultivan las células hospederas. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales. Las células hospederas vegetales incluyen, por ejemplo, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lenteja de agua, maíz, trigo, patata, etc. Las células hospederas bacterianas incluyen *E. coli* y especies de *Streptomyces*. Las células hospederas de levadura incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

Además, la expresión de anticuerpos de la invención o porciones de unión a antígeno de los mismos a partir de líneas celulares de producción se puede mejorar usando una serie de técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión de gen de glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para potenciar la expresión bajo ciertas condiciones. El sistema GS se describe, en su totalidad o parte en relación con las patentes EP 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997 y 0 338 841.

Es probable que los anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tengan diferentes patrones de glicosilación unos de otros. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácido nucleico provistas en este documento, o que comprenden las secuencias de aminoácidos provistas en este documento son parte de la presente invención, independientemente del estado de glicosilación de los anticuerpos, y más en general, independientemente de la presencia o ausencia de modificación(es) post-traduccionales(es).

En una modalidad adicional, la invención se refiere a un método para producir una composición de anticuerpos que comprende por lo menos dos anticuerpos anti-MET, el método comprende:

- proveer por lo menos primera y segunda células hospederas, en donde la primera célula hospedera es capaz de expresar un primer anticuerpo anti-MET de la invención y la segunda célula hospedera es capaz de expresar un segundo anticuerpo anti-MET de la invención;

- cultivar la primera y segunda células hospederas bajo condiciones adecuadas para la expresión de los anticuerpos anti-MET; y

- aislar los anticuerpos resultantes.

Un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo o composición de anticuerpos de la presente invención se pueden producir por métodos generalmente conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales recombinantes. Por lo tanto, en el caso de la producción de un solo anticuerpo de la invención, cualquier método conocido en la técnica para la producción de anticuerpos monoclonales recombinantes se puede usar. Para la

producción de una composición de anticuerpos de la invención que comprende una mezcla de anticuerpos, los anticuerpos individuales que se pueden producir por separado, es decir, cada anticuerpo es producido en un biorreactor separado, o los anticuerpos individuales pueden ser producidos juntos en un solo biorreactor. Si la composición de anticuerpos se produce en más de un biorreactor, la composición de anticuerpos purificada puede obtenerse a través de la combinación de los anticuerpos obtenidos a partir de sobrenadantes purificados individualmente de cada biorreactor. Diversos enfoques para la producción de una composición de anticuerpos policlonal en múltiples biorreactores, en donde las líneas de células o las preparaciones de anticuerpos se combinan en un punto posterior en dirección 5' o antes de o durante el procesamiento en dirección 3', se describen en el documento WO 2009/129814.

En el caso de producir anticuerpos individuales en un solo biorreactor, esto se puede realizar, por ejemplo, como se describe en el documento WO 2004/061104 o WO 2008/145133. El método descrito en el documento WO 2004/061104 se basa en la integración específica de sitio de la secuencia codificadora del anticuerpo en el genoma de las células hospederas particulares, mientras que el método del documento WO 2008/145133 implica un enfoque alternativo usando la integración aleatoria para producir anticuerpos en un solo biorreactor.

Para más información acerca de los métodos adecuados para preparar los anticuerpos y composiciones de la invención se puede encontrar en el documento WO 2012/059857.

#### Animales y plantas transgénicos

Los anticuerpos anti-MET y porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención también pueden ser producidos por transgénesis mediante la generación de un mamífero o una planta que son transgénicos para las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable del mismo. En relación con la producción transgénica en mamíferos, los anticuerpos anti-MET y sus porciones pueden ser producidos en, y recuperados de, la leche de cabras, vacas u otros mamíferos. Véase, por ejemplo, las patentes de E.U.A. 5,827,690, 5,756,687, 5,750,172 y 5,741,957. Los animales no humanos transgénicos que comprenden *loci* de inmunoglobulina humana se pueden inmunizar con MET humano o una porción inmunogénica del mismo, como se describió anteriormente. Los métodos para preparar anticuerpos en plantas se describen, por ejemplo, en las patentes de E.U.A. 6,046,037 y 5,959,177.

Los animales no humanos o plantas transgénicos se pueden producir mediante la introducción de una o más moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo de la invención (por ejemplo, cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente que codifican un anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo) en el animal o planta por técnicas transgénicas estándares. Véase, por ejemplo, la patente de E.U.A. 6,417,429. Las células transgénicas usadas para fabricar el animal transgénico pueden ser células madre embrionarias o células somáticas o un óvulo fertilizado. Los organismos no humanos transgénicos pueden ser quiméricos, heterocigotos no quiméricos, y homocigotos no quiméricos. Véase, por ejemplo, Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* 2<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson et al., *Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach*, Oxford University Press (2000); y Pinkert, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press (1999). Los animales transgénicos no humanos pueden tener una alteración dirigida y reemplazo por un constructo de direccionamiento que codifica una cadena pesada y una cadena ligera de interés. Los animales no humanos o plantas transgénicos pueden comprender, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de la misma y una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno de la misma de un anticuerpo anti-MET de la invención. Los animales transgénicos pueden comprender y expresar moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesada y ligera, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a MET humano. Los anticuerpos o porciones anti-MET se pueden hacer en cualquier animal transgénico. Los animales no humanos pueden ser ratones, ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado vacuno o caballos. El animal transgénico no humano puede expresar esos polipéptidos codificados en, por ejemplo, sangre, leche, orina, saliva, lágrimas, moco y otros líquidos corporales.

#### Composiciones farmacéuticas

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo (o como el único ingrediente activo) un anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo o composición de anticuerpos anti-MET de la invención. La composición farmacéutica puede comprender cualquier composición de anticuerpos anti-MET o anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento. En algunas modalidades, las composiciones están destinadas para el uso en el tratamiento del cáncer. En ciertas modalidades, las composiciones están destinadas para el uso en el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de células papilares de riñón, glioblastoma, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, y/o carcinoma adrenocortical.

En general, los anticuerpos de la invención o porciones de unión a antígeno de los mismos son adecuados para ser administrados como una formulación en asociación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El término "excipiente" se usa en el presente documento para describir cualquier ingrediente distinto del compuesto(s) de la invención. La elección del excipiente(s) voluntad en gran medida dependerá de factores tales como el modo particular de administración, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y estabilidad, y la naturaleza de la forma de dosificación.

- Como se usa en este documento, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables son agua, solución salina, solución salina regulada en su pH con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o reguladores de pH, que potencian la vida útil o eficacia del anticuerpo.
- Las composiciones farmacéuticas de la presente invención y métodos para su preparación serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Esas composiciones y métodos para su preparación pueden encontrarse, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª Edición (Mack Publishing Company, 1995). Las composiciones farmacéuticas se fabrican preferentemente bajo condiciones de GMP (buenas prácticas de fabricación).
- Una composición farmacéutica de la invención puede prepararse, empacarse o comercializarse a granel, como una sola dosis unitaria o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Como se usa en este documento, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo es generalmente igual a la dosificación del ingrediente activo que se administra a un sujeto o una fracción conveniente de esa dosificación tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de esa dosificación.
- Cualquier método para la administración de péptidos, proteínas o anticuerpos aceptado en la técnica puede ser adecuadamente utilizado para los anticuerpos y porciones de unión a antígeno de la invención.
- Las composiciones farmacéuticas de la invención son normalmente adecuadas para administración parenteral. Como se usa en este documento, "administración parenteral" de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por la formación de una brecha física de un tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través de la brecha en el tejido, de este modo por lo general da como resultado la administración directa en el torrente sanguíneo, en el músculo o en un órgano interno. Por tanto, la administración parenteral incluye, pero no se limita a, la administración de una composición farmacéutica mediante inyección de la composición, por aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, por aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica de penetración en tejido, y similares. En particular, se contempla que la administración parenteral incluye, pero no se limita a, inyección o infusiones subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal, intravenosa, intraarterial, intratecal, intraventricular, intrauretral, intracraneal, intrasinoval; y técnicas de infusión dialítica renal. También se contempla la perfusión regional. Las modalidades preferidas incluyen las vías intravenosa y subcutánea.
- Las formulaciones de una composición farmacéutica adecuadas para administración parenteral comprenden normalmente el ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o solución salina isotónica estéril. Esas formulaciones pueden prepararse, empacarse o comercializarse en una forma adecuada para la administración en bolo o para la administración continua. Las formulaciones inyectables pueden prepararse, empacarse o comercializarse en forma de dosificación unitaria, tal como en ampollas o en envases multidosis que contienen un conservante. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas, y similares. Esas formulaciones pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales incluyendo, pero sin limitarse a, agentes de suspensión, estabilización o dispersión. En una modalidad de una formulación para administración parenteral, el ingrediente activo se provee en forma seca (es decir, polvo o granular) para reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida. Las formulaciones parenterales también incluyen soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes reguladores de pH (preferiblemente a un pH de 3 a 9), pero, para algunas aplicaciones, pueden formularse más adecuadamente como una solución no acuosa estéril o como una forma seca para usarse junto con un vehículo adecuado tal como agua estéril, libre de pirógenos. Formas de administración parenteral ilustrativas incluyen soluciones o suspensiones en soluciones acuosas estériles, por ejemplo, propilenglicol acuoso o soluciones de dextrosa. Esas formas de dosificación pueden ser adecuadamente reguladas en su pH, si se desea. Otras formulaciones parenteralmente administrables que son útiles incluyen aquellas que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina o en una preparación liposómica. Las formulaciones para administración parenteral pueden formularse para ser de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, por pulsos, controlada, dirigida y programada.
- Por ejemplo, en un aspecto, soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo o composición de anticuerpos anti-MET en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado bajo vacío y liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más

5 cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de agentes tensoactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina, y/o mediante el uso de recubrimientos de liberación modificada (por ejemplo, recubrimientos de liberación lenta).

10 Los anticuerpos de la invención pueden administrarse también por vía intranasal o por inhalación, normalmente en forma de un polvo seco (ya sea solo, como una mezcla, o como una partícula de componentes mezclados, por ejemplo, mezclado con un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado) desde un inhalador de polvo seco, como un aspersor de aerosol desde un recipiente presurizado, bomba, aspersor, atomizador (preferiblemente un atomizador que usa electrodinámica para producir una niebla fina) o nebulizador, con o sin el uso de un propulsor adecuado, o como nasales.

15 El recipiente presurizado, bomba, aspersor, atomizador o nebulizador contiene generalmente una solución o suspensión de un anticuerpo de la invención que comprende, por ejemplo, un agente adecuado para dispersar, solubilizar o extender la liberación del compuesto activo, un propelente(s) como solvente.

20 Antes de usarse en un polvo seco o formulación de suspensión, el producto fármaco se microniza en general a un tamaño adecuado para la administración por inhalación (normalmente menos de 5 micras). Esto se puede conseguir por cualquier método de trituración apropiado, tal como molienda con chorro en espiral, de lecho fluido de molienda con chorro, procesamiento de fluido supercrítico para formar nanopartículas, homogeneización a alta presión o secado por aspersión.

Las cápsulas, ampollas y cartuchos para usarse en un inhalador o insuflador se pueden formular para contener una mezcla en polvo del compuesto de la invención, una base en polvo adecuada y un modificador de rendimiento.

25 Una formulación de solución adecuada para usarse en un atomizador que usa electrodinámica para producir una niebla fina puede contener una dosis adecuada del anticuerpo de la invención por actuación y el volumen de accionamiento puede variar, por ejemplo, de 1  $\mu\text{L}$  a 100  $\mu\text{L}$ .

Sabores adecuados, tales como mentol y levomentol, o edulcorantes, tales como sacarina o sacarina sódica, pueden añadirse a las formulaciones de la invención destinadas para la administración inhalada/intranasal.

30 Las formulaciones para administración inhalada/ intranasal pueden formularse para ser de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, por pulsos, controlada, dirigida y programada.

En el caso de inhaladores de polvo seco y aerosoles, la unidad de dosificación se determina por medio de una válvula que suministra una cantidad medida. Las unidades de conformidad con la invención se disponen normalmente para administrar una dosis medida o "bocanada" de un anticuerpo de la invención. La dosis diaria total normalmente se administrará en una sola dosis o, muy habitualmente, como dosis divididas durante todo el día.

35 Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención también se pueden formular para una administración por vía oral. La administración oral puede implicar deglutir, de modo que el compuesto entra en el tracto gastrointestinal, y/o bucal, lingual, o sublingual por la cual el compuesto entra en el torrente sanguíneo directamente desde la boca.

40 Las formulaciones adecuadas para administración oral incluyen sistemas sólidos, semi-sólidos y líquidos tales como comprimidos; cápsulas blandas o duras que contienen multi o nano-partículas, líquidos o en polvo; pastillas (incluyendo rellenas de líquido); pastillas masticables; geles; formas de dosificación de dispersión rápida; películas; óvulos; aerosoles; y parches bucales/mucoadhesivos.

45 Las formulaciones líquidas incluyen suspensiones, soluciones, jarabes y elixires. Esas formulaciones pueden usarse como cargas en cápsulas blandas o duras (hechas, por ejemplo, de gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa) y normalmente comprenden un vehículo, por ejemplo, agua, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, metilcelulosa, o un aceite adecuado, y uno o más agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión. Las formulaciones líquidas también pueden prepararse por reconstitución de un sólido, por ejemplo, desde un sobre.

#### Inmunconjugados

50 Otra opción para el uso terapéutico de las composiciones y anticuerpos de anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención es en forma de inmunconjugados, es decir, anticuerpos o porciones de unión a antígeno conjugado con uno o más agentes tales como agentes anti-cáncer. Las composiciones de la invención que comprenden dos o más anticuerpos anti-MET pueden contener un único anticuerpo en la forma de un inmunconjugado, o pueden contener dos o más anticuerpos en forma de un inmunconjugado.

Varios tipos de agentes contra el cáncer se pueden conjugar a los anticuerpos de la invención, incluyendo agentes citotóxicos (por ejemplo, agentes de quimioterapia convencionales y otros fármacos de molécula pequeña contra el

cáncer), citoquinas (en cuyo caso el conjugado puede denominarse una “inmunocitoquina”), toxinas (en cuyo caso el conjugado puede denominarse una “inmunotoxina”) y radionucleidos. Unos inmunoconjugados ya han sido aprobados para uso clínico. Estos incluyen Zevalin® (un anticuerpo anti-CD20 murino conjugado con <sup>90</sup>Y), Bexxar® (un anticuerpo de murino anti-CD20 conjugado con <sup>131</sup>I) y Mylotarg® (un anticuerpo humanizado anti-CD33 conjugado con caliqueamicina). Otros inmunoconjugados que han sido probados en ensayos clínicos incluyen anticuerpos conjugados, por ejemplo, con doxorubicina o un compuesto de maitansinoide. Las inmunotoxinas que han sido probadas en ensayos clínicos incluyen varios anticuerpos conjugados a una exotoxina A de *Pseudomonas* truncada. Una inmunocitoquina que comprende un anticuerpo EpCAM humanizado conjugado con IL-2 también ha sido probado.

En el caso de anticuerpos de la invención conjugados con agentes citotóxicos, éstos pueden pertenecer, por ejemplo, a cualquiera de las clases principales de fármacos quimioterapéuticos, incluyendo agentes alquilantes (por ejemplo, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino), antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, capecitabina, gemcitabina), antraciclina (por ejemplo, bleomicina, doxorubicina, mitomicina-C) y alcaloides vegetales (por ejemplo, taxanos tales como docetaxel y paclitaxel, y alcaloides de la vinca tales como vinblastina, vincristina y vinorelbina). Puesto que el uso de inmunoconjugados dirige específicamente el agente anti-cáncer a los tumores, los inmunoconjugados basados en los anticuerpos de la invención pueden estar basados ventajosamente en agentes altamente citotóxicos tales como derivados de caliqueamicina o maitansina, o en toxinas tales como toxinas bacterianas (por ejemplo, exotoxina A de *Pseudomonas*, toxinas de la difteria) o toxinas de plantas (por ejemplo, ricina).

El agente anti-cáncer conjugado en un inmunoconjugado es generalmente enlazado al anticuerpo por medio de un enlazador lábil que es relativamente estable en suero, pero que permite la liberación del agente cuando el inmunoconjugado se internaliza en la célula objetivo. Enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, enlazadores químicos que son estables a pH neutro en el suero, pero son sometidos a hidrólisis ácida en las condiciones ligeramente ácidas dentro de los lisosomas posteriores a la internalización, enlazadores de disulfuro que se escinden por tioles intracelulares, y enlazadores peptídicos que son estables en el suero, pero que se someten a escisión enzimática en compartimentos intracelulares.

Varias disposiciones de conjugación pueden contemplarse en composiciones que contienen dos o más anticuerpos de la invención. Por ejemplo, con dos anticuerpos que se podría conjugar los anticuerpos a dos o más diferentes fármacos anti-cáncer o conjugar un anticuerpo a un profármaco que es activado por un agente tal como una enzima conjugada con el otro anticuerpo. El concepto general de la terapia con profármacos enzimáticos dirigida por anticuerpos (ADEPT) se ha descrito para los anticuerpos monoclonales, en donde un profármaco es activado por una enzima dirigida al tumor por un conjugado mAB-enzima, pero la presente invención puede proveer una oportunidad para ajustar este enfoque a condiciones particulares. Por lo tanto, puede ser posible aumentar específicamente destrucción de células tumorales sin afectar o reducir el daño a los tejidos normales.

Para más información sobre inmunoconjugados contra el cáncer, véase Wu et al., *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146 (2005); Schrama et al, *Nature Reviews/Drug Discovery* 5:147-159 (2006); y Rohrer, *Chimica Oggi/Chemistry Today* 27(5):56-60 (2009).

#### Usos terapéuticos de anticuerpos y composiciones de la invención

En un aspecto, los anticuerpos anti-MET y porciones de unión a antígeno del mismo y composiciones anti-MET de la invención se usan en el tratamiento del cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de células papilares de riñón, glioblastoma, carcinoma adrenocortical, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y otros cánceres que expresan o sobreexpresan MET o dependen de la activación de la vía MET.

En algunos aspectos, los anticuerpos o composiciones de anticuerpos se usan para tratar un cáncer, que se caracteriza por la hiperactividad anormal de MET. En algunas modalidades, la hiperactividad anormal se debe a la amplificación del gen, la sobreexpresión de proteínas, una mutación de gen de activación de MET (por ejemplo, una mutación puntual o evento anormal de empalme de genes), o la sobreexpresión de HGF.

En ciertos aspectos, los anticuerpos anti-MET y porciones de unión a antígeno de los mismos y composiciones anti-MET de la invención pueden usarse para tratar a un paciente que es resistente al tratamiento con un agente de direccionamiento de un receptor tirosina quinasa diferente. En algunas modalidades, el paciente es resistente al tratamiento con un inhibidor de quinasa ErbB. En ciertas modalidades, el inhibidor de quinasa ErbB se dirige a EGFR, ErbB2, ErbB3 o ErbB4. En una modalidad particular, el inhibidor de quinasa ErbB se dirige a EGFR. En otra modalidad, el inhibidor de quinasa ErbB se dirige a HER3. El inhibidor de quinasa ErbB puede seleccionarse de, por ejemplo, gefitinib, erlotinib, cetuximab, pantinimumab, trastuzumab, o cualquier combinación de los mismos.

“Tratar”, “tratando” y “tratamiento” se refieren a un método para aliviar o anular un trastorno biológico y/o por lo menos uno de sus síntomas concomitantes. Como se usa en este documento, “aliviar” una enfermedad, trastorno o afección significa reducir la gravedad y/o frecuencia de ocurrencia de los síntomas de la enfermedad, trastorno o condición. Además, las referencias en este documento a un “tratamiento” incluyen referencias a tratamiento curativo, paliativo y profiláctico.

En un aspecto, el sujeto del tratamiento, o paciente, es un mamífero, preferiblemente un sujeto humano. Ese sujeto

puede ser de sexo masculino o femenino, de cualquier edad.

“Cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad del agente terapéutico que se administra para aliviar en cierto grado uno o más de los síntomas del trastorno a tratar.

5 La relación entre los anticuerpos individuales en una composición terapéutica de la invención, o en el caso de los anticuerpos individuales de la invención que se administran simultáneamente, secuencialmente o por separado, a menudo será tal que los anticuerpos se administran en cantidades iguales, pero esto no tiene por qué ser necesariamente el caso. Por lo tanto, una composición de la invención que comprende dos anticuerpos anti-MET o porciones de unión a antígeno de los mismos a menudo los contiene en una relación de aproximadamente 1:1, pero  
10 dependiendo de las características de los anticuerpos individuales, puede ser deseable usar cantidades desiguales de los anticuerpos o porciones. Por ejemplo, la relación de un anticuerpo o porción con respecto a otro anticuerpo o porción en una composición de dos anticuerpos puede ser, por ejemplo, entre 5 y 95%, entre 10 y 90%, entre 20 y 80%, entre 30 y 70%, entre 40 y 60%, o entre 45 y 55%.

15 Las composiciones de anticuerpos, o anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden administrarse solos o en combinación con uno o más de otros fármacos o anticuerpos (o como cualquier combinación de los mismos). Las composiciones farmacéuticas, métodos y usos de la invención por lo tanto también abarcan modalidades de combinaciones (co-administración) con otros agentes activos, como se detalla a continuación.

Como se usa en el presente documento, se entiende que los términos “co-administración”, “co-administrado” y “en combinación con”, refiriéndose a las composiciones de anticuerpos y anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos con uno o varios de los demás agentes terapéuticos, significan, y se refieren a e incluyen lo siguiente:

20 - administración simultánea de la combinación de composición de anticuerpo/anticuerpo/porción de unión a antígeno de la invención y el agente(s) terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando los componentes se formulan juntos en una sola forma de dosificación que libera esos componentes sustancialmente al mismo tiempo al paciente,

25 - administración sustancialmente simultánea de la combinación de composición de anticuerpo/anticuerpo/porción de unión a antígeno de la invención y el agente(s) terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando los componentes se formulan aparte uno de otro en formas de dosificación separadas que son tomadas sustancialmente al mismo tiempo por el paciente, después de lo cual esos componentes son liberados sustancialmente al mismo tiempo al paciente,

30 - administración secuencial de la combinación de composición de anticuerpo/anticuerpo/porción de unión a antígeno de la invención y el agente(s) terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando los componentes se formulan aparte uno de otro en formas de dosificación separadas que son tomadas en tiempos consecutivos por el paciente con un intervalo de tiempo significativo entre cada administración, después de lo cual los componentes son liberados en tiempos sustancialmente diferentes al paciente; y

35 - administración secuencial de la combinación de composición de anticuerpo/anticuerpo/porción de unión a antígeno de la invención y el agente(s) terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando los componentes se formulan juntos en una sola forma de dosificación que libera los componentes de manera controlada con que son liberados en forma concurrente, consecutiva y/o superpuesta al mismo tiempo y/o diferentes tiempos al paciente, en donde cada parte puede ser administrada ya sea por la misma vía o por una vía diferente.

40 Las composiciones de anticuerpos y anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención se pueden administrar sin tratamientos terapéuticos adicionales, es decir, como una terapia autónoma. Alternativamente, el tratamiento con las composiciones de anticuerpos y anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención puede incluir por lo menos un tratamiento terapéutico adicional (terapia de combinación). En algunas modalidades, la composición de anticuerpos o anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se pueden administrar conjuntamente o formular con otro medicamento/fármaco para el tratamiento del cáncer. El tratamiento terapéutico adicional puede comprender, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, anti-neoplásico, o agente anti-angiogénico, un anticuerpo anti-cáncer diferente, y/o terapia de radiación.

45 Mediante la combinación de las composiciones de anticuerpos, anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de la invención con agentes conocidos para inducir la diferenciación terminal de las células cancerosas, el efecto se puede mejorar adicionalmente. Esos compuestos pueden, por ejemplo, ser seleccionados del grupo constituido por ácido retinoico, ácidos trans-retinoico, ácidos cis-retinoicos, fenilbutirato, factor de crecimiento de nervio, sulfóxido de dimetilo, forma activa de vitamina D3, receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma, 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol, hexametileno-bis-acetamida, factor de crecimiento transformante beta, ácido butírico, AMP cíclico, y vesnarinona. En algunas modalidades, el compuesto se selecciona del grupo constituido por ácido retinoico, fenilbutirato, ácido todo-trans-retinoico y la forma activa de la vitamina D.

55 Los artículos farmacéuticos que comprenden una composición de anticuerpos anti-MET o anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo de la invención y por lo menos otro agente (por ejemplo, un agente quimioterapéutico, anti-neoplásico o anti-angiogénico) puede usarse como un tratamiento de combinación para la administración simultánea, separada o sucesiva en la terapia del cáncer. El otro agente puede ser cualquier agente adecuado para el

tratamiento del cáncer en cuestión, por ejemplo, un agente seleccionado del grupo constituido por agentes alquilantes, por ejemplo, derivados de platino tales como cisplatino, carboplatino y/u oxaliplatino; alcaloides de plantas, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel y/o irinotecan; antibióticos antitumorales, por ejemplo, doxorubicina (adriamicina), daunorubicina, epirubicina, mitoxantrona idarrubicina, dactinomicina, bleomicina, actinomicina, luteomicina, y/o mitomicina; inhibidores de la topoisomerasa tales como topotecan; y/o antimetabolitos, por ejemplo, fluorouracilo y/u otras fluoropirimidinas.

También se contempla que un anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno del mismo o composición anti-MET de anticuerpo de la invención pueden usarse en terapia adyuvante en relación con inhibidores de la tirosina quinasa. Estas son moléculas sintéticas, de bajo peso molecular, derivadas principalmente de quinazolina, que interactúan con el dominio de tirosina quinasa intracelular de los receptores y que inhiben la fosforilación del receptor inducida por ligando al competir por el sitio de unión de Mg-ATP intracelular. Los artículos farmacéuticos que comprenden una composición de anticuerpos de la invención y por lo menos un TKI que se dirige a MET por lo tanto también se pueden usar como un tratamiento de combinación para la administración simultánea, separada o sucesiva en la terapia del cáncer.

En ciertos aspectos, las composiciones de anticuerpos y anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención se pueden administrar en combinación con otro inhibidor de la vía MET, que puede dirigirse a MET o HGF. En algunas modalidades, el inhibidor se selecciona del grupo constituido por, pero no se limita a, AMG 102, AMG 208, AMG 458, ARQ 197, AV299, BAY-853474, CGEN241, DN30, E7050, EMD 1204831, EMD 1214063, INCB28060, JNJ38877605, K252a, LY-2875358, MGCD265, MK-2461, MP-470, NK4, OA-5D5, PF-02341066, PF-04217903, PF-02341066, PHA-665752, SGX-523, SU5416, SU11274, TAK701, XL184, XL880, cabozantinib, crizotinib, ficlatuzumab, foretinib, golvatinib, onartuzumab, rilotumumab y tivantinib.

En algunas modalidades, las composiciones de anticuerpos y anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención se pueden administrar en combinación con un inhibidor de ErbB (tal como gefitinib o erlotinib) o un inhibidor de la proteína de choque térmico 90 (hsp90) (tal como 17-AAG).

En otras modalidades, las composiciones de anticuerpos y anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos de anticuerpos, por ejemplo, un anticuerpo contra VEGF (por ejemplo, Avastin®). En otras modalidades adicionales, las composiciones de anticuerpos de la presente invención se pueden usar en combinación con un agente conocido para estimular las células del sistema inmunológico, el tratamiento de combinación conduce al aumento en la mejora inmuno-mediada de la eficacia de las composiciones de anticuerpos de la invención. Ejemplos de esos agentes estimulantes del sistema inmunológico incluyen interleucinas recombinantes (por ejemplo, IL-21 e IL-2).

### 30 Dosis y vía de administración

Las composiciones de anticuerpos de la invención se administrarán en una cantidad eficaz para el tratamiento de la condición en cuestión, es decir, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios para alcanzar un resultado deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como la condición particular que se está tratando, la edad, el sexo y el peso del paciente, y si los anticuerpos se administran como un tratamiento independiente o en combinación con uno o más tratamientos anti-cáncer adicionales.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proveer la respuesta óptima deseada. Por ejemplo, un único bolo puede ser administrado, varias dosis divididas se pueden administrar con el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación, como se usa en el presente documento, se refiere a físicamente a unidades discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los pacientes/sujetos que han de ser tratados; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención son generalmente dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del agente quimioterapéutico y el efecto terapéutico o profiláctico en particular, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de un compuesto activo tal para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Por lo tanto, el experto en la técnica apreciaría, con base en la descripción provista en el presente documento, que el régimen de dosis y la dosificación se ajustan de acuerdo con métodos bien conocidos en las técnicas terapéuticas. Es decir, la dosis máxima tolerable puede ser fácilmente establecida, y la cantidad eficaz que provee un beneficio terapéutico detectable a un paciente también puede determinarse, al igual que los requisitos temporales para la administración de cada agente para proveer un beneficio terapéutico detectable para el paciente. Por consiguiente, mientras que ciertas dosis y regímenes de administración se representan como ejemplos en el presente documento, estos ejemplos de ninguna manera limitan el régimen de dosis y administración que puede ser provista a un paciente en la práctica de la presente invención.

55 Cabe señalar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y gravedad de la afección que se ha de aliviar, y pueden incluir dosis únicas o múltiples. Es de entenderse además que para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación

establecidos en este documento son ilustrativos solamente y no están destinados a limitar el alcance o práctica de la composición incorporada. Además, el régimen de dosificación con las composiciones de esta invención puede estar basado en una variedad de factores, incluyendo el tipo de enfermedad, la edad, peso, sexo, estado médico del paciente, la gravedad de la condición, la vía de administración, y el anticuerpo particular usado. Por lo tanto, el régimen de dosificación puede variar ampliamente, pero se puede determinar rutinariamente usando métodos estándares. Por ejemplo, las dosis pueden ser ajustadas con base en parámetros farmacocinéticos o farmacodinámicos, que pueden incluir efectos clínicos tales como efectos tóxicos y/o los valores de laboratorio. Por lo tanto, la presente invención abarca escalada de dosis intra-paciente según lo determinado por el experto en la técnica. La determinación de dosificaciones y regímenes adecuados son bien conocidos en la técnica relevante y se entiende que son abarcados por el experto en la técnica una vez que se proveen las enseñanzas descritas en este documento.

Se contempla que una dosis adecuada de una composición de anticuerpos de la invención estará en el intervalo de 0.1-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0.5 a 50 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 1-20 mg/kg. La composición de anticuerpos, por ejemplo, puede administrarse en una dosis de por lo menos 0.25 mg/kg, por ejemplo, por lo menos 0.5 mg/kg, tal como por lo menos 1 mg/kg, por ejemplo, por lo menos 1.5 mg/kg, tal como por lo menos 2 mg/kg, por ejemplo, por lo menos 3 mg/kg, tal como por lo menos 4 mg/kg, por ejemplo, por lo menos 5 mg/kg; y, por ejemplo, hasta un máximo de 50 mg/kg, tal como hasta como máximo 30 mg/kg, por ejemplo, hasta como máximo 20 mg/kg, tal como hasta como máximo 15 mg/kg. La administración normalmente se repite a intervalos adecuados, por ejemplo, una vez cada semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas, y durante el tiempo que se considere apropiado por el médico responsable, que opcionalmente pueden aumentar o disminuir la dosis según sea necesario.

Una cantidad eficaz para la terapia de tumor puede medirse por su capacidad para estabilizar la progresión de la enfermedad y/o mejorar los síntomas en un paciente, y preferiblemente de revertir la progresión de la enfermedad, por ejemplo, mediante la reducción de tamaño del tumor. La capacidad de un anticuerpo o composición de la invención para inhibir el cáncer puede ser evaluada por ensayos *in vitro*, por ejemplo, como se describe en los ejemplos, así como en modelos animales adecuados que son predictivos de la eficacia en tumores humanos. Los regímenes de dosificación adecuados se seleccionarán con el fin de proveer una respuesta terapéutica óptima en cada situación particular, por ejemplo, se administra como un único bolo o como una infusión continua, y con posible ajuste de la dosis como se indica por las exigencias de cada caso.

#### Usos de diagnóstico y composiciones

Los anticuerpos de la presente invención también son útiles en procesos de diagnóstico (por ejemplo, *in vitro*, *ex vivo*). Por ejemplo, los anticuerpos pueden usarse para detectar y/o medir el nivel de MET en una muestra de un paciente (por ejemplo, una muestra de tejido, o una muestra de fluido corporal tal como un exudado inflamatorio, sangre, suero, fluido intestinal, saliva o en la orina). Los métodos de detección y medición adecuados incluyen métodos inmunológicos, tales como la citometría de flujo, ensayos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), ensayos de quimioluminiscencia, radioinmunoensayo e inmunohistología. También se describen en el presente documento kits (por ejemplo, kits de diagnóstico) que comprenden los anticuerpos descritos en el presente documento.

Para que esta invención pueda entenderse mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son para fines de ilustración solamente.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Clonación de Anticuerpos Anti-MET

Los anticuerpos anti-MET se obtuvieron usando el procedimiento Symplex™ esencialmente como se describe en el documento WO 2005/042774. En pocas palabras, ratones BALB/c, C57 y C3H fueron inmunizados dos veces por semana con líneas celulares de cáncer humano que sobreexpresan MET (HCT-116), proteína MET humano recombinante (Sino Biologicals), proteína MET humano recombinante pre-incubada con ligando (HGF), o MET digerida con tripsina. Las células plasmáticas de murino obtenidas a partir de los bazo y los ganglios linfáticos inguinales fueron ordenados por FACS, y el enlace de las secuencias de codificación de VH y VL se realizó en las células plasmáticas ordenadas, facilitando el emparejamiento afín de las secuencias, utilizando un procedimiento de PCR de dos pasos basado en una RT-PCR de extensión de solapamiento multiplex de un paso seguido por PCR anidada. El principio para el enlace de las secuencias de VH y VL afines se describe en detalle en el documento WO 2005/042774 y en Meijer et al., *J Mol Biol* 358(3):764-72 (2006).

Para identificar anticuerpos con especificidad de unión de MET, las secuencias que codifican VH y VL obtenidas anteriormente se expresaron como anticuerpos de longitud completa. Esto implicó la inserción del repertorio de pares de codificación de VH y VL en un vector de expresión y la transfección en una célula hospedera usando el método descrito en el documento WO 2012/059858.

La especificidad de los anticuerpos producidos se determinó mediante ELISA usando como antígeno, ya sea el dominio extracelular de la proteína MET o el dominio extracelular de la proteína MET traduccionalmente fusionado a un dominio Fc de inmunoglobulina humana. Placas Nunc MaxiSorp (Cat. No. 464718) se recubrieron con 1 µg/ml de la proteína MET recombinante diluida en PBS a 4°C durante la noche. Las placas se lavaron una vez con PBS + 0.05% de Tween

20 (PBS-T) antes de bloqueo en 50 µl de 2% de leche-PBS-T. Las placas se lavaron una vez más con PBS-T, después, 20 µl de 2% de leche-PBS-T. Se añadieron 10 µl de los sobrenadantes de los transfectantes FreeStyle293 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual las placas se lavaron una vez con PBS-T. Anticuerpo secundario (cadena ligera kappa anti-humana de cabra,-HRP, Serotec, Cat No. STAR 100P) diluido 1:25000 en 2% de leche-PBS-T se añadió para detectar los anticuerpos unidos a los pozos y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron una vez en PBS-T antes de la adición de 25 µl de sustrato (Kem-En-Tec Diagnostics, Cat. No. 4518) e incubación durante 5 min. Se añadió 25 µl de ácido sulfúrico 1 M después de la incubación para detener la reacción. Se detectó señal específica en un lector de ELISA a 450 nm. A partir de los datos de ELISA, se identificaron clones de anticuerpos positivos y se seleccionaron para análisis de secuencia y validación de la unión a MET.

**Ejemplo 2: Proyección de mezclas de anticuerpos anti-MET funcionales**

Este ejemplo describe pruebas *in vitro* de anticuerpos monoclonales quiméricos dirigidos a MET y mezclas de estos anticuerpos monoclonales para identificar candidatos a líder. Se evaluaron los anticuerpos monoclonales y las mezclas por su capacidad para inhibir el crecimiento de las líneas celulares de cáncer EBC1, MKN45, OE33 y SNU5.

**Métodos**

Los anticuerpos derivados de ratón dirigidos a MET humano se analizaron para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de líneas celulares de cáncer humano *in vitro*. Los anticuerpos monoclonales y mezclas de 2-anticuerpos (mezclas 1:1 de dos anticuerpos monoclonales) se diluyeron a una concentración de anticuerpo total final de 100 µg/ml en un medio RPMI 1640 Glutamax suplementado con 2% de FBS y 1% de P/S, produciendo una concentración final de 5 µg/ml. Números correspondientes de las células (EBC1: 1500 células/pozo, MKN45: 2000 células/pozo, OE33 4300 células/pozo y SNU5: 800 células/pozo) se añadieron luego a los pozos experimentales en una placa de 384 pozos, y se incubaron con anticuerpos durante 4 días en una incubadora humidificada a 37°C. Reactivo WST-1 se añadió posteriormente a las placas, y se incubó durante una hora a 37°C. La absorbancia se midió a 450 nm y 620 nm (longitud de onda de referencia) usando un lector de ELISA. La absorbancia a 620 nm se resta de la absorbancia a 450 nM. La cantidad de células metabólicamente activas (MAC) se calculó como un porcentaje del control no tratado como sigue:

$$\% \text{ de MAC} = \frac{OD_{exp} - OD_{medio}}{OD_{no \text{ tratado}} - OD_{medio}} \times 100$$

Se supone que la actividad metabólica se correlaciona con el número de células viables, lo que significa que un menor % de MAC corresponde a un mayor nivel de inhibición del crecimiento celular por los anticuerpos.

**Resultados**

Mezclas de anticuerpos se clasificaron con base en su capacidad para inhibir el crecimiento celular entre un panel de líneas celulares de cáncer. Los resultados de viabilidad de los anticuerpos monoclonales y las mezclas de dos anticuerpos en la actividad metabólica de las líneas celulares EBC1, MKN45, OE33 y SNU5 se muestran en la tabla 3. Siete mezclas diferentes de dos anticuerpos inhiben la actividad metabólica a un promedio por debajo de 50%.

Entre las mezclas más eficaces, la combinación de los dos anticuerpos 9006 y 9338 mostró una actividad inhibidora del crecimiento de células amplia. Curiosamente, cada anticuerpo por sí solo mostró una eficacia más baja que la combinación, lo que sugiere que los dos anticuerpos pueden actuar sinérgicamente. Además de 9006+9338, puede verse en la tabla 3 que otras mezclas altamente eficaces incluyen 9206+9232, 8955+9338, 9206+9338, 9006+9232, 8955+9006, 8955+9096, y 8955+9232. Además, será evidente que estas ocho mejores mezclas se basan en relativamente pocos anticuerpos monoclonales individuales, en particular 8955, 9006, 9232, 9338 y 9206.

**Tabla 3. Efecto anti-proliferativo de anticuerpos monoclonales y las mezclas de anticuerpos**

		Actividad metabólica de células tratadas con mAb o mezcla de mAb (% de control no tratado)					
mAb o mezcla de mAb	Grupo de secuencia(s)	SNU5	OE33	MKN45	EBC1	Promedio	Rango
9206 + 9232	008 + 007	32	70	32	37	43	1
9006 + 9338	018 + 004	33	54	31	54	43	2
8955 + 9338	029 + 004	33	60	24	63	45	3

ES 2 748 295 T3

9206 + 9338	008 + 004	39	52	34	55	45	4
9006 + 9232	018 + 007	36	72	24	59	48	5
8955 + 9006	029 + 018	46	62	25	61	48	6
8955 + 9096	029 + 018	55	41	40	59	49	7
8955 + 9232	029 + 007	46	66	25	69	51	8
9206 + 9217	008 + 012	35	60	54	99	62	9
8955 + 9206	029 + 008	39	71	57	82	62	10
9044 + 9111	011 + 009	47	77	37	91	63	11
9111 + 9217	009 + 012	40	101	24	93	64	12
9111 + 9232	009 + 007	67	83	53	63	66	13
9006 + 9111	018 + 009	31	101	36	98	66	14
9111 + 9206	009 + 008	39	79	53	96	67	15
9006 + 9154	018 + 009	34	91	49	98	68	16
9096 + 9232	018 + 007	50	79	54	94	69	17
9184 + 9217	009 + 012	45	103	30	101	70	18
9184 + 9206	009 + 008	30	88	63	97	70	19
9173 + 9232	028 + 007	51	90	84	57	71	20
9006 + 9184	018 + 009	35	105	44	107	73	21
9154 + 9217	009 + 012	52	98	36	105	73	22
9212 + 9232	025 + 007	57	92	90	64	76	23
9154 + 9206	009 + 008	48	66	87	103	76	24
9096 + 9184	018 + 009	47	80	71	108	76	25
9096 + 9111	018 + 009	43	107	65	94	77	26
9173 + 9340	028 + 072	40	98	79	98	79	27
9044 + 9184	011 + 009	57	104	54	102	79	28
9184 + 9232	009 + 007	92	100	62	63	79	29
9111 + 9173	009 + 028	47	103	69	103	80	30
9111 + 9133	009 + 028	54	103	64	106	82	31
9006 + 9122	018 + 031	46	112	50	118	82	32
9096 + 9338	018 + 004	50	57	100	120	82	33
9173	028	38	99	83	108	82	34
9006 + 9146	018 + 036	61	75	79	118	83	35
9146 + 9173	036 + 028	48	115	66	105	83	36
9173 + 9184	028 + 009	44	113	70	108	84	37
8820 + 9006	044 + 018	55	103	65	115	85	38

ES 2 748 295 T3

9044 + 9154	011 + 009	59	100	67	113	85	39
8908 + 9006	032 + 018	42	110	50	138	85	40
9173 + 9206	028 + 008	47	107	74	112	85	41
9173 + 9212	028 + 025	46	99	93	102	85	42
9133 + 9232	028 + 007	77	110	88	66	85	43
9044 + 9206	011 + 008	89	65	83	107	86	44
9146 + 9232	036 + 007	105	90	86	65	86	45
8955 + 9111	029 + 009	73	96	61	117	87	46
9006 + 9173	018 + 028	43	109	84	113	87	47
9154 + 9173	009 + 028	55	104	79	112	88	48
9154 + 9232	009 + 007	94	115	73	70	88	49
9006 + 9212	018 + 025	61	79	94	120	88	50
9096 + 9154	018 + 009	73	82	83	115	88	51
9006	018	68	73	90	122	88	52
9122 + 9206	031 + 008	67	110	56	125	89	53
8820 + 8955	044 + 029	87	87	80	106	90	54
8908 + 9217	032 + 012	74	96	65	125	90	55
9006 + 9096	018 + 018	68	71	90	131	90	56
9133 + 9212	028 + 025	59	96	102	104	90	57
9122 + 9232	031 + 007	117	86	95	62	90	58
9006 + 9133	018 + 028	58	111	81	113	90	59
8955 + 9007	029 + 046	83	81	98	100	91	60
8908 + 8955	032 + 029	79	70	87	128	91	61
9096 + 9173	018 + 028	39	119	88	117	91	62
9133 + 9173	028 + 028	45	102	116	102	91	63
9217 + 9232	012 + 007	114	100	82	68	91	64
8955 + 9146	029 + 036	83	72	92	118	91	65
9122 + 9217	031 + 012	65	126	46	128	91	66
8955 + 9154	029 + 009	80	80	85	122	92	67
9133 + 9184	028 + 009	58	112	85	111	92	68
9006 + 9044	018 + 011	66	75	91	135	92	69
8955 + 8958	029 + 029	72	94	81	121	92	70
8820 + 9111	044 + 009	61	135	53	120	92	71
8955 + 9122	029 + 031	69	91	81	129	93	72
9096 + 9133	018 + 028	57	99	95	120	93	73

ES 2 748 295 T3

9006 + 9217	018 + 012	67	93	92	120	93	74
9111 + 9122	009 + 031	98	106	50	118	93	75
9146 + 9184	036 + 009	89	93	81	110	93	76
9212 + 9340	025 + 072	69	117	86	99	93	77
8820 + 9232	044 + 007	88	103	75	108	93	78
9146 + 9206	036 + 008	79	75	101	119	94	79
9044 + 9122	011 + 031	80	109	63	124	94	80
9006 + 9340	018 + 072	70	78	101	127	94	81
9173 + 9338	028 + 004	61	102	92	120	94	82
8820 + 9184	044 + 009	67	121	60	128	94	83
9006 + 9206	018 + 008	81	78	101	117	94	84
9173 + 9217	028 + 012	58	124	72	123	94	85
9133 + 9206	028 + 008	67	102	95	112	94	86
9006 + 9007	018 + 046	61	92	81	142	94	87
9212	025	86	90	101	100	94	88
9232 + 9338	007 + 004	86	93	77	122	94	89
9133	028	68	102	99	109	95	90
8820 + 9206	044 + 008	58	129	69	123	95	91
8955 + 9340	029 + 072	81	70	97	133	95	92
9111 + 9146	009 + 036	93	108	74	109	96	93
9096 + 9206	018 + 008	70	79	98	138	96	94
9133 + 9146	028 + 036	67	100	112	106	96	95
9096 + 9122	018 + 031	49	121	77	139	96	96
8906 + 9232	056 + 007	89	111	74	112	97	97
9133 + 9340	028 + 072	69	123	93	101	97	98
8908 + 9232	032 + 007	95	100	76	116	97	99
8955 + 9184	029 + 009	74	96	87	130	97	100
9044 + 9232	011 + 007	85	112	82	110	97	101
8955 + 9212	029 + 025	105	75	91	118	97	102
8899 + 8955	029 + 029	78	77	97	137	97	103
9111 + 9212	009 + 025	89	91	101	109	97	104
8820 + 9173	044 + 028	46	158	77	112	98	105
9096 + 9146	018 + 036	81	78	101	133	98	106
9096 + 9212	018 + 025	83	86	98	127	98	107
8955 + 9133	029 + 028	85	96	89	126	99	108

ES 2 748 295 T3

9212 + 9338	025 + 004	66	118	93	119	99	109
8820 + 9338	044 + 004	90	96	91	119	99	110
8906 + 9217	056 + 012	82	106	81	128	99	111
9206	008	90	86	97	125	99	112
8955 + 9173	029 + 028	69	113	94	123	100	113
9007 + 9232	046 + 007	109	99	77	114	100	114
8908 + 9111	032 + 009	93	114	79	114	100	115
9111 + 9184	009 + 009	88	99	100	115	100	116
9007 + 9217	046 + 012	89	97	90	126	100	117
8955	029	100	68	101	132	100	118
9154 + 9184	009 + 009	90	102	91	119	101	119
9122 + 9173	031 + 028	75	131	80	116	101	120
8820 + 9096	044 + 018	82	95	86	140	101	121
9111 + 9154	009 + 009	93	103	91	117	101	122
9096 + 9340	018 + 072	80	81	105	139	101	123
8908 + 9206	032 + 008	90	108	80	127	101	124
9206 + 9212	008 + 025	91	77	114	124	101	125
8820 + 9122	044 + 031	63	158	61	125	102	126
9146	036	119	92	100	100	103	127
9206 + 9340	008 + 072	103	94	94	120	103	128
8906 + 9006	056 + 018	66	142	52	152	103	129
8820 + 9133	044 + 028	63	152	80	116	103	130
8902 + 8955	029 + 029	72	87	105	149	103	131
9232 + 9340	007 + 072	115	93	85	120	103	132
8955 + 9026	029 + 029	91	75	101	146	104	133
9146 + 9212	036 + 025	110	93	106	106	104	134
9111	009	97	96	102	119	104	135
8955 + 9217	029 + 012	94	97	91	134	104	136
8820 + 9154	044 + 009	72	148	73	123	104	137
8906 + 9206	056 + 008	90	126	75	127	104	138
8820 + 9217	044 + 012	91	151	65	112	105	139
9044 + 9217	011 + 012	103	102	93	120	105	140
9232	007	115	100	84	121	105	141
9340	072	113	99	95	114	105	142
9217 + 9338	012 + 004	83	124	89	126	106	143

ES 2 748 295 T3

9096	018	90	86	103	144	106	144
9184 + 9212	009 + 025	98	103	108	114	106	145
9007 + 9173	046 + 028	67	153	95	109	106	146
8908 + 9184	032 + 009	85	127	90	123	106	147
9111 + 9340	009 + 072	107	109	101	111	107	148
9044 + 9133	011 + 028	91	132	87	119	107	149
9133 + 9154	028 + 009	90	123	101	117	108	150
8820 + 9044	044 + 011	97	138	79	117	108	151
8820 + 9212	044 + 025	82	143	87	119	108	152
9122 + 9184	031 + 009	96	140	73	124	108	153
9007 + 9206	046 + 008	89	113	95	136	108	154
9184	009	101	110	101	123	109	155
9338	004	100	98	96	141	109	156
8906 + 9111	056 + 009	112	120	84	122	110	157
9111 + 9338	009 + 004	107	121	90	121	110	158
9146 + 9340	036 + 072	112	137	90	100	110	159
9133 + 9338	028 + 004	89	133	96	120	110	160
8820 + 8906	044 + 056	86	148	80	126	110	161
9217	012	96	108	100	135	110	162
9044 + 9338	011 + 004	101	101	103	135	110	163
8908 + 9154	032 + 009	98	132	87	124	110	164
9007 + 9096	046 + 018	88	96	96	160	110	165
9212 + 9217	025 + 012	80	121	111	129	110	166
9044 + 9173	011 + 028	72	150	95	126	111	167
9007 + 9154	046 + 009	100	135	83	126	111	168
9154 + 9340	009 + 072	113	117	85	131	111	169
9338 + 9340	004 + 072	103	106	103	134	112	170
9096 + 9217	018 + 012	106	108	96	137	112	171
9007 + 9184	046 + 009	85	137	95	131	112	172
9007 + 9340	046 + 072	109	112	95	133	112	173
9044 + 9340	011 + 072	92	120	100	138	113	174
9184 + 9340	009 + 072	109	132	99	110	113	175
9122 + 9133	031 + 028	92	133	105	124	113	176
8955 + 9044	029 + 011	102	100	102	151	114	177
8906 + 9044	056 + 011	96	122	86	151	114	178

ES 2 748 295 T3

9007 + 9122	046 + 031	108	135	85	127	114	179
8820 + 9146	044 + 036	101	153	84	119	114	180
8908 + 9122	032 + 031	131	132	76	117	114	181
8906 + 9133	056 + 028	92	155	92	118	114	182
8908 + 9133	032 + 028	95	158	96	110	115	183
8908 + 9096	032 + 018	85	117	88	169	115	184
9217 + 9340	012 + 072	106	137	87	129	115	185
9133 + 9217	028 + 012	99	135	98	127	115	186
8906 + 9173	056 + 028	72	185	79	122	115	187
9007 + 9146	046 + 036	108	146	79	127	115	188
8906 + 9184	056 + 009	105	147	81	128	115	189
9007 + 9111	046 + 009	108	138	86	129	115	190
8908 + 9173	032 + 028	85	170	90	118	116	191
8908 + 9044	032 + 011	87	135	81	159	116	192
9044 + 9146	011 + 036	119	129	93	122	116	193
8908 + 9212	032 + 025	120	125	95	123	116	194
9007 + 9212	046 + 025	115	127	93	128	116	195
9044 + 9212	011 + 025	133	117	96	118	116	196
8820 + 9007	044 + 046	96	152	84	134	117	197
9044	011	115	118	98	137	117	198
8906 + 9122	056 + 031	122	148	78	120	117	199
8908 + 9340	032 + 072	106	128	94	141	117	200
9184 + 9338	009 + 004	124	129	92	126	118	201
8906 + 9154	056 + 009	119	144	79	128	118	202
9007 + 9044	046 + 011	112	129	87	145	118	203
8906 + 9212	056 + 025	133	136	86	120	119	204
9146 + 9338	036 + 004	135	126	91	123	119	205
8908 + 9338	032 + 004	106	129	101	139	119	206
9007 + 9338	046 + 004	96	136	101	144	119	207
9154	009	123	119	97	138	119	208
9122 + 9338	031 + 004	129	123	99	126	119	209
8820 + 8908	044 + 032	110	154	83	131	119	210
8820	044	111	157	88	121	119	211
9007 + 9133	046 + 028	92	166	101	119	120	212
9146 + 9217	036 + 012	123	128	104	126	120	213

9122 + 9154	031 + 009	112	151	88	129	120	214
8906 + 9096	056 + 018	93	127	86	176	120	215
8906 + 9146	056 + 036	102	176	83	121	121	216
9154 + 9212	009 + 025	135	111	110	128	121	217
8908 + 9146	032 + 036	126	150	90	121	122	218
8906 + 9340	056 + 072	106	157	95	129	122	219
9146 + 9154	036 + 009	116	130	111	132	122	220
9154 + 9338	009 + 004	137	128	88	139	123	221
8820 + 9340	044 + 072	113	143	96	140	123	222
9007	046	122	141	94	139	124	223
8906 + 8908	056 + 032	93	147	98	157	124	224
9122 + 9212	031 + 025	130	138	110	123	125	225
8908	032	135	134	96	140	126	226
8906 + 9338	056 + 004	119	166	93	129	127	227
9122 + 9146	031 + 036	146	128	109	128	128	228
8906	056	127	153	95	136	128	229
8906 + 9007	056 + 046	84	157	100	172	128	230
9044 + 9096	011 + 018	124	138	98	155	129	231
9122	031	142	134	106	136	130	232
9122 + 9340	031 + 072	146	150	98	125	130	233
8908 + 9007	032 + 046	109	152	101	169	133	234
8906 + 8955	056 + 029	136	167	99	150	138	235

### **Ejemplo 3: Humanización de los anticuerpos 9006 y 9338**

Este ejemplo describe la humanización de las regiones de marco de anticuerpos de murino de los anticuerpos 9006 y 9338. La humanización de anticuerpos se lleva a cabo para producir una molécula con inmunogenicidad mínima cuando se aplica a seres humanos, mientras conserva la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano progenitor.

#### 5 Métodos

La humanización de los anticuerpos 9006 y 9338 se llevó a cabo usando el enfoque de “injerto de CDR”. En primer lugar, los genes de la línea germinal de murino original fueron identificados sometiendo a BLAST las secuencias de genes de V 9006 (Figura 26) y 9338 (Figura 27) contra las bases de datos de genes de línea germinal de ratón V y J. Esto indica que los genes de la línea germinal del ratón más cercanos fueron IGHV9-1\*02/IGHJ4\*01 e IGKV8-28\*01/IGKJ2\*01 para los genes pesados variables y ligeros variables de 9006, respectivamente. De manera similar, los genes de la línea germinal de ratón más cercanos fueron IGHV1-4\*01/IGHJ3\*01 e IGKV4-79\*01/IGKJ4\*01 para los genes pesados variables y ligeros variables de 9338, respectivamente. En segundo lugar, los genes VH y VL del anticuerpo fueron alineados contra las líneas germinales de murino para identificar mutaciones somáticas en las regiones de marco que pueden desempeñar un papel en la función y/o estructura del anticuerpo. Esos residuos pueden incluirse en los genes de anticuerpos humanizados finales llamados residuos de “retromutación”. Las secuencias de anticuerpos variables 9006 y 9338 fueron entonces sometidas a BLAST contra las bases de datos de inmunoglobulina humana para identificar las líneas germinales humanas más cercanas cuyas regiones de marco serán usadas para la humanización de anticuerpos. Para el anticuerpo 9006, las líneas germinales humanas retenidas fueron IGHV7-4-1\*02/IGHJ6\*01 e IGKV4-1\*01/IGKJ2\*01 para los genes pesados variables y ligeros variables, respectivamente. Para el anticuerpo 9338, las líneas germinales humanas retenidas fueron IGHV1-69\*08/IGHJ1\*01 e IGKV3-11\*01/IGKJ2\*01 para los genes pesados variables y ligeros variables, respectivamente. Por último, para cada anticuerpo, las regiones CDR de los anticuerpos quiméricos se injertaron en el marco humano seleccionado y segmentos de gen J. Las

secuencias de CDR fueron asignadas de acuerdo con definiciones de IMGT®.

### Resultados

Las secuencias finales de anticuerpo humanizado 9006 y 9338 se muestran en la figura 28 y la figura 29, respectivamente.

#### 5 **Ejemplo 4 Clonación de análogos de anticuerpo de referencia anti-MET**

Este ejemplo da una lista de las fuentes de las secuencias de aminoácidos y el formato final de anticuerpo usado para la generación de análogos de anticuerpo de referencia anti-MET. Algunos de los anticuerpos listados se han caracterizado ampliamente y tienen epítomos bien definidos. Un número de los anticuerpos también han entrado en evaluación clínica.

### Métodos

10 Las secuencias de aminoácidos que codifican los dominios de cadena pesada y ligera variables de los análogos de anticuerpos de la tabla 4 se obtuvieron de las patentes o solicitudes de patentes listadas. Las secuencias de proteína se tradujeron en forma inversa a secuencias de ADN con el uso de codones humanos. Las secuencias de ADN correspondientes fueron sintetizadas por genes y clonadas en vectores de expresión que contenían dominios de cadena pesada o ligera humanos constantes, lo que da por resultado la expresión de anticuerpos de longitud completa. Una  
 15 excepción fue para el anticuerpo 5D5 que se expresó como un fragmento Fab. El isotipo de anticuerpo humano seleccionado para la expresión se lista en la columna del formato de anticuerpos junto con otras mutaciones introducidas en la región Fc en donde es aplicable. Las células CHO se transfectaron con los plásmidos de expresión correspondientes usando un sistema de expresión de proteína estándar, con la excepción del clon de hibridoma HB-12093, que se cultivó usando la técnica de cultivo de hibridoma estándar. Los sobrenadantes de anticuerpos  
 20 correspondientes fueron purificados usando cromatografía en columna de purificación de proteína A estándar.

**Tabla 4. Listado de análogos de anticuerpos sintetizados por genes y el formato de anticuerpo correspondiente**

Clon de anticuerpo	Código de búsqueda	Formato de anticuerpo	Referencia
224G11	ABT-700, h224G11	IgG1 recombinante	EP2014681A1
223C4	N.A.	IgG1 recombinante	EP2014681A1
C8-H241	LY2875358, LA480, emibetuzumab	IgG4 recombinante (S228P, F234A, L235A)	WO2010059654A1
36C4	ARGX-111	IgG1 recombinante	US2012/0148607A1
5D5	OA-5D5, MetMAb, onartuzumab	IgG1 Fab recombinante	US 7476724 B2
13-MET	N.A.	IgG1 recombinante	WO2009/142738 A2
28-MET	N.A.	IgG1 recombinante	WO2009/142738 A2
HB-12093	N.A.	Hibridoma de ratón	EP 0922102

#### **Ejemplo 5: Clasificación de epítomos de anticuerpos MET**

25 Este ejemplo ilustra cómo los anticuerpos MET se agruparon en clases de epítomos con base en los patrones de competencia por parejas. Los anticuerpos pertenecientes a diferentes clases de epítomos reconocen diferentes epítomos en el dominio extracelular MET (ECD).

### Métodos

30 La investigación de la competencia por parejas de anticuerpos se realizó por análisis de Interferometría de bio-capta (BLI) usando un instrumento Octet QK384 (Fortebio, E.U.A.). Proteína de fusión Fc de MET humano comercialmente disponible (R&D Systems) fue capturada en los chips de sensores de Fc anti-humano (Fortebio, E.U.A.) y los sitios anti-Fc residuales bloqueados con anticuerpo de control negativo Herceptin. La superficie revestida de antígeno se saturó con una concentración de anticuerpo anti-MET de 80 µg/ml, seguido por la evaluación de combinaciones de anticuerpos anti-MET por parejas en experimentos de unión competitiva. La superficie del sensor se regeneró por incubación con 10 mM de glicina-HCl, pH 1.5 y se reutilizó para un nuevo ciclo de competencia.

### Resultados

El patrón de competencia de los 13 anticuerpos MET probados se presenta en la figura 1. Se encontró que los anticuerpos MET se agrupan en 12 clases de epítomos distintas. Se encontró que el anticuerpo Hu9006 se une a un epítomo distinto que se traslapó con C8-H241. Sin embargo, el epítomo fue diferente en comparación con C8-H241, ya que C8-H241 también fue bloqueado por Hu9338 y 36C4, mientras que Hu9006 no lo fue. Por consiguiente, Hu9006 y C8-H241 fueron asignados a diferentes clases de epítomo. El epítomo de Hu9338 superpuesto con 36C4 y ambos anticuerpos mostraron patrones de competencia idénticos con otros anticuerpos en el panel probado, y éstos, por consiguiente, fueron asignados a la misma clase de epítomo.

Los anticuerpos 224G11, 28-MET, 5D5, 9206 y 13-MET mostraron en algunos casos inhibición unidireccional. Este fenómeno observado podría ser causado por efectos alostéricos y se observó en los experimentos de competencia repetidas.

#### **Ejemplo 6: Análisis de anticuerpos MET para actividad de bloqueo de ligando HGF**

Este ejemplo ilustra cómo se analizó el panel de anticuerpos anti-MET de HGF para actividad de bloqueo de ligando mediante la modalidad de un ensayo de competencia usando el análisis de interferometría de bio-capa.

#### Métodos

La investigación de la actividad de bloqueo de ligando HGF se realizó por análisis de interferometría de bio-capa (BLI) usando un instrumento Octet QK384 (Fortebio, E.U.A.). Proteína de fusión Fc de MET humano comercialmente disponible (R&D Systems) fue capturada en los chips de sensores de Fc anti-humano (Fortebio, E.U.A.) y los sitios anti-Fc residuales bloqueados con anticuerpo de control negativo Herceptin. A continuación, la superficie revestida de antígeno se saturó con una concentración de anticuerpo anti-MET de 80 µg/ml (533 nM), excepto para el fragmento 5D5 Fab, que se diluyó a 26.7 µg/ml (533 nM). Después de la saturación de MET con la actividad de bloqueo de anticuerpos de ligando HGF se evaluó mediante incubación con ligando HGF humano (R&D Systems) probado en 20 µg/ml (222 nm). Herceptin IgG1 se usó como anticuerpo de control negativo.

#### Resultados

El resultado del análisis de la competencia se presenta en la siguiente tabla 5. Se encontró que los anticuerpos Hu9006 y Hu9338 inhibieron la unión al ligando HGF en aproximadamente 80%, mientras se encontró que 5D5 Fab bloqueó completamente la unión a HGF (100%). Cuando se mezclaron concentraciones equimolares de Hu9006 y Hu9338 (80 µg/ml de concentración total, 533 nM), la unión a ligando HGF fue inhibida por aproximadamente 90%. Por consiguiente, la actividad de bloqueo de ligando HGF más eficaz se obtuvo mezclando anticuerpos Hu9006 y Hu9338 1:1. Se encontró que los anticuerpos C8-H241 y 36C4 inhibieron la unión a ligando HGF por aproximadamente 80 y 75%, respectivamente, mientras que los anticuerpos 13-MET y 28-MET bloquearon la unión a HGF por aproximadamente 80 y 50%, respectivamente. El anticuerpo agonista 5882 y el anticuerpo control negativo Herceptin no bloquearon la unión a HGF (3-7% de inhibición de unión a HGF).

**Tabla 5. Inhibición de unión a HGF después de la saturación de anticuerpos MET**

<b>Anticuerpo</b>	<b>% de inhibición de unión a HGF</b>
Hu9006	78
Hu9338	81
5882	3
Hu9006 + Hu9338	89
C8-H241	81
36C4	74
224G11	20
223C4	69
13-MET	81
28-MET	50
HB-12093	9
5D5 Fab	100

12398	84
9206	62
Herceptin	6

### **Ejemplo 7: Mapeo de epítomos de anticuerpos anti-MET**

Este ejemplo ilustra cómo los epítomos de unión de los anticuerpos MET de la invención se mapearon a la hoja 2 o 3 en el dominio SEMA- $\alpha$ , mediante el análisis de unión a constructos de MET quiméricos expresados en las células. El ejemplo también ilustra cómo los epítomos de los anticuerpos de la invención son distintos en comparación con los análogos de anticuerpos de referencia probados.

#### Métodos

El receptor de MET humano consta de un dominio extracelular de 907 aminoácidos (residuos 25-932). El dominio extracelular puede ser subdividido en el dominio SEMA (residuos 27-515), un dominio Plexin Semaforina Integrin rico en cisteína (dominio PSI, residuos 520-561) y cuatro dominios tipo inmunoglobulina definidos por las siguientes secuencias de aminoácidos. IPT1: AA 563-655. IPT2: AA 657-739. IPT3: AA 742-836. IPT4: AA 837-932. Las definiciones de dominio se describen en Gherardi et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 100(21):12039-44 (2003) y entrada Uniprot P08581. El dominio SEMA consta de siete láminas beta (hojas) que se pliegan en una estructura de hélice de siete hojas (Stamos J. et al, *EMBO J.* 23:2325-2335 (2004)). Un sitio de escisión de furina está presente en la posición 307-308, dividiendo el dominio SEMA en cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . El dominio SEMA- $\alpha$  es codificado por los residuos de aminoácidos 27-307 que componen las láminas 1-4 y el dominio SEMA- $\beta$  es codificado por los residuos de aminoácidos 308-515 que componen las láminas 5-7. El dominio SEMA- $\alpha$  contiene un sitio de unión para la cadena  $\beta$  del ligando HGF, mientras que el sitio de unión a MET de la cadena-  $\alpha$  de HGF sigue siendo difícil de alcanzar (Merchant et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 110(32):E2987-96 (2013)). Un solo reporte afirma que los dominios IPT3 e IPT4 de MET ECD también median la unión a HGF de alta afinidad (Basilico et al., *J Biol Chem* 283 (30):21267-21277 (2008)).

La secuencia de ARNm de la isoforma 1 de MET humano ha sido descargada de NCBI (ACCESO NM\_000245.2; la secuencia de aminoácidos está representada en SEQ ID NO: 1). MET humano también existe en una isoforma diferente (isoforma 2) en la que 19 aminoácidos (STWWKEPLNIVSFLFCFAS (SEQ ID NO: 2)) reemplazan a S755 en el dominio IPT 3. La secuencia de aminoácidos de la isoforma 2 se muestra como SEQ ID NO: 2. Las secuencias de proteína MET de pollo y de murino de longitud completa incluyendo secuencias de péptido líder se descargaron de NCBI (ACCESO NP\_990543 (SEQ ID NO: 3) y NP\_032617 (SEQ ID NO: 4), respectivamente). Variantes de intercambio de dominio humano/de pollo quimérico del dominio extracelular (ECD), en donde cada dominio o subdominio fue reemplazado secuencialmente por secuencia de ADN de pollo, se sintetizaron por genes junto con genes de ECD de MET completamente humano, de murino o de pollo. Constructos quiméricos en donde cada uno de las siete hojas en el dominio SEMA se intercambiaron secuencialmente de la secuencia humana a la de ratón también se sintetizaron.

Las constructos usados para determinar la especificidad de unión de hoja fueron los siguientes (los números se refieren a la secuencia intercambiada con la secuencia de ratón): Hoja de ratón 1: AA 25-83. Hoja de ratón 1-2: AA 25-162. Hoja de ratón 1-3: AA 25-233. Hoja de ratón 1-4: AA 25-295. Hoja de ratón 1-5: AA 25-430. Hoja de ratón 1-6: AA 25-479. Hoja de ratón 1-7: AA 25-513. También se hicieron constructos inversos. PSI-IPT4 de ratón: (AA 515-932). Hoja de ratón 7-IPT4: (AA 480-932). Hoja de ratón 6-IPT4: (AA 431-932). Hoja de ratón 5b-IPT4: (AA 382-932). Hoja de ratón 5a-IPT4: (AA 293-932). Hoja de ratón 4-IPT4: (AA 234-932). Hoja de ratón 3-IPT4: (AA 163-932). Hoja de ratón 2-IPT4: (AA 84-932). Las hojas 1-4 se encuentran en el subdominio SEMA- $\alpha$  y las hojas 5-7 en el subdominio SEMA- $\beta$ .

Recientemente otros constructos quiméricos en donde las secuencias de llama se intercambiaron con secuencias humanas en el dominio SEMA de MET se han descrito (Basilico C. et al *J. Clin Invest* 124:3172-3186 (2014)). Estos constructos se sintetizaron también, pero con la modificación de que la secuencia de ratón se insertó en lugar de la secuencia de llama, ya que la secuencia de MET de llama no estaba públicamente disponible. Las definiciones de secuencia para las proteínas quiméricas adicionales fueron las siguientes (los números AA se refieren a secuencia intercambiada a la secuencia de ratón): LS1: AA25-122, LS2: AA25-224, LS3: AA25-312, LS4: AA25-371, LS5: AA25-473. LS1-3 residen en el subdominio SEMA- $\alpha$  y LS4-6 en el subdominio SEMA- $\beta$ . Por último, los constructos en donde 15 AA de la secuencia de ECD de MET humano en el subdominio SEMA- $\alpha$  fueron intercambiados en forma secuencial a la secuencia de ratón se sintetizaron para el mapeo más detallado de epítomos lineales. Para el constructo 109-120 sólo 11 aminoácidos se intercambiaron con la secuencia del ratón. Cada constructo fue diseñado para superponerse con 2 aminoácidos, y en total 22 constructos con hasta 15 sustituciones de AA se hicieron cubriendo la secuencia del subdominio SEMA- $\alpha$  de MET humano después de la hoja 1 (AA 89-313).

Todos los constructos quiméricos o de tipo silvestre sintetizados descritos anteriormente se subclonaron en vectores de expresión que contenían una etiqueta de péptido SV5, un enlazador de glicina serina y la secuencia de codificación para un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que resultó en la fusión C-terminal de este casete para el gen de interés (Bouquin T. et al., *J. Biotechnol.* 125:516-528 (2006)). Los constructos de expresión generados se usaron para transfección FreeStyle™ transitoria de células HEK293 y las proteínas de fusión producidas fueron dirigidas a la

membrana celular a través del anclaje GPI. Los anticuerpos MET se analizaron para la unión a las células transfectadas mediante citometría de flujo usando un iQue® Screener (corporación IntelliCyt). Los anticuerpos se probaron en un experimento de titulación de 8 puntos usando diluciones de 3 veces a partir de 50 µg/ml y detección con un colorante anti-IgG-humana (H+L) Alexa Fluor® 647. Los niveles de expresión de los constructos de MET fueron monitorizados por anti-SV5 mAb MCA1360B biotinilada y detección con estreptavidina APC Cy7. Los valores de corte se definen como la fluorescencia la señal promedio de todos los anticuerpos probados a 50 µg/ml para el constructo MET de pollo o ratón de control negativo + cuatro desviaciones estándar para discriminar la unión de fondo de la unión específica para el intercambio de dominios o constructos de intercambio de hojas. La unión de anticuerpos a constructos, en donde los aminoácidos individuales o 15 aminoácidos se intercambiaron con la secuencia de ratón se normalizaron a unión 5D5 probada a 3 µg/ml, ya que las mutaciones se localizaron en el subdominio SEMA-α y se mostró que no influyeron en la unión de 5D5 dirigida contra el subdominio SEMA-β.

### Resultados

El nivel de expresión de superficie de los constructos ECD de MET humano, de pollo o de ratón de tipo silvestre y quimérico se evaluó con tinción SV5. Todos los constructos evaluados expresaron bien y pudieron ser teñidos con el anticuerpo SV5, excepto el constructo que contenía el subdominio SEMA-β de pollo. Se evaluaron los títulos de cada anticuerpo MET que se unía a los constructos (no se muestran datos). Un resumen del anticuerpo que se une a los diferentes constructos quiméricos probados se presenta en la figura 2. Un resumen de anticuerpo diferencial que se une a constructos ECD de MET humano en donde 15 segmentos AA en el subdominio SEMA-α se intercambiaron secuencialmente a ratón se presenta en la tabla 6, y un resumen del anticuerpo diferencial que se une a constructos ECD de MET humano en donde los residuos expuestos en la superficie en el subdominio SEMAα se mutaron a la secuencia de ratón se presenta en la tabla 7. Por último, un resumen de todos los hallazgos de epítipo se muestra en la tabla 8.

Se encontró que todos los anticuerpos probados, excepto 5D5 y 224G11 se unieron al subdominio a la SEMA-α.

El mapeo de epítipos fino usando los constructos quiméricos que introduce mutaciones en el dominio SEMA-α ilustra que Hu9338 se une a un epítipo lineal situado en la hoja 2, como se ilustra por una pérdida significativa de unión (36% de unión en comparación con 5D5), cuando el segmento de secuencia AA 99-113 se intercambió a ratón (Tabla 6). El epítipo para Hu9338 fue distinto y no se encontró en los otros anticuerpos en el panel de MET probado. Se encontró que Hu9006 se une a un epítipo presente en un fragmento de la hoja 3 (AA 163 a 224). Ninguno de los constructos de MET mutados mediante mutación puntual de aminoácido individual o constructos de MET con secuencia de MET de ratón insertada de 15 AA mostró unión significativamente diferente de hu9006 en comparación con ECD de MET totalmente humana. Por consiguiente, el epítipo de hu9006 fue distinto en comparación con los otros miembros del panel de anticuerpos anti-MET. El hallazgo de que Hu9338 y Hu9006 se unieron a epítipos situados en la hoja 2 y 3 respectivamente fue coherente con que estos anticuerpos no son competitivos y que pertenecen a diferentes clases de epítipo.

También se encontró que el anticuerpo agonista 5882 se unen a la hoja 3 (AA 163-224), pero con residuos de contacto en las posiciones F206, D208, H209 y P210 como se revela en por lo menos un 50% o menos en comparación con la unión de 5D5, cuando se intercambian estas posiciones a la secuencia de ratón. Es importante destacar que estas mutaciones estrechamente ubicadas no afectaron significativamente la unión de los otros anticuerpos en el panel, lo que ilustra que la fuerte actividad agonista de 5882 se relaciona con la unión de la región definida por estas 4 sustituciones.

Se encontró que el anticuerpo C8-H241 se une a epítipos situados en la hoja 2 y 3. Aunque los constructos de intercambio de hojas mostraron que este anticuerpo se une a un epítipo importante en la hoja 3 (AA 163-224), podría obtenerse un mayor refinamiento de epítipo por la reducción observada de la unión a constructos donde 15 AA en la hoja 2 (AA 119-133) o 24 AA en la hoja 3 (AA 209-233) se intercambiaron a la secuencia de ratón (68-30%, respectivamente, en comparación con la unión a 5D5). Por último, un residuo de contacto identificado en la hoja 3 (K223), que dio como resultado sólo 19% de unión en comparación con 5D5 indicó que el epítipo del núcleo del anticuerpo C8-H241 se encuentra en la hoja 3. Los resultados concordaron bien con los datos publicados previamente (Liu L. et al, Clin Cancer Res 20:6059-6070 (2014)) que muestra que los epítipos lineales de C8-H241 según lo determinado por espectroscopia de masas de intercambio HD estaban presentes en las posiciones 123-128, 144-156, 192-195 y 220-227.

Por último, los inventores de la presente han sido capaces de mapear el epítipo de 36C4 de forma más precisa. Mientras Basilico et al. (Basilico C. et al., J. Clin Invest 124:3172-3186 (2014)) describieron que el epítipo de 36C4 estaba presente en la lámina 2 y 3 (AA 98 a 199), se demostró que la especificidad se puede dividir en un epítipo lineal en la posición 129-143 en la hoja 2 (58% de unión en comparación con 5D5) y un residuo de contacto en la posición H209 en la hoja 3 (43% de unión en comparación con 5D5). El residuo de contacto en la posición H209 también fue compartido con el anticuerpo agonístico 5882, pero puesto que 5882 se unió también a otros tres residuos de contacto cercanamente ubicados, la unión y por lo tanto las propiedades agonistas son claramente diferentes.

La estructura cristalina de unión de 5D5 al dominio SEMA ha sido publicada anteriormente (Merchant M. et al., Proc Natl Acad Sci USA 110:E2987-E2996 (2013)), y el estudio mostró que 5D5 reconoció principalmente la hoja 5 y 6 en el subdominio SEMA β. Los residuos de aminoácidos clave en las posiciones Q328, R331, L337 y N338 estuvieron

presentes en la hoja 5, y cuando mutaron a residuos de ratón éstos redujeron significativamente la afinidad de unión. Este resultado concuerda con el análisis de unión de los inventores que mostró claramente que 5D5 reconoció un epítipo crucial en la hoja 5 (AA 313-371).

5 Los inventores también encontraron que el anticuerpo 224G11 reconoció el dominio ITP1 de acuerdo con la información provista por Basilico y sus colegas (Basilico C. et al., J. Clin Invest 124:3172-3186 (2014)).

**Tabla 6. Unión del anticuerpo a constructos ECD de MET humano expresados en células HEK293, donde 15 segmentos AA en el dominio SEMA- $\alpha$  se intercambian en forma secuencial a ratón**

Constructo	Hu9338	Hu9006	C8-H241	36C4	5D5	Cetuximab
MET 99-113	36	112	113	94	100	2
MET 119-133	131	88	68	107	100	2
MET 129-143	124	97	77	58	100	2
MET 209-223	133	114	57	96	100	2
MET 219-233	130	141	30	109	100	2
MET humano	144	137	135	162	100	1

La unión de anticuerpo se expresa como el porcentaje de unión a 5D5. Las celdas grises indican menos de 70% de unión del anticuerpo en comparación con 5D5.

10 **Tabla 7. Unión del anticuerpo a constructos ECD de MET humano expresados en células HEK293, donde los residuos expuestos en la superficie en el dominio SEMA- $\alpha$  dominio se intercambiaron a ratón**

Constructo	Hu9338	Hu9006	5882	C8-H241	36C4	5D5
F206P	127	96	31	103	104	100
D208G	75	69	39	95	71	100
H209Y	94	90	49	84	43	100
P210S	100	79	18	105	89	100
K223Q	198	112	96	19	127	100
MET humano	149	134	96	77	115	100

La unión de anticuerpo se expresa como el porcentaje de unión a 5D5. Las celdas grises indican menos de 50% de unión del anticuerpo en comparación con 5D5.

15 **Tabla 8. Resumen de los epítopos de unión identificados para anticuerpos MET probados usando constructos de MET mutados expresados en la superficie celular**

Anticuerpo	Dominio	Hoja SEMA	Fragmento quimérico Residuos (AA)	Epítipo lineal	Residuos de contacto	Clase de epítipo	Bloqueo de HGF
Hu9338	SEMA- $\alpha$	2	AA 84-122	BL 2 AA 99-113	N.D.	Clase 8	Sí
C8-H241	SEMA- $\alpha$	2-3	AA 163-224	BL 2 AA 119-133 BL 3 AA 209-233	BL 3 K223	Clase 7	Sí
36C4	SEMA- $\alpha$	2-3	AA 84 - 224	BL 2: 129-143	BL 3 H209	Clase 8	Sí
Hu9006	SEMA- $\alpha$	3	AA 163-224	N.D.	N.D.	Clase 6	Sí
5882	SEMA- $\alpha$	3	AA 163-224	N.D.	BL 3 F206, D208, H209,	Clase 9	No

					P210		
5D5	SEMA-â	5	AA 313-371	N.D.	N.D.	Clase 4	Sí
224G11	IPT1	N.A.	AA 562-652	N.D.	N.D.	Clase 1	Sí

Abreviaturas: AA: secuencia de aminoácidos. N.A.: No aplicable. N.D.: No determinado. B.L.: Hoja.

**Ejemplo 8: Mediciones de afinidad para anticuerpos anti-MET quiméricos y humanizados**

Este ejemplo demuestra que las variantes humanizadas de los anticuerpos anti-MET 9006 y 9338 tienen afinidades comparables a sus contrapartes quiméricas, lo que indica que los anticuerpos humanizados tienen la actividad funcional completa de los anticuerpos quiméricos. Además, los anticuerpos anti-MET humanizados muestran unión comparable a ECD de MET tanto de humanos como de cynomolgus.

Métodos

El análisis cinético de unión de las variantes 9006 y 9338 humanizadas y quiméricas purificadas se realizó en un biosensor de interferometría de bio-capa Octet QK384 (BLI) (Fortebio, E.U.A.) o un biosensor de resonancia de plasmón de superficie XPR-36 (SPR) (Bio-Rad, E.U.A.).

Antígenos de ECD de MET humanos o de cynomolgus con etiqueta His fueron adquiridos de Sinobiological, China. La cinética de unión se midió bajo condiciones de antígeno monovalente mediante la inmovilización de anticuerpos anti-MET y al mantener el antígeno MET monovalente en solución como se ha descrito anteriormente (Canziani et al, Anal. Biochem. 325(2):301-307 (2004)). La densidad de anticuerpo anti-MET más baja posible se aplicó para evitar la unión no específica y limitación de transporte de masa. Para medir la cinética de anticuerpos en el sistema Octet, los anticuerpos a una concentración de 1.5 µg/ml fueron capturados en los sensores de Fc anti-humano (Fortebio, E.U.A.), y se probaron para la unión a antígeno ECD de MET humano (100 nM) dos veces diluido en serie siete veces. Las mediciones se llevaron a cabo con una velocidad de rotación la placa de 1000 rpm y los sensores se regeneraron y se reutilizaron por breves alternancias de 5 segundos entre la exposición a 10 mM de glicina:regulador de pH de HCl (pH 1.5) o regulador de pH PBS que contenía 1% de BSA y 0.001% de Tween 20 tres veces. Para los experimentos de resonancia de plasmón de superficie realizados en el instrumento Bio-Rad XPR-36, los anticuerpos anti-MET se ajustaron a una concentración de 0.25-0.5 µg/ml y se capturaron sobre las superficies de IgG Fc anti-humano generadas por la inmovilización de un anticuerpo Fc anti-humano monoclonal (Biacore, Dinamarca). Los anticuerpos anti-MET se probaron para la unión a ECD de MET humano o de cynomolgus en un intervalo de concentración 2 veces de 25 nM a 1.56 nM seguido por la regeneración de las superficies con regulador de pH de regeneración MgCl<sub>2</sub> 3 M (Biacore, Dinamarca). Las respuestas de unión registradas se ajustaron a un simple modelo Langmuir 1:1 para el cálculo de la velocidad de asociación ( $k_{asoc.}$  o  $k_a$ ), velocidad de disociación ( $k_{dis.}$  o  $k_d$ ) y afinidad (KD) usando doble referencia.

Resultados

Las mediciones cinéticas usando el biosensor Octet mostraron que la variante humanizada de 9006 con 3 mutaciones de retroceso (Hu9006) y la variante humanizada de 9338 (Hu9338) sin mutaciones de retroceso tienen afinidad ligeramente mejorada para el antígeno MET humano en comparación con los anticuerpos progenitores quiméricos (Tabla 9).

**Tabla 9. Cinética de unión de anticuerpos MET quiméricos y humanizados a ECD de MET humano como se miden mediante interferometría de bio-capa (BLI)**

Anticuerpo	ECD de MET	$k_{asoc.}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Error de $k_{kon}$	$k_{dis.}$ (s <sup>-1</sup> )	Error de $k_{dis.}$	$K_D$ (M)
9006	humano	5.4E+04	± 4.4E+02	1.2E-04	± 2.2E-06	2.2E-09
hu9006	humano	6.2E+04	± 6.8E+02	7.6E-05	± 3.1E-06	1.2E-09
9338	humano	1.9E+05	± 2.7E+03	1.1E-04	± 4.0E-06	6.0E-10
hu9338	humano	1.0E+05	± 2.0E+03	2.7E-05	± 3.6E-06	2.6E-10

Las mediciones cinéticas usando el instrumento Bio-Rad XPR36 SPR mostraron que Hu9006 y Hu9338 reconocen ECD de MET tanto humano como de cynomolgus con afinidades en el intervalo de pM (Tabla 10).

**Tabla 10. Cinética de unión de anticuerpos MET humanizados a ECD de MET humano o de cynomolgus como se mide por resonancia de plasmón de superficie (SPR)**

Anticuerpo	ECD de MET	$k_{\text{asoc.}}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )		Error de kon	$k_{\text{dis.}}$ (s <sup>-1</sup> )		Error de $k_{\text{dis.}}$	$K_D$ (M)
hu9006	humano	1.9E+05	±	1.2E+03	1.1E-05	±	2.3E-07	5.5E-11
hu9006	cynomolgus	1.8E+05	±	1.5E+03	1.6E-05	±	2.9E-07	8.6E-11
hu9338	humano	4.7E+05	±	1.9E+02	6.3E-06	±	3.7E-07	1.4E-11
hu9338	cynomolgus	7.4E+05	±	2.2E+03	5.4E-05	±	3.6E-07	7.4E-11

### **Ejemplo 9: Degradación de MET con anticuerpos anti-MET**

Este ejemplo demuestra que los anticuerpos anti-MET 9006 y 9338 inducen la degradación de MET, solos y en combinación. La combinación de los dos anticuerpos induce la degradación más eficaz del receptor MET que cualquier anticuerpo solo.

#### 5 Métodos

Para investigar el nivel de degradación del receptor MET inducida por anticuerpos anti-MET individuales 9006 y 9338, la mezcla de 9006 y 9338, y el análogo de C8-H241 (véase la tabla 4), se realizó el análisis Western Blot o análisis Western simple en lisados de células enteras de células SNU5, EBC1 y MKN45 tratadas con anticuerpo durante 24 o 48 horas. En resumen, las células fueron cultivadas en matraces de cultivo T-75, y cuando hubo 50% de confluencia se eliminó el medio de cultivo, las células se lavaron y se trataron con una concentración de anticuerpo total de 20 µg/ml de cualquiera de C8-H241, 9006, 9338, 9338+9006, o un anticuerpo control negativo (IgG1 humana frente a un objetivo no mamífero) durante 24 o 48 horas en una incubadora humidificada a 37°C. Lisados de células enteras se prepararon usando regulador de pH RIPA estándar. La concentración total de proteína se determinó usando un ensayo de BCA y 1-10 µg de proteína analizada por el inmunoensayo automatizado de Western simple en un instrumento Sally (ProteinSimple) o por análisis Western Blot usando anticuerpos de detección primaria contra MET. Un anticuerpo contra actina β se usó como control de carga para el análisis Western Blot.

#### Resultados

Los resultados de la investigación Western Blot (Figura 3) muestran que el tratamiento con los anticuerpos individuales (especialmente 9006) induce una cierta degradación de MET en todas las líneas celulares probadas. Sin embargo, la mezcla de anticuerpos anti-MET 9338 + 9006 induce la degradación potenciada del receptor de MET en comparación con los anticuerpos individuales (9006 o 9338) en todas las líneas celulares probadas. El nivel de receptor de MET celular después de 24 horas o tratamiento con 9006+9338 o C8-H241 se comparó mediante análisis Western simple en las tres líneas celulares SNU5, EBC y MKN45. Los resultados mostrados en la figura 4 demuestran la degradación potenciada de MET después del tratamiento con 9006+9338 en las tres líneas celulares.

### 25 **Ejemplo 10: Inhibición de la fosforilación de MET y señalización en dirección 3' con anticuerpos anti-MET**

Este ejemplo demuestra que los anticuerpos anti-MET 9006 y 9338 tienen efectos diferenciales y dependientes de la línea celular sobre la fosforilación de MET y señalización en dirección 3' (según lo determinan los niveles de pERK2 y pAKT). La mezcla de anticuerpo anti-MET 9006+9338 induce la inhibición eficaz de la fosforilación de MET y señalización en dirección 3'.

#### 30 Métodos

Para investigar el nivel de inhibición de la fosforilación de MET y la señalización en dirección 3' inducida por anticuerpos anti-MET 9006 y 9338 y la mezcla de anticuerpos anti-MET 9006+9338, el análisis Western simple se realizó en lisados de células enteras de MKN45 y células EBC-1 tratadas con anticuerpo durante 24 horas. Las células se cultivaron en placas de 6 pozos. Cuando hubo 50% de confluencia, se retiró el medio de cultivo, y las células se lavaron en 1xPBS y se trataron con una concentración de anticuerpos total de 20 µg/ml (9006, 9338, 9006+9338, o el anticuerpo de control negativo Synagis®) durante 24 horas en una incubadora humidificada a 37°C. Lisados de células enteras se prepararon usando regulador de pH RIPA estándar. La concentración total de proteína se determinó usando un ensayo de BCA, y aproximadamente 1 mg/ml de proteína se analizó por análisis Western simple usando un instrumento Sally (sistema de inmunoensayo basado en tamaño automático, ProteinSimple) y mediante el uso de anticuerpos primarios contra MET fosforilada (Tyr1234/1235 y Tyr1349), ERK2 fosforilada (pERK2) y AKT fosforilada (pAKT). Un anticuerpo contra actina β se usó como control de carga (no se muestran datos).

#### Resultados

Los resultados del análisis Western simple de los niveles de fosforilación de MET (Figura 5) y ERK2 y AKT (Figura 6) muestran que el tratamiento con 9006 o 9338 por sí solos induce efectos diferenciales y dependientes de línea celular sobre la fosforilación en las líneas celulares probadas. La mezcla de anticuerpo anti-MET 9006+9338, sin embargo, induce la inhibición eficaz de la fosforilación de MET y la señalización en dirección 3' en comparación con el

tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-MET 9006 o 9338 tanto en células MKN45 como en EBC-1.

#### **Ejemplo 11: Efecto antiproliferativo de anticuerpos anti-MET quiméricos en células endoteliales primarias**

Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) son células endoteliales primarias adecuadas para la evaluación de efectos biológicos en un modelo vascular sensible. Se muestra que los anticuerpos anti-MET 9006 y 9338 y la mezcla de anticuerpos 9006+9338 son capaces de inhibir el crecimiento de HUVECs, tanto en ausencia como en presencia del ligando HGF de MET.

#### **Materiales y métodos**

Se descongelaron células de fibroblastos dérmicos y se sembraron en medio de siembra en placas de 96 pozos. Después de la sedimentación de los fibroblastos a temperatura ambiente, se descongeló un vial de HUVECs marcadas con GFP. Las HUVECs, resuspendidas en un medio de siembra, se añadieron en la parte superior de la suspensión de fibroblastos y se incubaron durante la noche en un instrumento Incucyte (Essen Bioscience) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación durante la noche, el medio de las células co-cultivadas fue retirado y reemplazado por medio de crecimiento durante 24 horas adicionales. El día siguiente, el medio de ensayo se preparó, y diferentes mezclas de ligando/anticuerpo se combinaron y se mezclaron en el medio de ensayo. El medio de crecimiento fue retirado y reemplazado por el medio de ensayo que contenía la diferente combinación de anticuerpos/ ligandos. El medio se intercambiaba con medio de ensayo fresco que contenía mezclas de anticuerpos/ligando cada dos a tres días. Imágenes de GFP-HUVEC se registraron cada cuatro horas. Varios parámetros de las células, incluyendo el número de células, longitud de la red celular, y el número de puntos de ramificación de la red se analizaron usando software Incucyte.

#### **Resultados**

Las figuras 7 a 11 muestran la eficacia de los anticuerpos 9006 y 9338 para inhibir específicamente la proliferación de células endoteliales primarias, a diferencia de un control anticuerpo no relacionado que no muestra ningún efecto inhibitorio. La mezcla anticuerpo 9006+9338 demuestra inhibición superior de la proliferación de HUVEC, particularmente cuando HGF está presente en el medio.

#### **Ejemplo 12: Comparación *in vitro* de anticuerpos anti-MET quiméricos y humanizados**

Este ejemplo describe la comparación *in vitro* de 9006 quimérico, 9338 quimérico y 9338+9006 quimérico con las variantes humanizadas, es decir 9006 humanizado (Hu9006), 9338 humanizado (Hu9338) y 9338+9006 humanizado (Hu9338+Hu9006). Los anticuerpos monoclonales y la mezcla se evaluaron para su capacidad de inhibir el crecimiento de varias líneas celulares de cáncer: Okajima, EBC1, MKN45, HCC827R1\_cet#3, HCC827R1\_cet#1 y Katoll.

#### **Métodos**

El 9006, 9338, 9338+9006 (mezcla 1:1 de los dos componentes), Hu9006, Hu9338 y Hu9338+Hu9006 (mezcla 1:1 de los dos componentes) junto con el anticuerpo de control negativo (Synagis®) se diluyeron a una concentración de anticuerpo total final de 100 µg/ml en medio RPMI 1640 Glutamax complementado con 2% de FBS y 1% de P/S, produciendo una concentración final de 25 µg/ml en los pozos que contenían la concentración de anticuerpo más alta. Después se realizó una dilución en serie doble de los anticuerpos, dando hasta 17 concentraciones diferentes. Números correspondientes de las células (Okajima: 1000 células/pozo, EBC1: 750 células/pozo, MKN45: 500 células/pozo, HCC827R1\_cet#3: 500 células/pozo, HCC827R1\_cet#1: 500 células/pozo; Katoll: 750 células/pozo) se añadieron a los pozos experimentales en una placa de 384 pozos, y se incubaron con anticuerpos durante 4 días en una incubadora humidificada a 37°C. Reactivo WST-1 se añadió posteriormente a las placas y se incubó durante una hora a 37°C. La absorbancia se midió a 450 nm y 620 nm (longitud de onda de referencia) usando un lector de ELISA. La absorbancia a 620 nm se restó de la absorbancia a 450 nM, y la cantidad de células metabólicamente activas (MAC) se calculó como un porcentaje del control no tratado como se describe en el Ejemplo 2.

#### **Resultados**

Las figuras 12 y 13 ilustran los resultados de viabilidad de las titulaciones de anticuerpos 9006 y 9338 quiméricos y humanizados y la mezcla de anticuerpos 9006+9338 quiméricos y humanizados en las líneas celulares HCC827R1\_cet#3 (12a), HCC827R1\_cet#1 (12B), MKN45 (12C), EBC-1 (13A), Katoll (13B) y Okajima (13C). Es evidente a partir de las gráficas que Hu9006, Hu9338, y Hu9338 + Hu9006 tienen un efecto anti-proliferativo comparable con el de sus contrapartes quiméricas.

#### **Ejemplo 13: Comparación *in vitro* de 9338 + 9006 y 13-MET+28-MET humanizados**

Este ejemplo describe las pruebas *in vitro* de 9338 + 9006 (Hu9338+Hu9006), 13-MET, 28-MET y 13-MET+28-MET humanizados (véase la tabla 4). Los anticuerpos monoclonales y las mezclas se evaluaron por su capacidad para inhibir el crecimiento de cuatro líneas celulares de cáncer: EBC1, MKN45, SNU5 y Katoll.

#### **Métodos**

Los anticuerpos Hu9338+Hu9006 (mezcla 1:1 de los dos componentes), 13-MET, 28-MET y 13-MET+28-MET (mezcla

1:1 de los dos componentes) junto con el anticuerpo de control negativo (Synagis®) se probaron para el efecto anti-metabólico en EBC1 (500 células/pozo), MKN45 (750 células/pozo), SNU5 (750 células/pozo) y Katoll (750 células/pozo) como se describió anteriormente.

#### Resultados

5 Los resultados de viabilidad de las titulaciones de los anticuerpos Hu9338+Hu9006, 13-MET, 28-MET y 13-MET+28-MET en las líneas celulares EBC1, MKN45, SNU5 y Katoll y se muestran en la figura 14. Es evidente que los anticuerpos anti-MET tienen diferentes niveles de eficacia y potencia dependiendo de la línea de células probada. Sin embargo, la combinación de Hu9338 y Hu9006 demuestra la inhibición superior de la actividad metabólica, en comparación con 13-MET, 28-MET y 13-MET+28-MET en todas las líneas celulares probadas.

#### 10 **Ejemplo 14: Eficacia *in vivo* de la mezcla de anticuerpos 9006+9338 quiméricos en modelo de xenoinjerto de tumor EBC-1 humano**

Este ejemplo demuestra la eficacia *in vivo* de la mezcla de anticuerpos 9006+9338 en xenoinjertos de la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas EBC-1 amplificada con MET humano.

#### Métodos

15 5 x 10<sup>6</sup> células EBC-1 se inocularon por vía subcutánea en los flancos de ratones desnudos atímicos hembra de 8 a 9 semanas de edad. Los tumores se midieron tres veces por semana mediante un calibrador en dos dimensiones y el volumen del tumor en mm<sup>3</sup> se calculó según la fórmula: (anchura)<sup>2</sup> x longitud x 0.5. En un tamaño promedio del tumor de 120 mm<sup>3</sup>, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente y se inició el tratamiento. Los ratones se trataron tres veces por semana durante un total de diez tratamientos por inyección intraperitoneal de regulador de pH de vehículo (citrato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 6.0), anticuerpo monoclonal 9006, anticuerpo monoclonal 9338, o una  
20 mezcla 1:1 de anticuerpos monoclonales 9006+9338, seguido de un período de observación. Todos los tratamientos con anticuerpos se administraron a una concentración de anticuerpo total de 50 mg/kg. Por lo tanto, los animales tratados con 9006 y 9338 fueron dosificados con 50 mg/kg de 9006 o 9338, respectivamente, mientras que los animales tratados con 9006+9338 fueron dosificados con una mezcla que contenía 25 mg/kg de cada anticuerpo.

#### 25 Resultados

El día 10 después de la inoculación, con un tamaño promedio del tumor de 120 mm<sup>3</sup>, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos de ocho animales y se inició el tratamiento. Como se muestra en la figura 15, el tratamiento con anticuerpo monoclonal 9338 no afectó el crecimiento del tumor en los animales en comparación con el control del vehículo. Por el contrario, el tratamiento con 9006 dio lugar a retraso del crecimiento del tumor, mientras que  
30 el tratamiento con 9006+9338 indujo la estabilización del crecimiento durante el tratamiento y fue superior a todos los otros tratamientos en este modelo. Los estudios de los grupos tratados con vehículo o con 9006 o 9338 por sí solos se cerraron durante el período de tratamiento debido a la excrecencia tumoral o ulceraciones relacionadas con tumor, mientras que los animales en el grupo de 9006+9338 completaron el tratamiento y la observación de dos a tres semanas después del final del tratamiento.

#### 35 **Ejemplo 15: Eficacia *in vivo* de dosis crecientes de la mezcla de anticuerpos 9006+9338 quimérico en modelo de xenoinjerto de tumor EBC-1 humano**

Este ejemplo demuestra la eficacia *in vivo* de dosis crecientes de la mezcla de anticuerpos 9006+9338 en xenoinjertos de la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas EBC-1 amplificada con MET humano.

#### Métodos

40 5 x 10<sup>6</sup> células EBC-1 se inocularon por vía subcutánea en los flancos de ratones desnudos atímicos hembra de 8 a 9 semanas de edad. Los tumores se midieron tres veces por semana mediante un calibrador en dos dimensiones y el volumen del tumor en mm<sup>3</sup> se calculó según la fórmula: (anchura)<sup>2</sup> x longitud x 0.5. En un tamaño promedio del tumor de 150 mm<sup>3</sup>, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente y se inició el tratamiento. Los ratones se trataron tres veces por semana durante un total de diez tratamientos por inyección intraperitoneal de regulador de pH de vehículo (citrato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 6.0), o una mezcla 1:1 de anticuerpos monoclonales 9006+9338, seguido de  
45 un período de observación. La mezcla 1:1 de 9006+9338 se administró a una concentración de anticuerpo total de 50, 25, 5 o 1 mg/kg por dosis inyectada.

#### Resultados

50 El día 11 después de la inoculación, con un tamaño promedio del tumor de 120 mm<sup>3</sup>, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en cinco grupos de diez animales y se inició el tratamiento. Como se muestra en la figura 16, el crecimiento del tumor no se vio afectado en los animales tratados con la concentración más baja de 9006+9338 (1 mg/kg) en comparación con los animales tratados de control del vehículo. El tratamiento con 5 mg/kg de 9006+9338 dio lugar al retraso del crecimiento tumoral en puntos de tiempo posteriores, mientras que el tratamiento con 25 o 50 mg/kg de 9006+9338 indujeron niveles comparables de inhibición del tumor potente con estabilización de crecimiento.

**Ejemplo 16: Eficacia *in vivo* de la mezcla de anticuerpos 9006+9338 quiméricos en un modelo de xenoinjerto de tumor MKM-45 humano**

En este ejemplo se demuestra la eficacia *in vivo* de la mezcla de anticuerpos 9006+9338 en xenoinjertos de la línea celular de cáncer gástrico MKN-45 amplificada con MET humano.

5 **Métodos**

10  $5 \times 10^6$  células MKN-45 se inocularon por vía subcutánea en los flancos de ratones desnudos atímicos hembra de 8 a 9 semanas de edad. Los tumores se midieron tres veces por semana mediante un calibrador en dos dimensiones y el volumen del tumor en  $\text{mm}^3$  se calculó según la fórmula:  $(\text{anchura})^2 \times \text{longitud} \times 0.5$ . En un tamaño promedio del tumor de  $80 \text{ mm}^3$ , los ratones fueron distribuidos aleatoriamente y se inició el tratamiento. Los ratones se trataron tres veces por semana durante un total de diez tratamientos por inyección intraperitoneal de regulador de pH de vehículo (citrato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 6.0), anticuerpo monoclonal 9006, anticuerpo monoclonal 9338, o una mezcla 1:1 de anticuerpos monoclonales 9006+9338, seguido de un período de observación. Todos los tratamientos con anticuerpos se administraron a una concentración de anticuerpo total de 50 mg/kg. Por lo tanto, los animales tratados con 9006 y 9338 fueron dosificados con 50 mg/kg de 9006 o 9338, respectivamente, mientras que los animales tratados con 9006+9338 fueron dosificados con una mezcla que contenía 25 mg/kg de cada anticuerpo.

15 **Resultados**

20 El día 10 después de la inoculación, con un tamaño promedio del tumor de  $80 \text{ mm}^3$ , los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos de ocho animales y se inició el tratamiento. Como se muestra en la figura 17, el crecimiento del tumor fue ligeramente inhibido en los animales tratados con el anticuerpo monoclonal 9006 o 9338 por sí solo en comparación con los animales tratados de control de vehículo. Por el contrario, el tratamiento con 9006+9338 indujo la estabilización del crecimiento durante el tratamiento y fue superior a todos los otros tratamientos en este modelo. Los estudios de los grupos tratados con vehículo o 9006 por sí solo se cerraron durante el período de tratamiento debido a la excrecencia del tumor o ulceraciones relacionadas con el tumor, mientras que los animales en los grupos 9338 y 9006+9338 completaron el tratamiento. El grupo 9006+9338 se observó durante 2 semanas después del final del tratamiento, y la estabilización del crecimiento se mantuvo durante la mayor parte de este período.

**Ejemplo 17: Eficacia *in vivo* de la mezcla de anticuerpos 9006+9338 quiméricos en un modelo de xenoinjerto de tumor SNU5 humano**

Este ejemplo demuestra la eficacia *in vivo* de la mezcla de anticuerpos 9006+9338 en xenoinjertos de línea celular de cáncer gástrico SNU5 amplificada con MET humano.

30 **Métodos**

35  $1 \times 10^7$  células SNU5 se inocularon por vía subcutánea en los flancos de ratones desnudos atímicos hembra de 8 a 9 semanas de edad. Los tumores se midieron tres veces por semana mediante un calibrador en dos dimensiones y el volumen del tumor en  $\text{mm}^3$  se calculó según la fórmula:  $(\text{anchura})^2 \times \text{longitud} \times 0.5$ . En un tamaño promedio del tumor de  $165 \text{ mm}^3$ , los ratones fueron distribuidos aleatoriamente y se inició el tratamiento. Los ratones se trataron tres veces por semana durante un total de diez tratamientos por inyección intraperitoneal de regulador de pH de vehículo (citrate de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 6.0), anticuerpo monoclonal 9006, anticuerpo monoclonal 9338, o una mezcla 1:1 de anticuerpos monoclonales 9006+9338, seguido de un período de observación. Todos los tratamientos con anticuerpos se administraron a una concentración de anticuerpo total de 50 mg/kg. Por lo tanto, los animales tratados con 9006 y 9338 fueron dosificados con 50 mg/kg de 9006 o 9338, respectivamente, mientras que los animales tratados con 9006+9338 fueron dosificados con una mezcla que contenía 25 mg/kg de cada anticuerpo.

40 **Resultados**

45 El día 15 después de la inoculación, con un tamaño promedio del tumor de  $165 \text{ mm}^3$ , los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos de ocho animales y se inició el tratamiento. Como se muestra en la figura 18, se observó regresión del tumor en los animales tratados con el anticuerpo monoclonal 9006 o 9338 o con la mezcla de anticuerpos 9006+9338 en comparación con los animales tratados de control de vehículo. El tratamiento con 9006 o 9006+9338 fue superior al tratamiento con 9338, y la regresión del tumor se mantuvo durante más de 50 días después del final del tratamiento en los grupos tratados con 9006 y 9006+9338.

**Ejemplo 18: Eficacia *in vivo* de la mezcla de anticuerpos 9006+9338 quiméricos en un modelo de xenoinjerto derivado de paciente con carcinoma hepatocelular humano**

50 Este ejemplo demuestra la eficacia *in vivo* de la mezcla de anticuerpos 9006+9338 en un modelo de xenoinjerto derivado de paciente (LI1037) de carcinoma hepatocelular humano (HCC).

**Métodos**

La fuente de tumor para el modelo LI1037 se deriva de un tumor de paciente con cáncer de hígado que luego se mantuvo por vía subcutánea en ratones desnudos. Los tumores se trituraron en fragmentos de  $3 \text{ mm}^3$ , y un fragmento

se implantó por vía subcutánea en un flanco delantero en cada ratón. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de tratamiento cuando el tumor alcanzó 220 mm<sup>3</sup> de volumen medio. Los ratones se trataron tres veces por semana durante un total de diez tratamientos por inyección intraperitoneal de regulador de pH de vehículo (citrato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 6.0) o una mezcla 1:1 de anticuerpos monoclonales 9006+9338, seguido de un período de observación. Todos los tratamientos con anticuerpos se administraron a una concentración de anticuerpo total de 50 mg/kg. Por lo tanto, los animales tratados con 9006+9338 se dosificaron con una mezcla que contenía 25 mg/kg de cada anticuerpo.

#### Resultados

El día 21 después de la inoculación, con un tamaño promedio del tumor de 220 mm<sup>3</sup>, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos de cuatro animales y se inició el tratamiento. Como se muestra en la figura 19, se observó inhibición del crecimiento tumoral en animales tratados con la mezcla de anticuerpos 9006+9338 en comparación con los animales tratados con control de vehículo.

#### **Ejemplo 19: Comparación *in vivo* de mezclas de anticuerpos quiméricos y humanizados en un modelo de xenoinjerto de tumor EBC-1 humano**

En este ejemplo, la eficacia *in vivo* de las mezclas de anticuerpos 9006+9338 quiméricos y Hu9006+Hu9338 humanizados se comparan en xenoinjertos de la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas EBC-1 amplificada con MET humano.

#### Métodos

5x10<sup>6</sup> células EBC-1 se inocularon por vía subcutánea en el flanco de ratones desnudos atímicos hembra de 8 a 9 semanas de edad. Los tumores se midieron tres veces por semana mediante un calibrador en dos dimensiones y el volumen del tumor en mm<sup>3</sup> se calculó según la fórmula: (anchura)<sup>2</sup> x longitud x 0.5. El día 20 después de la inoculación de las células a un tamaño promedio del tumor de ~130 mm<sup>3</sup>, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos de 10 animales y se inició el tratamiento. Los ratones se trataron tres veces por semana con un total de diez inyecciones intraperitoneales de regulador de pH de vehículo, una mezcla 1:1 de 9006+9338 quimérico o 9006+9338 humanizado (Hu9006+Hu9338) seguido de un período de observación. Todos los tratamientos con anticuerpos fueron dosificados a una concentración de anticuerpo total de 50 mg/kg. Por lo tanto, los animales tratados con 9006+9338 y Hu9006+Hu9338 fueron dosificados con una mezcla que contenía 25 mg/kg de cada anticuerpo.

#### Resultados

Como se muestra en la figura 20, se observó regresión del tumor en los animales tratados tanto con 9006+9338 como con Hu9006+Hu9338 en comparación con los animales tratados de control de vehículo. El efecto inhibitorio de tumor de Hu9006+Hu9338 y 9006+9338 pareció muy similar.

#### **Ejemplo 20: Comparación *in vivo* de mezclas de anticuerpos quiméricos y humanizados en un modelo de xenoinjerto de tumor OE33 humano**

En este ejemplo, las eficacias *in vivo* de las mezclas de anticuerpos 9006+9338 quiméricos y Hu9006+Hu9338 humanizados se comparan en xenoinjertos de la línea celular de cáncer esofagogástrico OE33 amplificada con MET humano.

#### Métodos

Los tumores OE33 se trasplantaron en serie a partir de tumores previamente establecidos. Los tumores se habían hecho pasar ocho veces en el tiempo del estudio. Fragmentos de tumor que medían ~1 mm<sup>3</sup> se trasplantaron por vía subcutánea en el flanco de ratones desnudos atímicos hembra de 8 a 9 semanas de edad. Los tumores se midieron tres veces por semana mediante un calibrador en dos dimensiones y el volumen del tumor en mm<sup>3</sup> se calculó según la fórmula: (anchura)<sup>2</sup> x longitud x 0.5. El día 30 después de la inoculación de tumor a un tamaño promedio del tumor de 200 mm<sup>3</sup>, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos de siete animales y se inició el tratamiento. Los ratones se trataron tres veces por semana con un total de diez tratamientos por inyección intraperitoneal de regulador de pH de vehículo, una mezcla 1:1 de 9006+9338 quimérico o 9006+9338 humanizado (Hu9006+Hu9338) seguido de un período de observación. Todos los tratamientos con anticuerpos fueron dosificados a una concentración de anticuerpo total de 30 mg/kg. Por lo tanto, los animales tratados con 9006+9338 y Hu9006+Hu9338 fueron dosificados con una mezcla que contenía 15 mg/kg de cada anticuerpo.

#### Resultados

Como se muestra en la figura 21, se observó regresión tumoral en los animales tratados tanto con 9006+9338 como con Hu9006+Hu9338 en comparación con los animales tratados de control de vehículo y las curvas de crecimiento son muy similares.

#### **Ejemplo 21: Comparación *in vivo* del anticuerpo monoclonal C8-H241 y la mezcla de anticuerpos Hu9006+Hu9338 en modelos de xenoinjertos de tumor humano**

En este ejemplo, las eficacias *in vivo* de la mezcla de anticuerpos Hu9006+Hu9338 y el anticuerpo monoclonal comparador C8-H241 (véase la tabla 4) se comparan en xenoinjertos de línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas EBC-1 amplificada con MET humano y la línea celular de cáncer gástrico Hs746T amplificada con MET humano, que también porta una delección del exón 14 de MET.

## 5 Métodos

5x10<sup>6</sup> células EBC-1 o 3.7x10<sup>6</sup> células Hs746T se inocularon por vía subcutánea en el flanco de ratones atímicos hembra. Los tumores se midieron tres veces por semana mediante un calibrador en dos dimensiones y el volumen del tumor en mm<sup>3</sup> se calculó según la fórmula: (anchura)<sup>2</sup> x longitud x 0.5. A un tamaño tumoral promedio de 140 mm<sup>3</sup> para EBC-1 y 120 mm<sup>3</sup> para Hs746T los ratones fueron distribuidos aleatoriamente y se inició el tratamiento.

10 Protocolo de tratamiento para EBC-1: Los ratones se trataron tres veces por semana con un total de diez inyecciones intraperitoneales de regulador de pH de vehículo, anticuerpo monoclonal C8-H241, o una mezcla 1:1 de anticuerpos monoclonales Hu9006+Hu9338 seguido de un período de observación. Después de 21 días de observación, los ratones restantes en el grupo C8-H241 fueron tratados nuevamente con Hu9006+Hu9338 tres veces por semana hasta la terminación del estudio en el día 139 después de la inoculación de las células tumorales.

15 Protocolo de tratamiento para Hs746T: Los ratones se trataron tres veces por semana con un total de diez inyecciones intraperitoneales de regulador de pH de vehículo, el anticuerpo monoclonal C8-H241, anticuerpo monoclonal Hu9006, anticuerpo monoclonal Hu9338 o una mezcla 1:1 de anticuerpos monoclonales Hu9006+Hu9338. Después de un período de observación de una semana todos los ratones restantes en los grupos Hu9006, Hu9338 y C8-H241 fueron tratados con una dosis única de Hu9006+Hu9338 y se observaron durante 9 días.

20 Todos los tratamientos con anticuerpos se dosificaron a una concentración de anticuerpo total 50 mg/kg. Por lo tanto, los animales tratados con C8-H241, Hu9006 y Hu9338 fueron dosificados con 50 mg/kg de anticuerpo, mientras que los animales tratados con Hu9006+Hu9338 fueron dosificados con una mezcla que contenía 25 mg/kg de cada anticuerpo.

## Resultados

25 EBC-1: En el día 15 después de la inoculación a un tamaño promedio del tumor de 140 mm<sup>3</sup> los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos de diez animales y se inició el tratamiento. Como se muestra en la figura 22, se observó una respuesta limitada en ratones tratados con C8-H241 en comparación con los animales tratados de control de vehículo. Por el contrario, el tratamiento con Hu9006+Hu9338 indujo regresión tumoral. 21 días después de la última dosis, a un volumen de tumor promedio de 500 mm<sup>3</sup>, los ratones restantes en el grupo tratado con C8-H241 fueron tratados nuevamente con Hu9006+Hu9338. La figura 22 también muestra que los ratones respondieron con regresión del tumor en el tratamiento secundario.

35 Hs746T: El día 35 después de la inoculación con un tamaño promedio del tumor de 120 mm<sup>3</sup> los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en cinco grupos de ocho animales y se inició el tratamiento. Como se muestra en la figura 23, se observó una respuesta inhibitoria inicial limitada en ratones tratados con C8-H241, Hu9006 o Hu9338 en comparación con los animales tratados de control de vehículo, pero aproximadamente a medio camino a través del período de tratamiento, los tumores comenzaron a crecer de nuevo. Por el contrario, el tratamiento con Hu9006+Hu9338 indujo la regresión del tumor y la erradicación completa del tumor en todos los ocho ratones tratados. Nueve días después de la última dosis, los ratones restantes en los grupos tratados con C8-H241, Hu9006 y Hu9338 fueron tratados nuevamente con una dosis única de Hu9006+Hu9338. La figura 23 también muestra que los ratones respondieron con la regresión del tumor en el tratamiento secundario.

## 40 **Ejemplo 22: Comparación *in vivo* del anticuerpo monoclonal C8-H241 y la mezcla de anticuerpos Hu9006+Hu9338 en cuatro modelos de xenoinjerto derivado del paciente humano**

En este ejemplo, la eficacia *in vivo* de la mezcla de anticuerpos Hu9006+Hu9338 y el anticuerpo monoclonal comparador C8-H241 (véase la tabla 4) se compararon en cuatro modelos de xenoinjerto derivado del paciente con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) amplificado con MET humano.

## 45 Métodos

Cada ratón se inoculó por vía subcutánea en el flanco con fragmentos de tejido de NSCLC primario de modelo LXFA0526, LU0858, LU1901 o LU2503 (2-3 mm de diámetro) para el desarrollo del tumor. Los tumores se midieron dos veces a la semana mediante un calibrador en dos dimensiones y el volumen del tumor en mm<sup>3</sup> se calculó según la fórmula: (anchura)<sup>2</sup> x longitud x 0.5.

50 Cuando el tamaño promedio del tumor alcanzó 100 a 200 mm<sup>3</sup>, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos (n = 5-8 ratones por grupo) y se inició el tratamiento. Los ratones se trataron tres veces por semana para un total de diez inyecciones intraperitoneales con anticuerpo monoclonal C8-H241, mezcla de anticuerpos Hu9006+Hu9338 (anticuerpos monoclonales individuales mezclados en la misma relación) o control de regulador de pH de vehículo seguido por un período de observación de hasta tres semanas.

Todos los tratamientos con anticuerpos se dosificaron a una concentración de anticuerpo total de 50 mg/kg. Por lo tanto, los animales tratados C8-H241 fueron dosificados con 50 mg/kg de anticuerpo, mientras que los animales tratados con Hu9006+Hu9338 fueron dosificados con una mezcla que contenía 25 mg/kg de cada anticuerpo.

Resultados

5 Como se muestra en la figura 24, se observaron diferentes respuestas en los cuatro modelos bajo tratamiento con C8-H241. Por el contrario, el tratamiento con Hu9006+Hu9338 indujo regresión tumoral en los 4 modelos con una eficacia superior y/o tiempo retardado para la progresión en comparación con C8-H241. Anteriormente se reportó que C8-H241 fue altamente eficaz en un modelo de xenoinjerto NSCLC (LXFA-1647) amplificado con MET primario, amplificado con MET diferente, (Liu et al Clin Cancer Res. 20:6059-6070 (2014)).

10 **Ejemplo 23: Comparación *in vivo* de composiciones de relación equilibrada y sesgada de la mezcla de anticuerpos Hu9006+Hu9338 en un modelo de xenoinjerto de tumor humano**

En este ejemplo, la eficacia *in vivo* de las mezclas que consistían de diferentes relaciones de los dos anticuerpos Hu9006 y Hu9338 se comparó en xenoinjertos de la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas EBC-1 amplificada con MET humano.

15 Métodos

5x10<sup>6</sup> células EBC-1 se inocularon por vía subcutánea en el flanco de ratones desnudos atímicos hembra de 8 a 9 semanas de edad. Los tumores se midieron tres veces por semana mediante un calibrador en dos dimensiones y el volumen del tumor en mm<sup>3</sup> se calculó según la fórmula: (anchura)<sup>2</sup> x longitud x 0.5. El día 13 después de la inoculación a un tamaño promedio del tumor de 150 mm<sup>3</sup>, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos de diez animales y se inició el tratamiento. Los ratones se trataron tres veces por semana con un total de diez inyecciones intraperitoneales de regulador de pH de vehículo, mezclas de relación de anticuerpo sesgada de 1:1, 2:1 o 1:2 de anticuerpos monoclonales Hu9006+Hu9338 seguido por un período de observación. Los tratamientos de anticuerpos fueron dosificados a ya sea 50 mg/kg o, para las mezclas de relación de anticuerpo sesgadas, la concentración de anticuerpo total de 10 mg/kg como sigue: relación 1:1 de animales dosificados se dosificaron con una mezcla que contenía 25 mg/kg de cada anticuerpo. Relación 1:2 de animales dosificados se dosificaron con una mezcla que contenía 3 mg/kg de Hu9006 y 7 mg/kg de Hu9338 para una dosificación total de 10 mg/kg o con una mezcla que contenía 17 mg/kg de Hu9006 y 33 mg/kg de Hu9338 para una dosificación total de 50 mg/kg. Análogamente, relación 2:1 de animales dosificados se dosificaron con una mezcla que contenía 7 mg/kg de Hu9006 y 3 mg/kg de Hu9338 para una dosificación total de 10 mg/kg o con una mezcla que contenía 33 mg/kg de Hu9006 y 17 mg/kg de Hu9338 para una dosificación total de 50 mg/kg.

Resultados

35 Como se muestra en la figura 25, el tratamiento con Hu9006+Hu9338 a ambas relaciones equilibrados y sesgadas y a ambas dosis indujeron regresión del tumor. El nivel de regresión del tumor pareció similar para todos los tratamientos con anticuerpos probados indicando que Hu9006+Hu9338 produce una inhibición del crecimiento del tumor sólida y consistente en ambas composiciones de anticuerpos simples equilibradas y sesgadas.

**Tabla 11: Diagrama de SEQ ID NO**

SEQ ID NO	Secuencia
1	Secuencia de aminoácidos de isoforma 1 de MET humano
2	Secuencia de aminoácidos de isoforma 2 de MET humano
3	secuencia de aminoácidos de MET de pollo
4	secuencia de aminoácidos de MET de murino
5	secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena pesada de 9006 quimérico
6	secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada de 9006 quimérico
7	secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena ligera de 9006 quimérico
8	secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de 9006 quimérico
9	secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena pesada de 9338 quimérico
10	secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada de 9338 quimérico

## ES 2 748 295 T3

11	secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena ligera de 9338 quimérico
12	secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de 9338 quimérico
13	secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena pesada de 9006 quimérico
14	secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada de 9006 humanizado
15	secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena ligera de 9006 humanizado
16	secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de 9006 humanizado
17	secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena pesada de 9338 humanizado
18	secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada de 9338 humanizado
19	secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena ligera de 9338 humanizado
20	secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de 9338 humanizado
21	secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de 9006
22	secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de 9006
23	secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada de 9006
24	secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de 9006
25	secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera de 9006
26	secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera de 9006
27	secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de 9338
28	secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de 9338
29	secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada de 9338
30	secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de 9338
31	secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera de 9338
32	secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera de 9338
33	secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 9006 humanizado
34	secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 9006 humanizado
35	secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 9338 humanizado
36	secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 9338 humanizado

### Listado de Secuencias

SEQ ID NO: 1 (secuencia de aminoácidos de isoforma 1 de MET humano):

5 MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYYVLNEEDLQKVA  
 EYKTGPVLEHPDCFPCQDCSSKANLSGGVWVDNINMALVVDYYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPNHTADIQSEVHCI  
 10 FSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSVVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHPHLSISVRRRLKETKDGFMFLTQSYIDVLPFRD  
 SYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDAQTFHTRIRFCSINSGLSYMEMPLECILTEKRKRSTKKEVFNILQAAAYVSKPG  
 AQLARQIGASLNDLILFVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPKIYVNDFFNKIVNKNVVRCLQHFYGNHEHCFNRTLLRNS  
 15 SGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSISTFIKGLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDHPVS  
 PEVIVEHTLNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECLSGTWTQQICLPAIKV  
 FPNAPLEGGTRLTCGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLESTMTNLKCTVGPAMNKHFNMSIISNGHGTTQ  
 YSTFSYVDPVITSISPKYGPAGGTLTLTGNYNLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFAVKLIDLANRE  
 TSIFSYPVIEIHPKSFISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVHEAGRNFVACQHRNSSEIICCTTPSLQQLNLQPL  
 KTKAFFMLDGIKSKYFDLIYVHNPFKPFKPVMMISMGNNVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKSCENIHLHSEAVLCTVP  
 NDLLKLNSELNIEWKQAISSVTLGKVVQPQDNFTGLIAGVVSISTALLLLGFFLWLLKRRKQIKDLGSELVRYDARVHTPHL  
 DRLVSARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGSCRQVQYPLTDMSPILTSGDSDISSPLLQNTVHIDLSALNP

ELVQAVQHVIGPSSLIVHFNEVIGRGHFGCVYHGTLDDNDGKKIHC VAVKSLNRITDIGEVSQFLTEGIIMKDFSHPNVLSLL  
 GICLRSEGSPLVVL PVMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYLASKKFVHRDLAARNCMLDEKFTVKVADF  
 GLARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESQTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRGAPPYPDVNTFDITVYLLQGRRL  
 LQPEYCPDPLYEVMLKCWHPKAEMRPSFSELVSRISAIFSTFIGEHYVHV NATYVNVKCVAPYPSLLSSEDNADDEVDR  
 5 PASFWETS

SEQ ID NO: (2 secuencia de aminoácidos de isoforma 2 de MET humano):

MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVA  
 EYKTGPVLEHPDCFCPCQDCSSKANLSGGVWVDNINMALVVDYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCI  
 FSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSVVDKDFINFFVGNINSSYFPDHPHLSISVRRLLKETKDGFMFLTDQSYIDVLPFRD  
 10 SYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDAQTFHTRIRFCSINSLHSYMEMPLECILTEKRKRSTKKEVFNILQAAVYVSKPG  
 AQLARQIGASLNDLILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPKIYVNDFFNKIVNKNVRCLOHFYGPNEHECFNRLLRNS  
 SGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFGMQFSEVLLTSISTFIKGLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDSHPVS  
 PEVIVEHTLNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECLSGTWTQQICLPAIYKV  
 15 FPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNESTLTLSESTMTLKTCTVGPAMNKHFNMSIISNGHGTQ  
 YSTFSYVDPVITSISPKYGP MAGGTLTTLTGNVLSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFAVKLIDLANRE  
 TSIFSREDPIVYIEHPTKSFISTWVKEPLNIVSFLFCFASGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVHEAGRNFVACQHRNS  
 EIICCTTPSLQQLNLQPLKTKAFFMLDGLSKYFDLIYVHNPVFKPEKPVMSMGNENVEIKGNIDPEAVKGEVLKVG  
 KSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAISSVTLGKVVQPDQNFGLIAGVVSISTALLLLGFFLWKKRQKID  
 20 LGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGSCRQVQYPLTDMSPILTSGSDI  
 SSPLLQNTVHIDLSALNPELVQAVQHVIGPSSLIVHFNEVIGRGHFGCVYHGTLDDNDGKKIHC VAVKSLNRITDIGEVSQFL  
 TEGIIMKDFSHPNVLSLLGICLRSEGSPLVVL PVMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYLASKKFVHRDLA  
 RNCMLDEKFTVKVADFGLARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESQTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRGAPPYP  
 DVNTFDITVYLLQGRRLQPEYCPDPLYEVMLKCWHPKAEMRPSFSELVSRISAIFSTFIGEHYVHV NATYVNVKCVAPY  
 SLLSSEDNADDEVDRPASFWETS

25 SEQ ID NO: 3 (secuencia de aminoácidos de MET de pollo):

MKPVTAYPSGIILFLFALLQRSHGQCKEAAKSEMNLNVKYDLPNFITETPIQNVVLYKHHVYIGAVNKIYVNLNETLQNISVY  
 KTGPILESPGCAPCEDCKDKANLSNSVWVDNINMALLEYYDDQLISCGSVSGGVCHRHIIPDPNADIESEVHMYSP  
 QVDGEADNCPDCVVS TLGTVLVEKDRFVNFVGNMTSAFQPPHVLHSISVRRLLKETQDGFELTDQSYIDILPQFRD  
 SYPIKYVHAFEHDFVYFLTVQRESLDSQTFHTRIRFCTLDSEMRSYMEMPLECIFTEKRKRKRIRKEVFNILQAAVYVSKP  
 30 GAALAHMGLGLIDDILYGVFAQTNQIQEPTNRSVCAVSVRTINEFFNKIVDKQNMKCLQHFYKDSKYCLNRAFSRNA  
 SYCRAQDDEYRLEVTTPLQRVDLFGMQFNILLTSISVFTKGNLTIANLGTSEGRFMQIVVSRSEPTAPHVSFQLDSHAVS  
 PQVVVEQSAADGYTLVVTGKKITKVP LINGPGCHHFQSCSQCLLAPAFMRCGWCGQQCLRAPECNGGTWTQETCLPR  
 VYEILPSSAPLEGGTKLTCGWDFGFSKNNR FELRNTVVHIGGQICALEAKSSNKNKLECTAPAAKNASFNISSSVSVGHG  
 KTLFNTFYSVYVNIPTSYGPKSGGTLTIAKYLSNGKRRIFVGEKPCSLKSTSESSVECYTPAQRIPEYRVRVIGIDG  
 35 AIRDAKGYFTYREDPVVLIKHPAKSFLSGGSTITAQGINLNSVCFPRM VITVPKLGMNFSVACSHRSSSEIICCTTPSLKAFN  
 LQPPFVTKVFFIFDGVSSLYDFDYVNNPVFKHFEKPVLSRSPNVLEIKGNHIDSEAVKGEVLKVGKSCENLLQSETIL  
 CTVPSDLLKSNSELNIEWKQEV LSTVIGKVLIRQDQNFGLIAGVVSSTSVLIYIFLVFFLWRRKKKQIKDLGSDLVRYDGRVH  
 TPHLDRLVSARSVSPTTEMVSSVSDYRSTFLEDQFPSMSQNGSCRPAQYPHSDLSPILSSGSDSLASPLLQNTVHIDISA  
 40 LNPDLVKEVQHVIGADSLMVHFSEVIGRGHFGCVSHGTLDDNDGRKIHC VAVKSLNRITDLEEVAQFLKEGIIMKDFTHPN  
 VLSLLGICLPNEGSPLVVL PVMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYLASKKFVHRDLAARNCMLDEKFTVK  
 VADFGGLARDVYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESQTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRGAPPYPDVNSFDITVYLLQ  
 GRRLQPEYCPDPLYEVMLKCWHPKPEMRPAFSELVSKISTIFSTFIGEHYVHV NATYVNVKCVAPYPSLLSQDNTDMD  
 VDT

SEQ ID NO: 4 (secuencia de aminoácidos de MET de murino):

MKAPTVLAPGILVLLLSLVQRSHGCKEALVKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVV LHGHYILGATNYIYVLNDKDLQKV  
 SEFKTGPVLEHPDCLPCRDCSSKANSSGGVWVDNINMALLVDTYDDQLISCGSVNRGTCQRHVLPDPNSADIQSEVHC  
 MFSPEEESGQCPDCVVSALGAKVLLSEKDRFVNFVGNINSSYPPGYLSHSISVRRLLKETQDGFKFLTDQSYIDVLPFEQ  
 DSYPIKYIHAFESNHFIYFLTVQKETLDAQTFHTRIRFCSVDSGLHSYMEMPLECILTEKRKRKRSTREEVFNILQAAVYVSKP  
 GANLAKQIGASPSDDILFGVFAQSKPDSAEPVNRSAVCAFPKIYVNDFFNKIVNKNVRCLOHFYGPNEHECFNRLLLRN  
 50 SSGCEARSDEYRTEFTTALQRVDLFGMRLNQVLLTSISTFIKGLTIANLGTSEGRFMQVVLRTAHLPHVNFLLDSHPV  
 SPEVIVEHPSNQNGYTLVVTGKKITKIPLNGLGCGHFQSCSQLSAPYIFQCGWCHNQCFRDECPSGTWTQEICLPAYV  
 KVFPPTAPLEGGTVLTICGWDFGFRKNNKFDLRTKTVLLGNESTLTLSESTNTLKTCTVGPAMSEHFVNSVVISNSRETT  
 QYSAFSYVDPVITSISPRYGPQAGGTLTTLTGKYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSIDSILECYTPAQTTSDEFPVKLIDLAN  
 RETSSFSYREDPVVYIEHPTKSFISGGSTITGIGKTLNSVSLPKLVIDVHEVGVNYTVACQHRNSNSEIICCTTPSLKQLGLQL  
 55 PLKTKAFFLLDGLSKHFDLTYVHNPVFEPEKPVMSIGNENVEIKGNIDPEAVKGEVLKVGNSCESLHWHS GAVLCT  
 VPSDLLKLNSELNIEWKQAVSSTV LGKVVQPDQNFAGLIIGAVSISVVVLLSGLFLWMRKRKHKDLGSELVRYDARVHTP  
 HLDRLVSARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGACRQVQYPLTDLSPILTSGSDISSP LLQNTVHIDLSALN  
 PELVQAVQHVIGPSSLIVHFNEVIGRGHFGCVYHGTLDDNDGKKIHC VAVKSLNRITDIEEVSQFLTEGIIMKDFSHPNVLSL  
 LGICLRSEGSPLVVL PVMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYLASKKFVHRDLAARNCMLDEKFTVKVAD  
 60 FGLARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESQTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRGAPPYPDVNTFDITVYLLQGRRL  
 LLQPEYCPDALYEVMLKCWHPKAEMRPSFSELVSRISIFSTFIGEHYVHV NATYVNVKCVAPYPSLLSQDNIDGEGNT

SEQ ID NO: 5 (secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena pesada de 9006 quimérico):

5 CAGATCCATTTGGGGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTG  
GGTATACCTTCACAACTTTAGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGAT  
AAACACCTACACTGGAGAGCCAACATATGTTGATGACTTGAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCA  
GCACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACATGGCTACATATTTCTGTGCAAGGAAAGGGATTGCG  
AGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCGAGT

SEQ ID NO: 6 (secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada de 9006 quimérico):

QIHLGQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTNFRMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYVDDLKGRFAFSLETSASTA  
YLQINNLKNEDMATYFCARKGIARAMDYWGQTSVTVSS

10 SEQ ID NO: 7 (secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena ligera de 9006 quimérico):

15 AACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGTGTGTCAGCAGGAGAGATGGTCACTATGAGTTGTAAGTCCAG  
TCAGAGTCTGTTAGACAGTGGAAATCAAAGAATACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTCAA  
CTTTTGTCTTCGGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGAACCGATT  
TCACTCTTACCGTCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATCATAGTTATCCGTAC  
ACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

SEQ ID NO: 8 (secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de 9006 quimérico):

NIVMTQSPSSLSVSAGEMVTMSCKSSQSLDLSGNQKNYLAWYQQKPGQPPQLLIFGASTRESGVPDRFTGSGSGTDF  
LTVSSVQAE DLAVYYCQNDHSYPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO: 9 (secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena pesada de 9338 quimérico):

20 CAGGTCCAACCTGCAACAGCCTGGGGCTGAACTGGCAAAACCTGGGGCCTCAGTGAGGATGTCCTGCAAGGCTTCT  
GGCTACACCTTTACTAGTTACTGGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACA  
TTAATCCTAGCAGTGGTCATATTGAGAACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCC  
AGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATTTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGACGGTTTG  
CTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCGAGT

25 SEQ ID NO: 10 (secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada de 9338 quimérico):

QVQLQPGAELAKPGASVRMSCKASGYFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSSGHIENNQKFKDKATLTADKSSST  
AYMQLSSLTFEDSAVYYCARGRFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 11 (secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena ligera de 9338 quimérico):

30 GATATTGTGATGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCTGGGGAGAAGGTCACCTTGACCTGCAGTGCCA  
GCTCAAGTGTAAGTTCCGGCTACTTGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAACTCTGGATTTATAGC  
ACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAGTCAA  
CAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCTCTTATTTCTGCCATCAGTGGAGTAGTTACCCATTACAGTTCGGCTCGGG  
ACCAAGCTGGAGCTGAAA

SEQ ID NO: 12 (secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de 9338 quimérico):

35 DIVMTQSPAIMASASPGEKVTLTCSASSSVSSGYLYWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTVNSM  
EAEDAASYFCHQWSSYPFTFGSGTKLELK

SEQ ID NO: 13 (secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena pesada de 9006 quimérico):

40 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGATCCGAGCTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCC  
GGCTACACCTTTACCAACTTCCGGATGAACTGGGTCAAGCAGGCCCCAGGCCAGGGCCTGAAATGGATGGGCTGG  
ATCAACACCTACACCGGCGAGCCACCTACGTGGACGACCTGAAGGGCAGATTGCGTCTCCCTGGACACCTCCG  
TGCCACCGCCTACCTGCAGATCTCCAGCCTGAAGGCCGAGGATACCGCCGTGACTACTGCGCCCGGAAGGGAA  
TCGCCAGAGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTCTCGAGT

SEQ ID NO: 14 (secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada de 9006 humanizado):

45 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTNFRMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYVDDLKGRFVFLDTSVS  
TAYLQISSLKAEDTAVYYCARKGIARAMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 15 (secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena ligera de 9006 humanizado):

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCGACTCTCTGGCCGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGTCC  
CCCAGTCCCTGCTGGACTCCGGCAACCAGAAGAATACTGCGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCCA  
AGCTGCTGATCTTTGGCGCCTCCACCCGGAATCTGGCGTGCCCGATAGATTCTCCGGCTCCGGCTCTGGCACCG

## ES 2 748 295 T3

ACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGAACGACCACTCCTACCC  
CTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG

SEQ ID NO: 16 (secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de 9006 humanizado):

5 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLDSDGNQKNYLAWYQQKPGQPPLKLLIFGASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT  
ISSLQAEDVAVYYCQNDHSYPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 17 (secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena pesada de 9338 humanizado):

10 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTGAAGAAACCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCC  
GGCTACACCTTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTAC  
ATCAACCCCTCCAGCGGCCACATCGAGAACAACCAGAAATTCAAGGACCGCGTGACCATCACCGCCGACAAGTCCA  
CCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCTCCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGGCAGAT  
TCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCTCGTGACAGTCTCGAGT

SEQ ID NO: 18 (secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada de 9338 humanizado):

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTFSYWMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSGHIENNQKFKDRVTITADKSTST  
AYMELSSLRSEDTAVYYCARGRFAYWGQGLTVTVSS

15 SEQ ID NO: 19 (secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena ligera de 9338 humanizado):

20 GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACCCTGTCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCTACCCTGTCCTGCTCCGCCT  
CCTCCTCTGTCTCCTCCGGCTACCTGTACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATCTACTC  
TACCTCAACCTGGCCTCCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGACTTTACCCTGACCATC  
TCCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCACCAGTGGTCCAGCTACCCCTTACCTTTGGCTCCG  
GCACCAAGCTGGAAATCAAG

SEQ ID NO: 20 (secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de 9338 humanizado):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSSGYLYWYQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPE  
DFAVYYCHQWSSYPFTFGSGTKLEIK

SEQ ID NO: 21 (secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de 9006):

25 GYTFTNFR

SEQ ID NO: 22 (secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de 9006):

INTYTGEP

SEQ ID NO: 23 (secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada de 9006):

ARKGIARAMDY

30 SEQ ID NO: 24 (secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de 9006):

QSLDSDGNQKNY

SEQ ID NO: 25 (secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera de 9006):

GAS

SEQ ID NO: 26 (secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera de 9006):

35 QNDHSYPYT

SEQ ID NO: 27 (secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de 9338):

GYTFTSYW

SEQ ID NO: 28 (secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de 9338):

INPSSGHI

40 SEQ ID NO: 29 (secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada de 9338):

ARGRFAY

SEQ ID NO: 30 (secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de 9338):

ES 2 748 295 T3

SSVSSGY

SEQ ID NO: 31 (secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera de 9338):

STS

SEQ ID NO: 32 (secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera de 9338):

5    HWSSYPFT

SEQ ID NO: 33 (secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 9006 humanizado):

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLDSDGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIFGASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT  
ISSLQAEDVAVYYCQNDHSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10   SEQ ID NO: 34 (secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 9006 humanizado):

QVQLVQSGSELKPKGASVKVSCASGYFTNFRMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGPEPTYVDDLKGRFVFLDTSVS  
TAYLQISSLKAEDTAVYYCARKGIARAMDYWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG  
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
15   GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP  
PVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 35 (secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 9338 humanizado):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSVSSGYLYWYQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPE  
20   DFAVYYCHQWSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 36 (secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 9338 humanizado):

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSGHIENNQKFKDRVTITADKSTST  
AYMELSSLRSEDTAVYYCARGRFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
25   GALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV  
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD  
SDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> SYMPHOGEN A/S  
 <120> ANTICUERPOS ANTI-MET Y COMPOSICIONES  
 <130> 110285-0051-WO1  
 5 <140>  
 <141>  
 <150> 62/051,190  
 <151> 16/09/2014  
 <160> 39  
 10 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 1390  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15 <400> 1

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe  
 1 5 10 15

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

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala  
 35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu  
 50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys  
 65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe  
 85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp  
 100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp  
 115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His  
 130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys  
 145 150 155 160

ES 2 748 295 T3

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val  
 165 170 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe  
 180 185 190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp  
 195 200 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp  
 210 215 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu  
 225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn  
 245 250 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln  
 260 265 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu  
 275 280 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg  
 290 295 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala  
 305 310 315 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser  
 325 330 335

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp  
 340 345 350

Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys  
 355 360 365

Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg  
 370 375 380

Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg  
 385 390 395 400

Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr  
 405 410 415

ES 2 748 295 T3

Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly  
 420 425 430

Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly  
 435 440 445

Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln  
 450 455 460

Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu  
 465 470 475 480

Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu  
 485 490 495

Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys  
 500 505 510

Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln  
 515 520 525

Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys  
 530 535 540

Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile  
 545 550 555 560

Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu  
 565 570 575

Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg  
 580 585 590

Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu  
 595 600 605

Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys  
 610 615 620

Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile  
 625 630 635 640

Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp  
 645 650 655

Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly



ES 2 748 295 T3

Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp  
 915 920 925

Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Thr Ala  
 930 935 940

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln  
 945 950 955 960

Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His  
 965 970 975

Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr  
 980 985 990

Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro  
 995 1000 1005

Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln  
 1010 1015 1020

Val Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly  
 1025 1030 1035

Asp Ser Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile  
 1040 1045 1050

Asp Leu Ser Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His  
 1055 1060 1065

Val Val Ile Gly Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe Asn Glu Val  
 1070 1075 1080

Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys Val Tyr His Gly Thr Leu Leu  
 1085 1090 1095

Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile His Cys Ala Val Lys Ser Leu Asn  
 1100 1105 1110

Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu Thr Glu Gly  
 1115 1120 1125

Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Leu Ser Leu Leu  
 1130 1135 1140

Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro Leu Val Val Leu Pro  
 1145 1150 1155

ES 2 748 295 T3

Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg Asn Glu Thr  
 1160 1165 1170

His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly Leu Gln Val  
 1175 1180 1185

Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe Val His Arg  
 1190 1195 1200

Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe Thr Val  
 1205 1210 1215

Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr Asp Lys Glu  
 1220 1225 1230

Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys  
 1235 1240 1245

Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys  
 1250 1255 1260

Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr  
 1265 1270 1275

Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr  
 1280 1285 1290

Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys  
 1295 1300 1305

Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys  
 1310 1315 1320

Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser  
 1325 1330 1335

Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val His Val Asn  
 1340 1345 1350

Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu  
 1355 1360 1365

Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro  
 1370 1375 1380

Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser  
 1385 1390

<210> 2

<211> 1408

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 748 295 T3

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe  
 1 5 10 15

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

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala  
 35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu  
 50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys  
 65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe  
 85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp  
 100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp  
 115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His  
 130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys  
 145 150 155 160

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val  
 165 170 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe  
 180 185 190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp  
 195 200 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp  
 210 215 220

ES 2 748 295 T3

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu  
 225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn  
 245 250 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln  
 260 265 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu  
 275 280 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg  
 290 295 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala  
 305 310 315 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser  
 325 330 335

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp  
 340 345 350

Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys  
 355 360 365

Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg  
 370 375 380

Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg  
 385 390 395 400

Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr  
 405 410 415

Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly  
 420 425 430

Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly  
 435 440 445

Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln  
 450 455 460

Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu  
 465 470 475 480

ES 2 748 295 T3

Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu  
 485 490 495  
 Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys  
 500 505 510  
 Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln  
 515 520 525  
 Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys  
 530 535 540  
 Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile  
 545 550 555 560  
 Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu  
 565 570 575  
 Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg  
 580 585 590  
 Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu  
 595 600 605  
 Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys  
 610 615 620  
 Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile  
 625 630 635 640  
 Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp  
 645 650 655  
 Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly  
 660 665 670  
 Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg  
 675 680 685  
 His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn  
 690 695 700  
 Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe  
 705 710 715 720  
 Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe



ES 2 748 295 T3

Lys Gln Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg  
 980 985 990

Val His Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser  
 995 1000 1005

Pro Thr Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala  
 1010 1015 1020

Thr Phe Pro Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser  
 1025 1030 1035

Cys Arg Gln Val Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu  
 1040 1045 1050

Thr Ser Gly Asp Ser Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr  
 1055 1060 1065

Val His Ile Asp Leu Ser Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala  
 1070 1075 1080

Val Gln His Val Val Ile Gly Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe  
 1085 1090 1095

Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys Val Tyr His Gly  
 1100 1105 1110

Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile His Cys Ala Val Lys  
 1115 1120 1125

Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu  
 1130 1135 1140

Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Leu  
 1145 1150 1155

Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro Leu Val  
 1160 1165 1170

Val Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg  
 1175 1180 1185

Asn Glu Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly  
 1190 1195 1200

Leu Gln Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe  
 1205 1210 1215

ES 2 748 295 T3

Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys  
 1220 1225 1230

Phe Thr Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr  
 1235 1240 1245

Asp Lys Glu Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu  
 1250 1255 1260

Pro Val Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe  
 1265 1270 1275

Thr Thr Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu  
 1280 1285 1290

Leu Met Thr Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe  
 1295 1300 1305

Asp Ile Thr Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro  
 1310 1315 1320

Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp  
 1325 1330 1335

His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser  
 1340 1345 1350

Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val  
 1355 1360 1365

His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr  
 1370 1375 1380

Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp  
 1385 1390 1395

Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser  
 1400 1405

<210> 3

<211> 1382

<212> PRT

5 <213> Gallus gallus

<400> 3

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

ES 2 748 295 T3

Ala Leu Leu Gln Arg Ser His Gly Gln Cys Lys Glu Ala Ala Lys Lys  
 20 25 30

Ser Glu Met Asn Leu Asn Val Lys Tyr Asp Leu Pro Asn Phe Ile Thr  
 35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Val Leu Tyr Lys His His Val Tyr Ile  
 50 55 60

Gly Ala Val Asn Lys Ile Tyr Val Leu Asn Glu Thr Leu Gln Asn Ile  
 65 70 75 80

Ser Val Tyr Lys Thr Gly Pro Ile Leu Glu Ser Pro Gly Cys Ala Pro  
 85 90 95

Cys Glu Asp Cys Lys Asp Lys Ala Asn Leu Ser Asn Ser Val Trp Lys  
 100 105 110

Asp Asn Val Asn Met Ala Leu Leu Leu Glu Thr Tyr Tyr Asp Asp Gln  
 115 120 125

Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Ser Gly Gly Val Cys His Arg His Ile  
 130 135 140

Ile Pro Pro Asp Asn Pro Ala Asp Ile Glu Ser Glu Val His Cys Met  
 145 150 155 160

Tyr Ser Pro Gln Val Asp Gly Glu Ala Asp Asn Cys Pro Asp Cys Val  
 165 170 175

Val Ser Thr Leu Gly Thr Lys Val Leu Val Thr Glu Lys Asp Arg Phe  
 180 185 190

Val Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Met Thr Ser Ala Phe Gln Pro Pro  
 195 200 205

His Val Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Gln Asp  
 210 215 220

Gly Phe Glu Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Ile Leu Pro Gln  
 225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu His Asp  
 245 250 255

His Phe Val Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Ser Leu Asp Ser Gln  
 260 265 270

ES 2 748 295 T3

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Thr Leu Asp Ser Glu Met  
 275 280 285

Arg Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Phe Thr Glu Lys Arg  
 290 295 300

Arg Lys Arg Ser Ile Arg Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala  
 305 310 315 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Ala Leu Ala His Glu Met Gly Leu Gly  
 325 330 335

Leu Ile Asp Asp Ile Leu Tyr Gly Val Phe Ala Gln Thr Asn Gln Ile  
 340 345 350

Pro Gln Glu Pro Thr Asn Arg Ser Ala Val Cys Ala Val Ser Val Arg  
 355 360 365

Thr Ile Asn Glu Phe Phe Asn Lys Ile Val Asp Lys Gln Asn Met Lys  
 370 375 380

Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Lys Asp Ser Lys Tyr Cys Leu Asn Arg  
 385 390 395 400

Ala Phe Ser Arg Asn Ala Ser Tyr Cys Arg Ala Gln Asp Asp Glu Tyr  
 405 410 415

Arg Leu Glu Val Thr Thr Pro Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly  
 420 425 430

Gln Phe Asn Asn Ile Leu Leu Thr Ser Ile Ser Val Phe Thr Lys Gly  
 435 440 445

Asn Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln  
 450 455 460

Ile Val Val Ser Arg Ser Glu Pro Thr Ala Pro His Val Ser Phe Gln  
 465 470 475 480

Leu Asp Ser His Ala Val Ser Pro Gln Val Val Val Glu Gln Ser Ala  
 485 490 495

Ala Ala Asp Gly Tyr Thr Leu Val Val Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys  
 500 505 510

Val Pro Leu Asn Gly Pro Gly Cys His His Phe Gln Ser Cys Ser Gln  
 515 520 525

ES 2 748 295 T3

Cys Leu Leu Ala Pro Ala Phe Met Arg Cys Gly Trp Cys Gly Gln Gln  
530 535 540

Cys Leu Arg Ala Pro Glu Cys Asn Gly Gly Thr Trp Thr Gln Glu Thr  
545 550 555 560

Cys Leu Pro Arg Val Tyr Glu Ile Leu Pro Ser Ser Ala Pro Leu Glu  
565 570 575

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Leu Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Ser Lys  
580 585 590

Asn Asn Arg Phe Glu Leu Arg Asn Thr Val Val His Ile Gly Gly Gln  
595 600 605

Ile Cys Ala Leu Glu Ala Lys Ser Ser Asn Lys Asn Lys Leu Glu Cys  
610 615 620

Thr Ala Pro Ala Ala Lys Asn Ala Ser Phe Asn Ile Ser Ser Ser Val  
625 630 635 640

Ser Val Gly His Gly Lys Thr Leu Phe Asn Thr Phe Ser Tyr Val Asn  
645 650 655

Pro Ile Ile Thr Ser Ile Ser Pro Thr Tyr Gly Pro Lys Ser Gly Gly  
660 665 670

Thr Leu Leu Thr Ile Ala Gly Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Lys Ser Arg  
675 680 685

Arg Ile Phe Val Gly Glu Lys Pro Cys Ser Leu Lys Ser Thr Ser Glu  
690 695 700

Ser Ser Val Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Arg Ile Pro Gln Glu Tyr  
705 710 715 720

Arg Val Arg Val Gly Ile Asp Gly Ala Ile Arg Asp Ala Lys Gly Tyr  
725 730 735

Phe Thr Tyr Arg Glu Asp Pro Val Val Leu Lys Ile His Pro Ala Lys  
740 745 750

Ser Phe Leu Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Ala Gln Gly Ile Asn Leu  
755 760 765

Asn Ser Val Cys Phe Pro Arg Met Val Ile Thr Val Pro Lys Leu Gly

ES 2 748 295 T3

770

775

780

Met Asn Phe Ser Val Ala Cys Ser His Arg Ser Ser Ser Glu Ile Ile  
785 790 795 800

Cys Cys Thr Thr Pro Ser Leu Lys Ala Phe Asn Leu Gln Pro Pro Phe  
805 810 815

Val Thr Lys Val Phe Phe Ile Phe Asp Gly Val Ser Ser Leu Tyr Phe  
820 825 830

Asp Phe Asp Tyr Val Asn Asn Pro Val Phe Lys His Phe Glu Lys Pro  
835 840 845

Val Leu Ile Ser Arg Ser Asn Pro Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn  
850 855 860

His Ile Asp Ser Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn  
865 870 875 880

Lys Ser Cys Glu Asn Leu Leu Leu Gln Ser Glu Thr Ile Leu Cys Thr  
885 890 895

Val Pro Ser Asp Leu Leu Lys Ser Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp  
900 905 910

Lys Gln Glu Val Leu Ser Thr Val Ile Gly Lys Val Leu Ile Arg Gln  
915 920 925

Asp Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Thr Ser Val  
930 935 940

Leu Ile Tyr Ile Phe Leu Val Phe Phe Leu Trp Arg Arg Lys Lys Lys  
945 950 955 960

Gln Ile Lys Asp Leu Gly Ser Asp Leu Val Arg Tyr Asp Gly Arg Val  
965 970 975

His Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro  
980 985 990

Thr Thr Glu Met Val Ser Ser Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ser Thr Phe  
995 1000 1005

Leu Glu Asp Gln Phe Pro Ser Met Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg  
1010 1015 1020

ES 2 748 295 T3

Pro Ala Gln Tyr Pro His Ser Asp Leu Ser Pro Ile Leu Ser Ser  
 1025 1030 1035

Gly Asp Ser Asp Leu Ala Ser Pro Leu Leu Gln Thr Asn Val His  
 1040 1045 1050

Ile Asp Ile Ser Ala Leu Asn Pro Asp Leu Val Lys Glu Val Gln  
 1055 1060 1065

His Val Val Ile Gly Ala Asp Ser Leu Met Val His Phe Ser Glu  
 1070 1075 1080

Val Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys Val Ser His Gly Thr Leu  
 1085 1090 1095

Leu Asp Asn Asp Gly Arg Lys Ile His Cys Ala Val Lys Ser Leu  
 1100 1105 1110

Asn Arg Ile Thr Asp Leu Glu Glu Val Ala Gln Phe Leu Lys Glu  
 1115 1120 1125

Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Thr His Pro Asn Val Leu Ser Leu  
 1130 1135 1140

Leu Gly Ile Cys Leu Pro Asn Glu Gly Ser Pro Leu Val Val Leu  
 1145 1150 1155

Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg Asn Glu  
 1160 1165 1170

Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly Leu Gln  
 1175 1180 1185

Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe Val His  
 1190 1195 1200

Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe Thr  
 1205 1210 1215

Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Val Tyr Asp Lys  
 1220 1225 1230

Glu Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val  
 1235 1240 1245

Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr  
 1250 1255 1260

ES 2 748 295 T3

Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met  
 1265 1270 1275

Thr Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Ser Phe Asp Ile  
 1280 1285 1290

Thr Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr  
 1295 1300 1305

Cys Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro  
 1310 1315 1320

Lys Pro Glu Met Arg Pro Ala Phe Ser Glu Leu Val Ser Lys Ile  
 1325 1330 1335

Ser Thr Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val His Val  
 1340 1345 1350

Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser  
 1355 1360 1365

Leu Leu Ser Ser Gln Asp Asn Thr Asp Met Asp Val Asp Thr  
 1370 1375 1380

<210> 4

<211> 1379

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 4

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

Ser Leu Val Gln Arg Ser His Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Val Lys  
 20 25 30

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala  
 35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Val Leu His Gly His His Ile Tyr Leu  
 50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Asp Lys Asp Leu Gln Lys  
 65 70 75 80

Val Ser Glu Phe Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Leu  
 85 90 95

ES 2 748 295 T3

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

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Leu Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp  
 115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His  
 130 135 140

Val Leu Pro Pro Asp Asn Ser Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys  
 145 150 155 160

Met Phe Ser Pro Glu Glu Glu Ser Gly Gln Cys Pro Asp Cys Val Val  
 165 170 175

Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Leu Ser Glu Lys Asp Arg Phe Ile  
 180 185 190

Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Pro Pro Gly Tyr  
 195 200 205

Ser Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Gln Asp Gly  
 210 215 220

Phe Lys Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu Phe  
 225 230 235 240

Gln Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Ile His Ala Phe Glu Ser Asn His  
 245 250 255

Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Lys Glu Thr Leu Asp Ala Gln Thr  
 260 265 270

Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Val Asp Ser Gly Leu His  
 275 280 285

Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg Arg  
 290 295 300

Lys Arg Ser Thr Arg Glu Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala Tyr  
 305 310 315 320

Val Ser Lys Pro Gly Ala Asn Leu Ala Lys Gln Ile Gly Ala Ser Pro  
 325 330 335

Ser Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser  
 340 345 350

ES 2 748 295 T3

Ala Glu Pro Val Asn Arg Ser Ala Val Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr  
 355 360 365

Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys  
 370 375 380

Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr  
 385 390 395 400

Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Ser Asp Glu Tyr Arg  
 405 410 415

Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Arg  
 420 425 430

Leu Asn Gln Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly Asp  
 435 440 445

Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val  
 450 455 460

Val Leu Ser Arg Thr Ala His Leu Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu  
 465 470 475 480

Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Pro Ser Asn  
 485 490 495

Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Val Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile  
 500 505 510

Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Gly His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys  
 515 520 525

Leu Ser Ala Pro Tyr Phe Ile Gln Cys Gly Trp Cys His Asn Gln Cys  
 530 535 540

Val Arg Phe Asp Glu Cys Pro Ser Gly Thr Trp Thr Gln Glu Ile Cys  
 545 550 555 560

Leu Pro Ala Val Tyr Lys Val Phe Pro Thr Ser Ala Pro Leu Glu Gly  
 565 570 575

Gly Thr Val Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Lys Asn  
 580 585 590

Asn Lys Phe Asp Leu Arg Lys Thr Lys Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser  
 595 600 605

ES 2 748 295 T3

Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Thr Asn Thr Leu Lys Cys Thr  
 610 615 620  
 Val Gly Pro Ala Met Ser Glu His Phe Asn Val Ser Val Ile Ile Ser  
 625 630 635 640  
 Asn Ser Arg Glu Thr Thr Gln Tyr Ser Ala Phe Ser Tyr Val Asp Pro  
 645 650 655  
 Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Arg Tyr Gly Pro Gln Ala Gly Gly Thr  
 660 665 670  
 Leu Leu Thr Leu Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg His  
 675 680 685  
 Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asp Ser  
 690 695 700  
 Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Thr Ser Asp Glu Phe Pro  
 705 710 715 720  
 Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ser Phe Ser  
 725 730 735  
 Tyr Arg Glu Asp Pro Val Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser Phe  
 740 745 750  
 Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Ile Gly Lys Thr Leu Asn Ser  
 755 760 765  
 Val Ser Leu Pro Lys Leu Val Ile Asp Val His Glu Val Gly Val Asn  
 770 775 780  
 Tyr Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys Cys  
 785 790 795 800  
 Thr Thr Pro Ser Leu Lys Gln Leu Gly Leu Gln Leu Pro Leu Lys Thr  
 805 810 815  
 Lys Ala Phe Phe Leu Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys His Phe Asp Leu  
 820 825 830  
 Thr Tyr Val His Asn Pro Val Phe Glu Pro Phe Glu Lys Pro Val Met  
 835 840 845  
 Ile Ser Ile Gly Asn Glu Asn Val Val Glu Ile Lys Gly Asn Asn Ile



ES 2 748 295 T3

Asp Gly Lys Lys Ile His Cys Ala Val Lys Ser Leu Asn Arg Ile  
 1100 1105 1110

Thr Asp Ile Glu Glu Val Ser Gln Phe Leu Thr Glu Gly Ile Ile  
 1115 1120 1125

Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Leu Ser Leu Leu Gly Ile  
 1130 1135 1140

Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro Leu Val Val Leu Pro Tyr Met  
 1145 1150 1155

Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg Asn Glu Thr His Asn  
 1160 1165 1170

Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly Leu Gln Val Ala Lys  
 1175 1180 1185

Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe Val His Arg Asp Leu  
 1190 1195 1200

Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe Thr Val Lys Val  
 1205 1210 1215

Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr Asp Lys Glu Tyr Tyr  
 1220 1225 1230

Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys Trp Met  
 1235 1240 1245

Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys Ser Asp  
 1250 1255 1260

Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr Arg Gly  
 1265 1270 1275

Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr Ile Tyr  
 1280 1285 1290

Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys Pro Asp  
 1295 1300 1305

Ala Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys Ala Glu  
 1310 1315 1320

Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser Ser Ile  
 1325 1330 1335

Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val His Val Asn Ala Thr  
 1340 1345 1350

Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu Leu Pro  
 1355 1360 1365

Ser Gln Asp Asn Ile Asp Gly Glu Gly Asn Thr  
 1370 1375

ES 2 748 295 T3

<210> 5

<211> 354

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 5

cagatccatt tggggcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc	60
tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca aactttagaa tgaactgggt gaagcaggct	120
ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct aactggaga gccaacatat	180
gttgatgact tgaagggacg gtttgccttc tctttgaaa cctctgccag cactgcctat	240
ttgcagatca acaacctcaa aatgaggac atggctacat atttctgtgc aaggaaaggg	300
attgcgaggg ctatggacta ctgggtcaa ggaacctcag tcacctctc gagt	354

10 <210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 6

Gln Ile His Leu Gly Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu	1 5 10 15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe	20 25 30
Arg Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met	35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Val Asp Asp Leu	50 55 60

ES 2 748 295 T3

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Lys Gly Ile Ala Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 7

<211> 339

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 7

aacattgtga	tgacacagtc	tccatcctcc	ctgagtgtgt	cagcaggaga	gatggtcact	60
atgagttgta	agtcacagtc	gagtcctgta	gacagtgga	atcaaagaa	ctacttgcc	120
tggtaccagc	agaaaccagg	gcagcctcct	caacttttga	tcttcggggc	atccactagg	180
gaatctgggg	tccctgatcg	cttcacaggc	agtgatctg	gaaccgattt	caactttacc	240
gtcagcagtg	tgacagctga	agacctggca	gtttattact	gtcagaatga	tcatagttat	300
ccgtacacgt	tgggagggg	gaccaagctg	gaaataaaa			339

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 8

Asn	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Ala	Gly
1				5				10						15	
Glu	Met	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser
			20					25					30		
Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
	35						40					45			

ES 2 748 295 T3

Pro Pro Gln Leu Leu Ile Phe Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

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

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

Asp His Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110

Lys

<210> 9

<211> 342

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 9

caggtccaac tgcaacagcc tggggctgaa ctggcaaaac ctggggcctc agtgaggatg 60  
 tcctgcaagg cttctggcta cacctttact agttactgga tgcactgggt aaaacagagg 120  
 cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gcagtgtca tattgagaac 180  
 aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 atgcaactga gcagcctgac atttgaggac tctgcagtct attactgtgc aagaggacgg 300  
 10 ttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctcga gt 342

<210> 10

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 10

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

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

ES 2 748 295 T3

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 11

<211> 324

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 11

gatattgtga tgaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctctgggga gaaggtcacc 60

ttgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tccggctact tgtactggta ccagcagaag 120

ccaggatcct cccccaaact ctggatttat agcacatcca acctggcttc tggagtcct 180

gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacagtcaa cagcatggag 240

gctgaagatg ctgcctetta tttctgccat cagtggagta gttaccatt cacgttcggc 300

10 tcggggacca agctggagct gaaa 324

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 12

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

ES 2 748 295 T3

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Gly  
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Val Asn Ser Met Glu  
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro  
 85 90 95

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

<210> 13

<211> 354

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 13

caggtgcagc tggatccgag ctgaagaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttccggcta cacctttacc aacttccgga tgaactgggt caagcaggcc 120

ccaggccagg gcctgaaatg gatgggctgg atcaaacacct acaccggcga gcccacctac 180

gtggacgacc tgaagggcag attcgtgttc tccctggaca cctccgtgtc caccgcctac 240

ctgcagatct ccagcctgaa ggccgaggat accgccgtgt actactgcgc ccggaagggg 300

10 atcgccagag ccatggatta ttggggccag ggcaccaccg tgacagtctc gagt 354

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 14

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

ES 2 748 295 T3

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Val Asp Asp Leu  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Lys Gly Ile Ala Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 15

<211> 339

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 15

gacatcgtga tgacccagtc ccccgactct ctggccgtgt ctctgggcga gagagccacc	60
atcaactgca agtcctccca gtcctgctg gactccggca accagaagaa ctacctggcc	120
tggtatcagc agaagcccgg ccagcctccc aagctgctga tctttggcgc ctccaccgg	180
gaatctggcg tgcccgatag attctccggc tccggctctg gcaccgactt taccctgacc	240
atcagctccc tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gccagaacga ccactcctac	300
ccctacacct tgggccaggg caccaagctg gaaatcaag	339

<210> 16

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 16

ES 2 748 295 T3

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

Lys

<210> 17

<211> 342

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 17

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgctgaa gtgaagaaac ccggctcctc cgtgaagggtg 60  
 tcctgcaagg cctccggcta cacctttacc agctactgga tgcactgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacagg gcctggaatg gatgggctac atcaaccct ccagcggcca catcgagaac 180  
 aaccagaaat tcaaggaccg cgtgaccatc accgccgaca agtccacctc caccgctac 240  
 atggaactgt cctccctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcaga 300  
 10 ttcgcctact ggggccaggg caccctogtg acagtctcga gt 342

<210> 18

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

ES 2 748 295 T3

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 19

<211> 324

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

10 <400> 19

gagatcgtgc tgaccagtc tcctgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagctacc 60

ctgtcctgct ccgcctcctc ctctgtgtcc tccggctacc tgtactggta tcagcagaag 120

cccggccagg cccctcggct gctgatctac tctacctcca acctggcctc cggcatccct 180

gccagattct ccggctctgg ctctggcacc gactttacc tgaccatctc cagcctggaa 240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccac cagtgggtcca gctaccctt cacctttggc 300

tccggcacca agctggaaat caag 324

<210> 20

<211> 108

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

ES 2 748 295 T3

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 20

```

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Gly
          20          25          30

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

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

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

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

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 21

5 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 21

```

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe Arg
1          5

```

<210> 22

<211> 8

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

20 <400> 22

```

Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro
1          5

```

<210> 23

<211> 11

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"  
 <400> 23  
**Ala Arg Lys Gly Ile Ala Arg Ala Met Asp Tyr**  
**1 5 10**  
 <210> 24  
 <211> 12  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"  
 15 <400> 24  
**Gln Ser Leu Leu Asp Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr**  
**1 5 10**  
 <210> 25  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"  
 <400> 25  
**Gly Ala Ser**  
 25 **1**  
 <210> 26  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"  
 <400> 26  
**Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Tyr Thr**  
**1 5**  
 35 <210> 27

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"  
 <400> 27  
**Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp**  
 1 5  
 <210> 28  
 10 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"  
 <400> 28  
**Ile Asn Pro Ser Ser Gly His Ile**  
 1 5  
 <210> 29  
 <211> 7  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"  
 25 <400> 29  
**Ala Arg Gly Arg Phe Ala Tyr**  
 1 5  
 <210> 30  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"  
 <400> 30  
 35 **Ser Ser Val Ser Ser Gly Tyr**  
 1 5

<210> 31  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"  
 <400> 31  
**Ser Thr Ser**  
 1  
 10 <210> 32  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"  
 <400> 32  
**His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Phe Thr**  
 1 5  
 <210> 33  
 20 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 25 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"  
 <400> 33

ES 2 748 295 T3

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

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

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

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

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

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

Asp His Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
 145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
 165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
 180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215 220

<210> 34

<211> 447

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 34

ES 2 748 295 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Val Asp Asp Leu  
50 55 60

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

ES 2 748 295 T3

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Lys Gly Ile Ala Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

ES 2 748 295 T3

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445

<210> 35

<211> 215

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 35

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Gly  
 20 25 30

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

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

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

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

10

ES 2 748 295 T3

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala  
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser  
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu  
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 36

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 36

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

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

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

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

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

ES 2 748 295 T3

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

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

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser  
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys  
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu  
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu  
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr  
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val  
195 200 205

Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
325 330 335

ES 2 748 295 T3

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
 405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440

<210> 37

<211> 19

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 37

Ser Thr Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Ile Val Ser Phe Leu Phe Cys  
 1 5 10 15

10 Phe Ala Ser

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 38

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

20 <210> 39

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

5 <400> 39

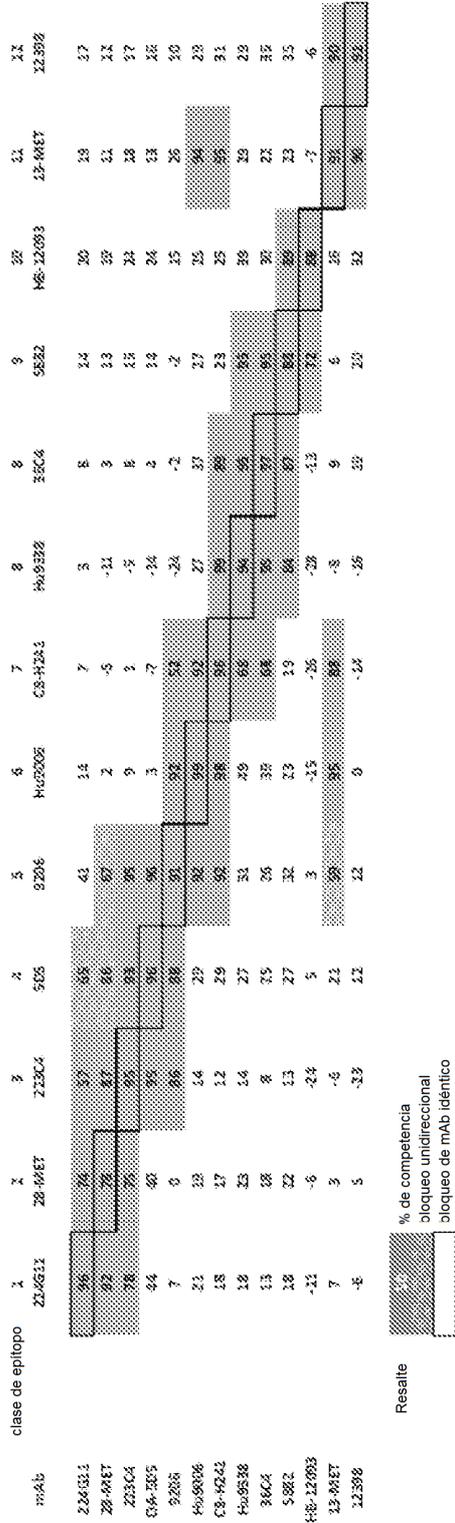
Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr  
1                   5                   10

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición de anticuerpos que comprende un primer anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo y un segundo anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde:
- 5 a) la cadena pesada (H) CDR1-3 y la cadena ligera (L) CDR1-3 de dicho primer anticuerpo anti-MET comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24, 25 y 26, respectivamente; y
- b) la cadena pesada (H) CDR1-3 y la cadena ligera (L) CDR1-3 de dicho segundo anticuerpo anti-MET comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NOs: 27, 28, 29, 30, 31 y 32, respectivamente.
2. La composición de anticuerpos de conformidad con la reivindicación 1, en donde
- 10 a) el dominio variable de cadena pesada (VH) y el dominio variable de cadena ligera (VL) de dicho primer anticuerpo anti-MET son por lo menos un 90% idénticos en secuencia respecto a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 6 y 8, respectivamente, y el VH y el VL de dicho segundo anticuerpo anti-MET son por lo menos un 90% idénticos en secuencia respecto a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 10 y 12, respectivamente;
- 15 b) el VH y el VL de dicho primer anticuerpo anti-MET comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 6 y 8, respectivamente, y el VH y el VL de dicho segundo anticuerpo anti-MET comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 10 y 12, respectivamente;
- c) el VH y el VL de dicho primer anticuerpo anti-MET son por lo menos un 90% idénticos en secuencia respecto a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 14 y 16, respectivamente, y el VH y el VL de dicho segundo anticuerpo anti-MET son por lo menos un 90% idénticos en secuencia respecto a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 18 y 20, respectivamente; o
- 20 d) el VH y el VL de dicho primer anticuerpo anti-MET comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 14 y 16, respectivamente, y el VH y el VL de dicho segundo anticuerpo anti-MET comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 18 y 20, respectivamente.
3. La composición de anticuerpos de conformidad con la reivindicación 1, en donde
- 25 la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de dicho primer anticuerpo anti-MET comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 34 y 33, respectivamente, y
- la HC y la LC de dicho segundo anticuerpo anti-MET comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y 35, respectivamente.
4. La composición de anticuerpos de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque esa composición tiene por lo menos una propiedad seleccionada del grupo constituido por:
- 30 a) induce la degradación de MET;
- b) inhibe el crecimiento *in vitro* de por lo menos una línea celular seleccionada de SNU5, EBC1, MKN45, Katoll, OE33 y Okajima;
- c) inhibe la fosforilación de MET;
- d) inhibe MET señalización en dirección 3'; e
- 35 e) inhibe la proliferación de células endoteliales primarias en presencia o ausencia de HGF.
5. Un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo:
- a) tiene H-CDR1-3 y L-CDR1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24, 25 y 26, respectivamente;
- 40 b) tiene un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;
- c) tiene un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; o
- d) tiene una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33.
- 45 6. Un anticuerpo anti-MET o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo:

- a) tiene H-CDR1-3 y L-CDR1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 27, 28, 29, 30, 31 y 32, respectivamente;
- b) tiene un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;
- 5 c) tiene un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; o
- d) tiene un HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.
- 10 7. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno del mismo, y una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno del mismo, del anticuerpo anti-MET de la reivindicación 5 o 6.
8. Una célula hospedera que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de la misma, y una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno de la misma, del anticuerpo anti-MET de la reivindicación 5 o 6.
- 15 9. Un método para producir el anticuerpo o porción de unión a antígeno de la reivindicación 5 o 6, que comprende:  
proporcionar una célula hospedera de conformidad con la reivindicación 8,  
cultivar dicha célula hospedera en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo o porción, y  
aislar el anticuerpo o porción resultante.
10. Un método para producir la composición de anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende
- 20 proporcionar una primera célula hospedera capaz de expresar el primer anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno y una segunda célula hospedera capaz de expresar el segundo anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno,  
cultivar dichas primera y segunda células hospederas en condiciones adecuadas para la expresión de los anticuerpos o porciones, y
- 25 aislar los anticuerpos o porciones resultantes, opcionalmente en donde la primera y segunda células hospederas se cultivan en un único biorreactor.
11. Una composición farmacéutica que comprende la composición de anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o el anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno de la reivindicación 5 o 6, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 12. Una molécula de unión biespecífica que tiene las especificidades de unión del primer y segundo anticuerpos anti-MET o porciones de unión a antígeno de la composición de anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la molécula de unión biespecífica comprende un primer sitio de unión a antígeno que comprende las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24, 25 y 26, respectivamente, y un segundo sitio de unión a antígeno que comprende las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de SEQ ID NOs: 27, 28,
- 35 29, 30, 31 y 32, respectivamente.
13. La composición de anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, el anticuerpo anti-MET o porción de unión a antígeno de la reivindicación 5 o 6, la composición farmacéutica de la reivindicación 11, o la molécula de unión biespecífica de la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento de un paciente humano con cáncer.

FIGURA 1



# ES 2 748 295 T3

Perspectiva general de constructos													Resultados de unión											
constructo de MET	SEMA $\alpha$				SEMA $\beta$				PSI-1TP4					Anticuerpos										
	25	84	163	234	308	431	480	516	563	657	742	837	933	986	Hu0006	Hu0338	S82	CS-4241	36c-3	305	224611	Anti-SV5	Centrinab	
<b>MET Humana</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<b>MET de pollo</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>MET de ratón</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Constructos quiméricos</b>																								
<b>SEMA <math>\alpha</math> de pollo</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>SEMA <math>\beta</math> de pollo</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Dominio PSI de pollo</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<b>Dominio IPT1 de pollo</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<b>Dominio IPT2 de pollo</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<b>Dominio IPT3 de pollo</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<b>Dominio IPT4 de pollo</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<b>Hoja de ratón 1</b>	AA 1	AA 25-83	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<b>Hoja de ratón 1-2</b>	AA 1	AA 25-162	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
<b>Hoja de ratón 1-3</b>	AA 1	AA 25-233	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<b>Hoja de ratón 1-4</b>	AA 1	AA 25-295	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
<b>Hoja de ratón 1-5</b>	AA 1	AA 25-430	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
<b>Hoja de ratón 1-6</b>	AA 1	AA 25-479	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<b>Hoja de ratón 1-7</b>	AA 1	AA 25-513	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<b>PSI-IPT4 de ratón</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	AA 515-992	SV5-GPI	+	+	+	+	+	-	-	-	-					
<b>Hoja de ratón 7-IPT4</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	AA 480-992	SV5-GPI	+	+	+	+	+	-	-	-	-					
<b>Hoja de ratón 6-IPT4</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	AA 431-992	SV5-GPI	+	+	+	+	+	-	-	-	-					
<b>Hoja de ratón 5b</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	AA 382-992	SV5-GPI	+	+	+	+	+	-	-	-	-					
<b>Hoja de ratón 5a</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	AA 296-992	SV5-GPI	+	+	+	+	+	-	-	-	-					
<b>Hoja de ratón 4</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	AA 234-992	SV5-GPI	+	+	+	+	+	-	-	-	-					
<b>Hoja de ratón 3</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	AA 163-992	SV5-GPI	+	+	+	+	+	-	-	-	-					
<b>Hoja de ratón 2</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	AA 84-992	SV5-GPI	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
<b>LS1</b>	AA 1	AA 25-122	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	+	+	+	+	+	N.D.	+	+		
<b>LS2</b>	AA 1	AA 25-224	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	-	-	-	-	-	-	-	-				
<b>LS3</b>	AA 1	AA 25-312	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	-	-	-	-	-	-	-	-					
<b>LS4</b>	AA 1	AA 25-371	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	-	-	-	-	-	-	-	-						
<b>LS5</b>	AA 1	AA 25-473	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI	-	-	-	-	-	-	-	-							
<b>L113</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	AA 735-764	SV5-GPI	+	+	+	+	+	+	N.D.	+			
<b>L114</b>	AA 1	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5	Hoja 6	Hoja 7	PSI	IPT1	IPT3	AA 775-862	SV5-GPI	+	+	+	+	+	+	+	N.D.	+		

FIGURA 2

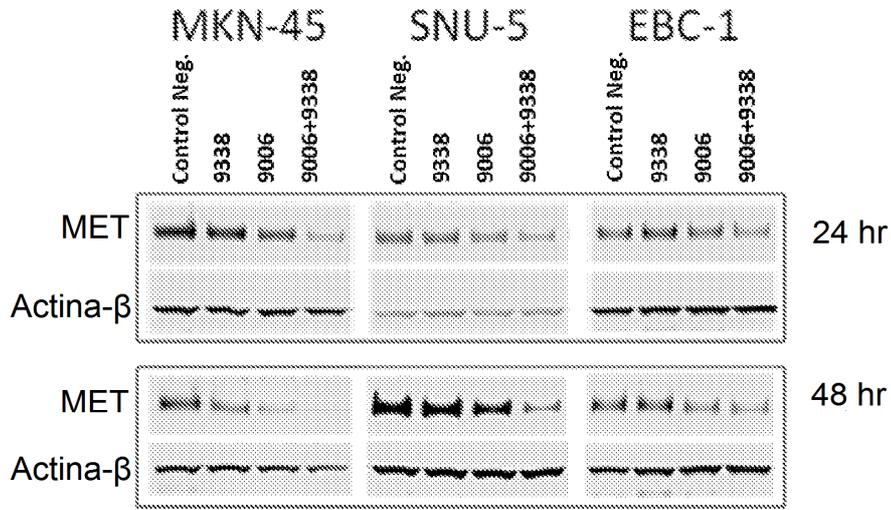


FIGURA 3

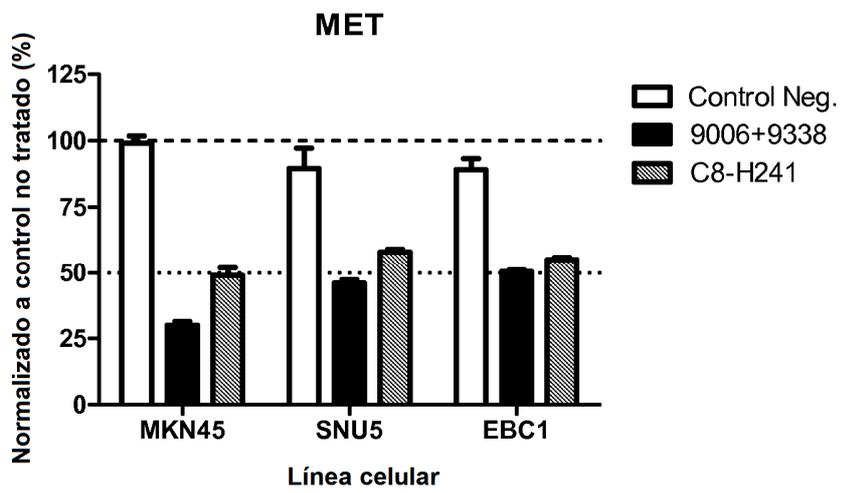
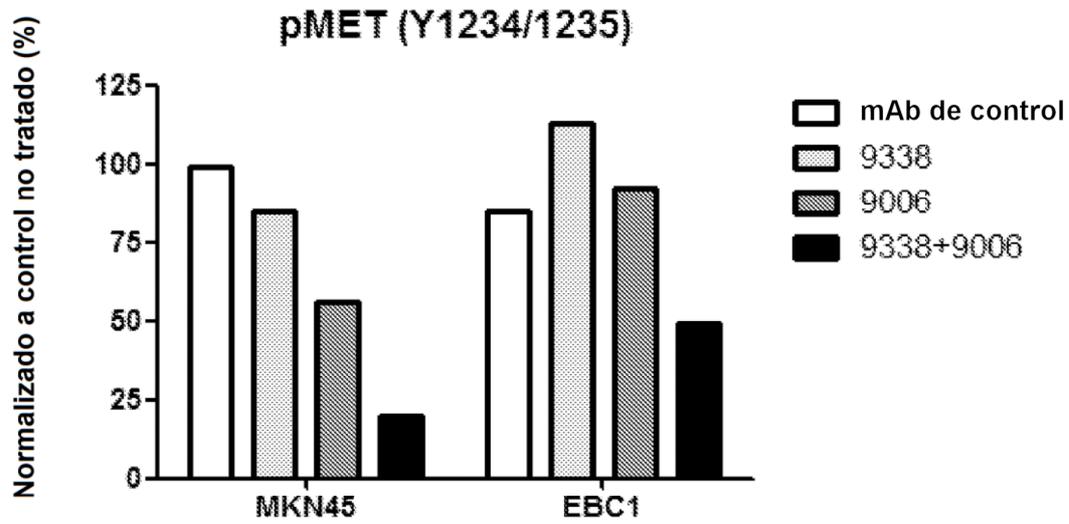


FIGURA 4

A



B

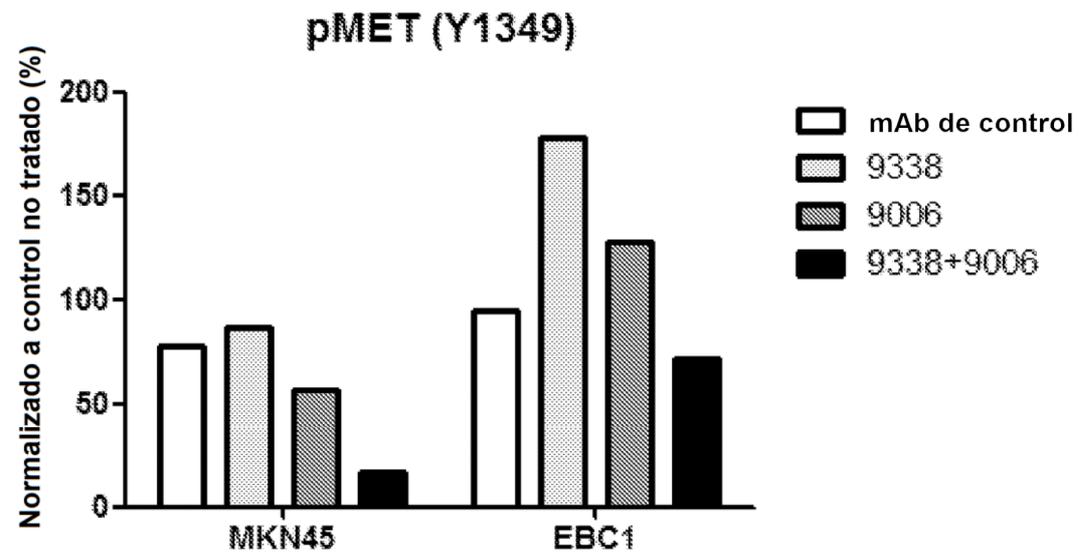
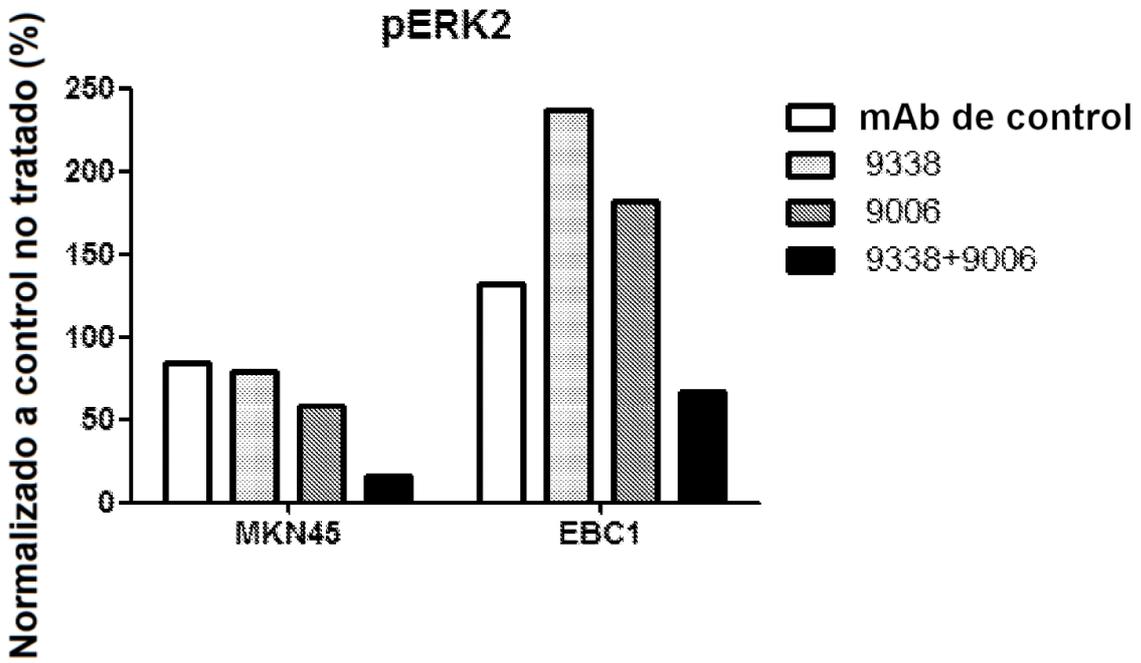


FIGURA 5

A



B

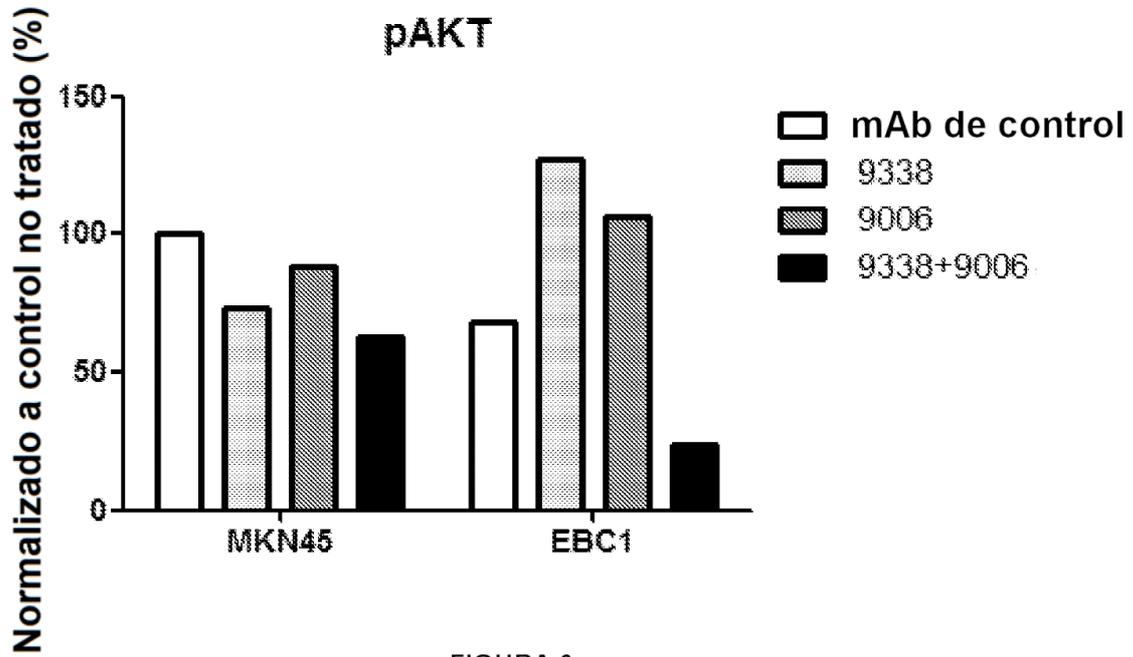


FIGURA 6

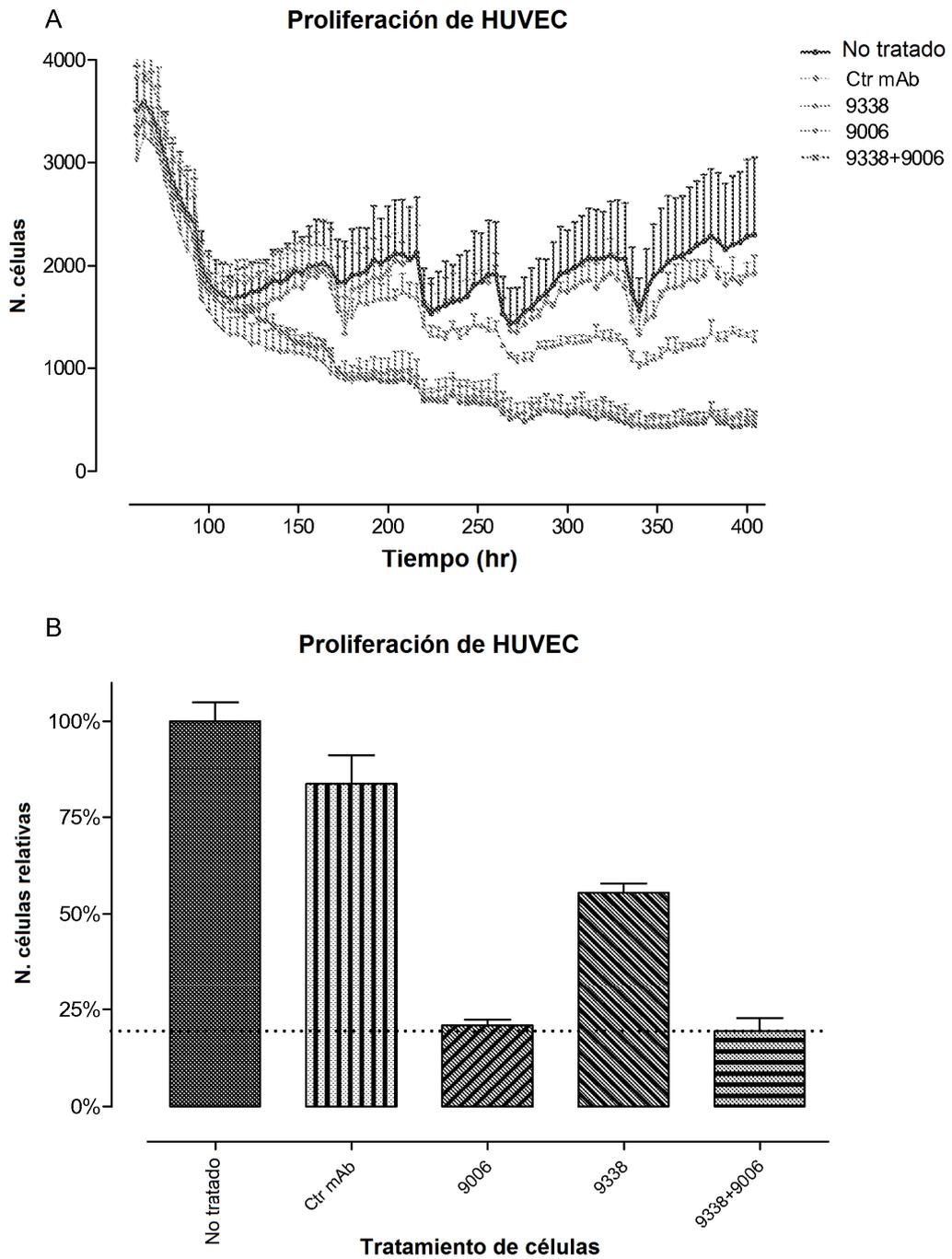


FIGURA 7

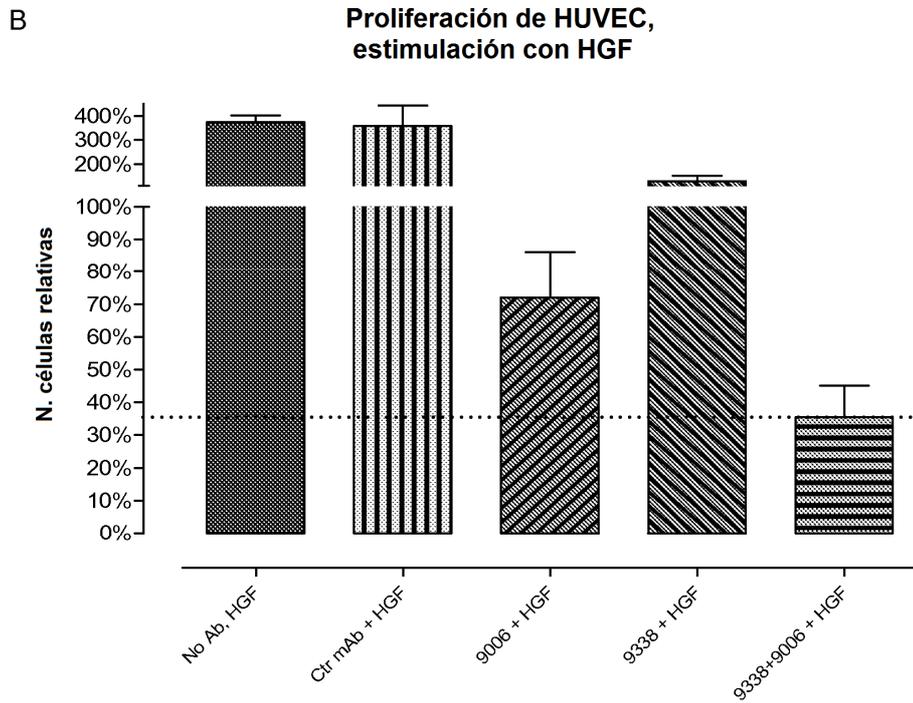
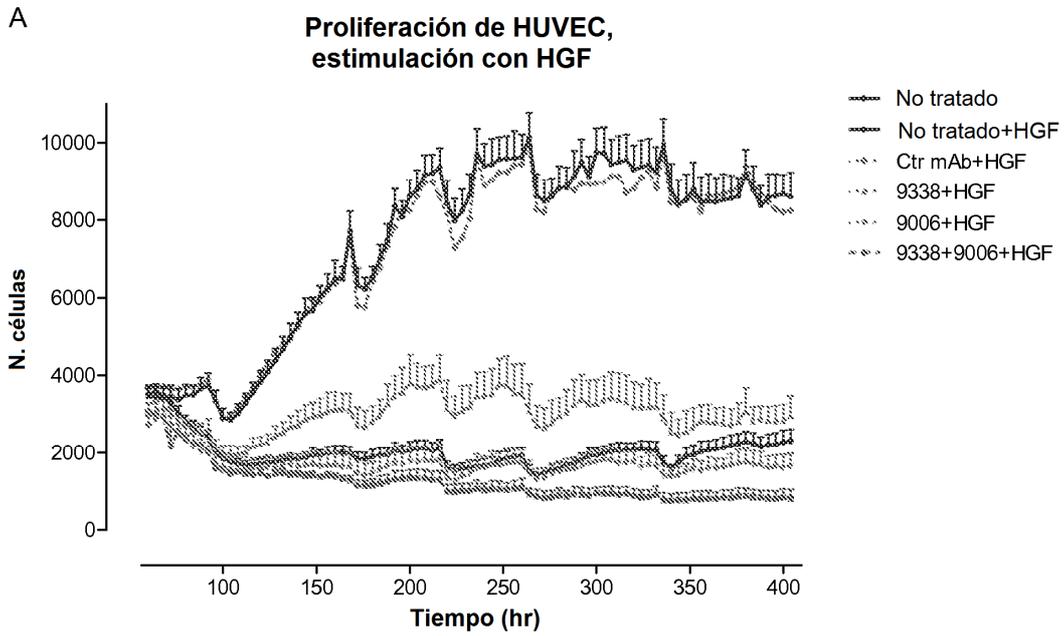


FIGURA 8

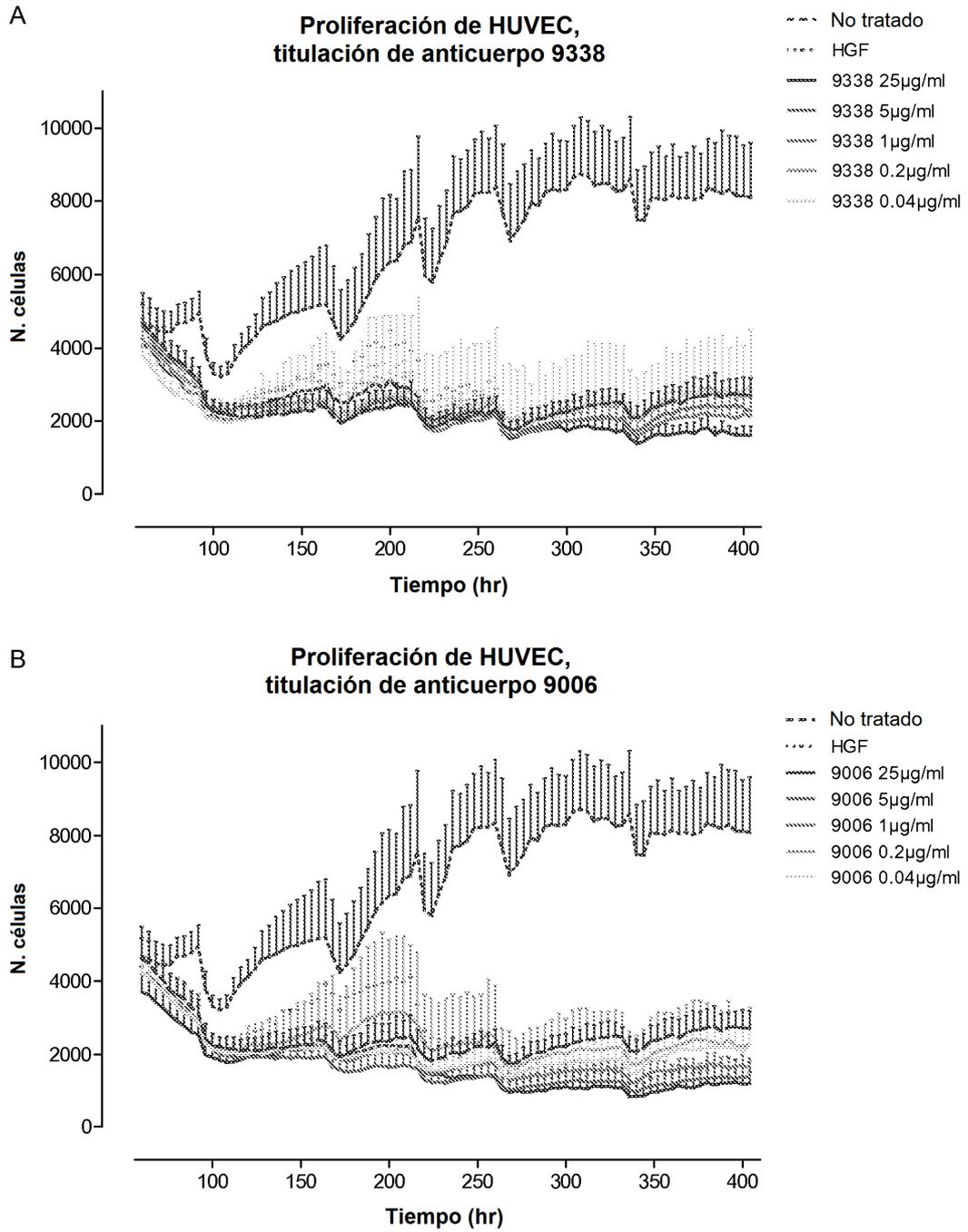


FIGURA 9

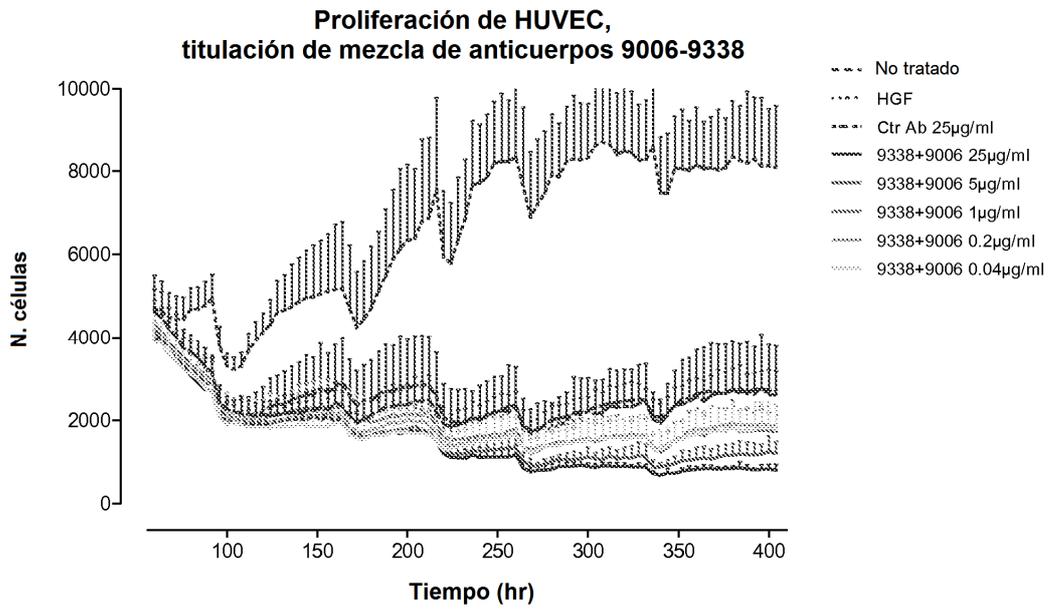


FIGURA 10

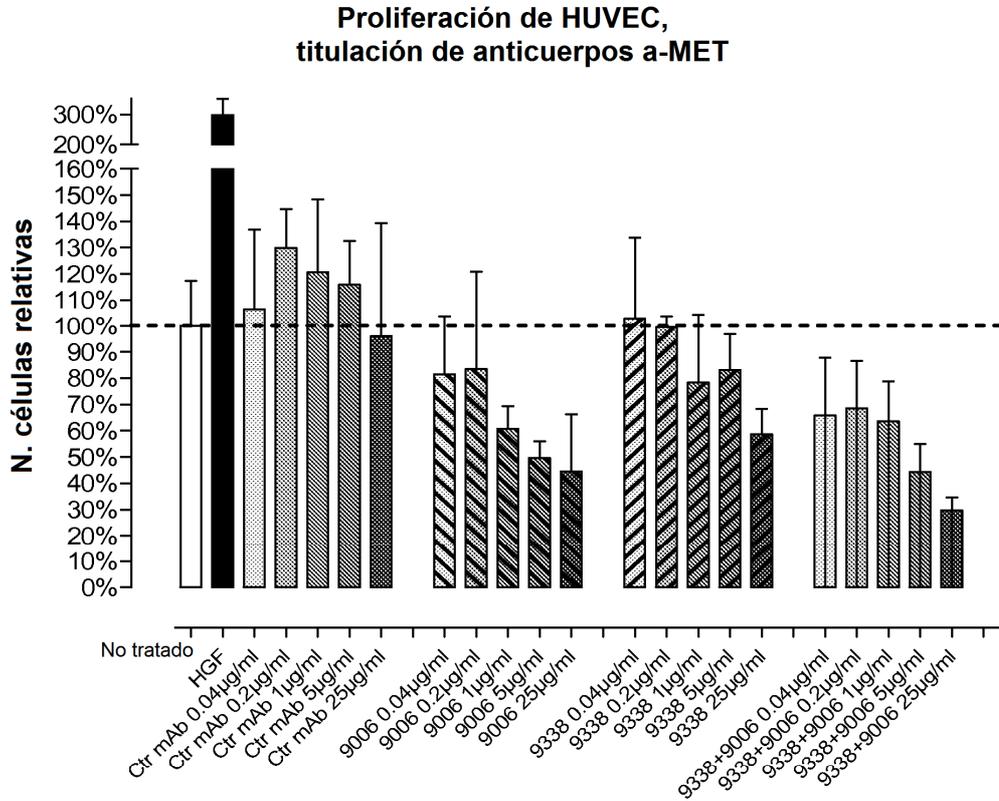


FIGURA 11

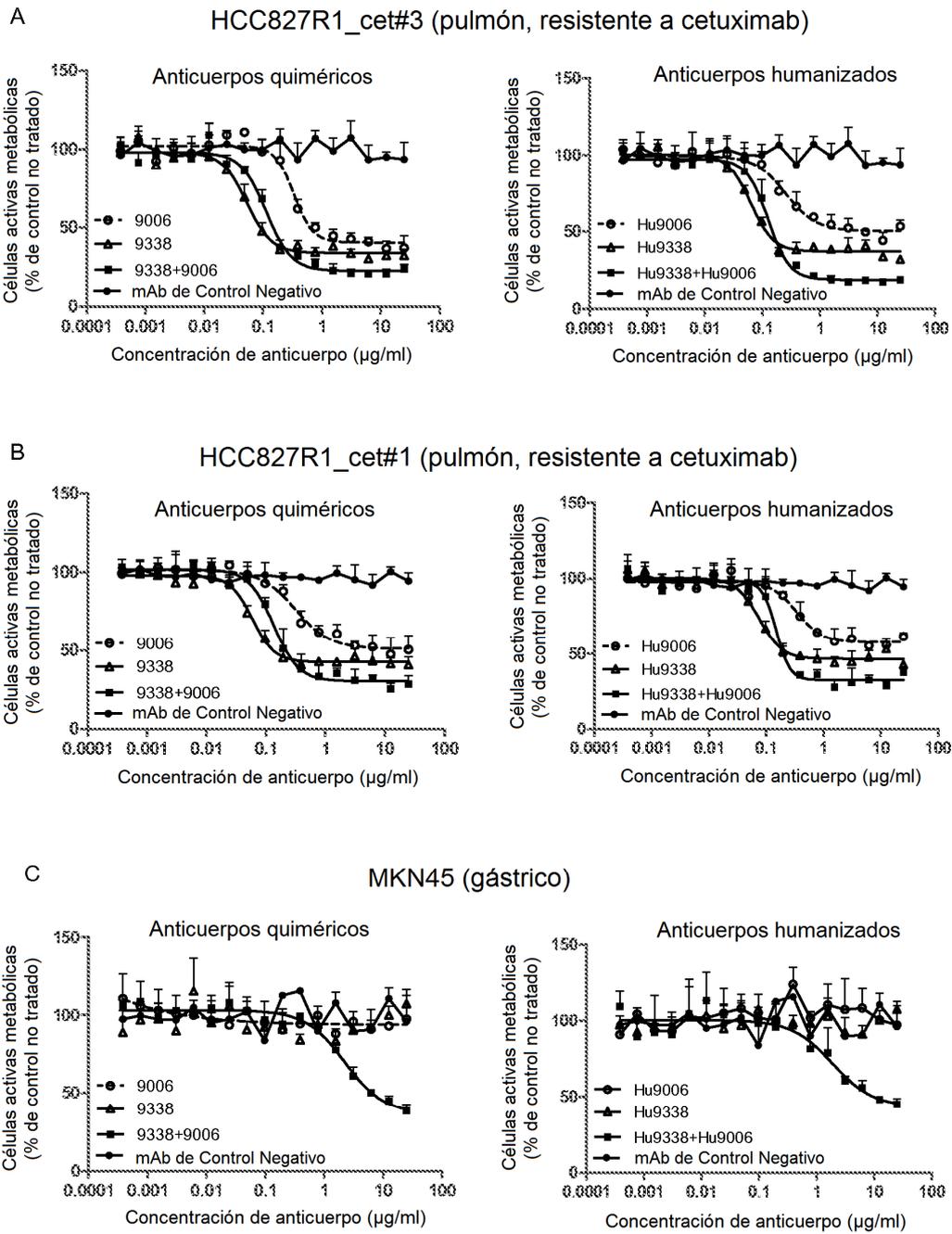


FIGURA 12

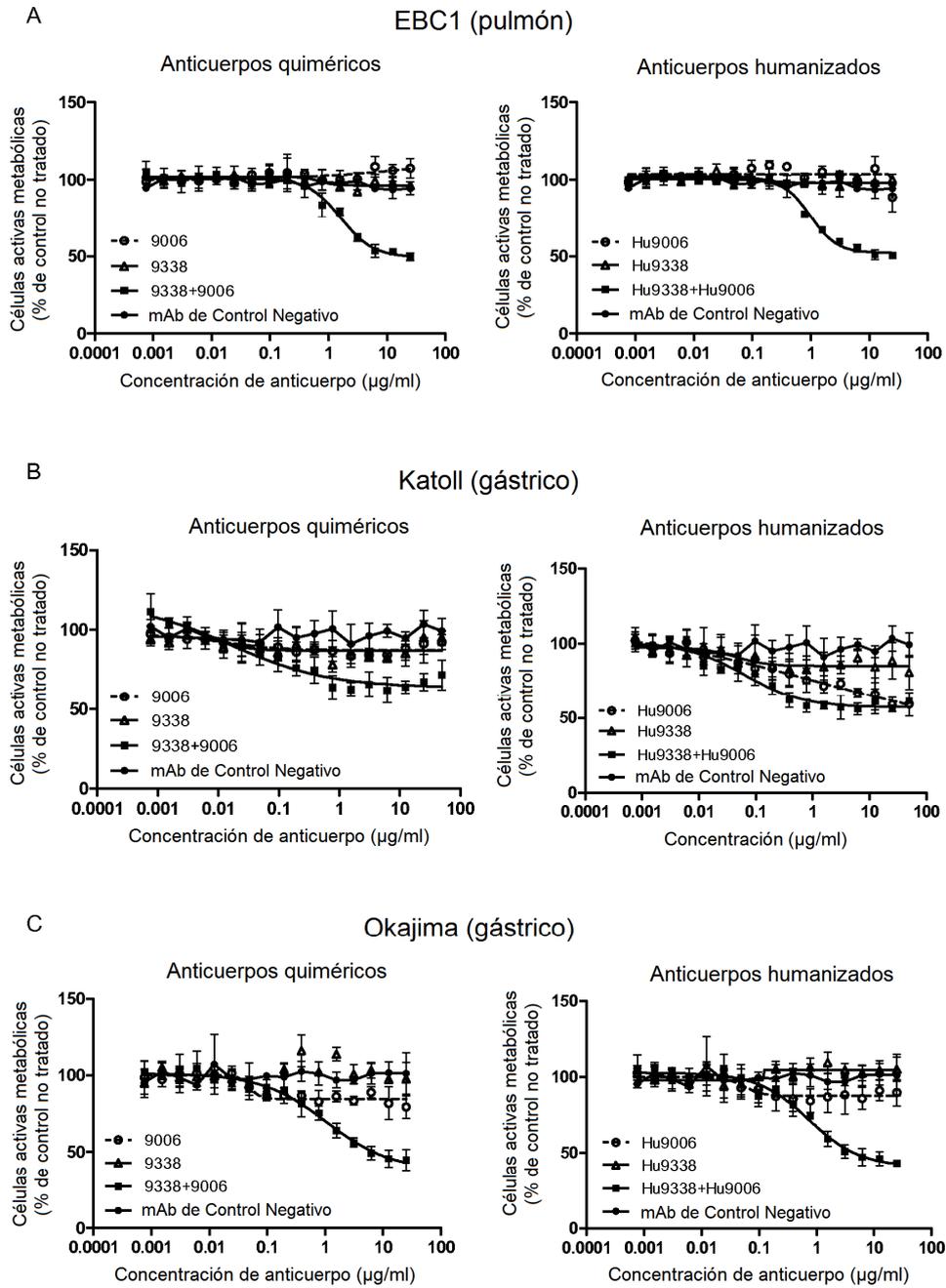


FIGURA 13

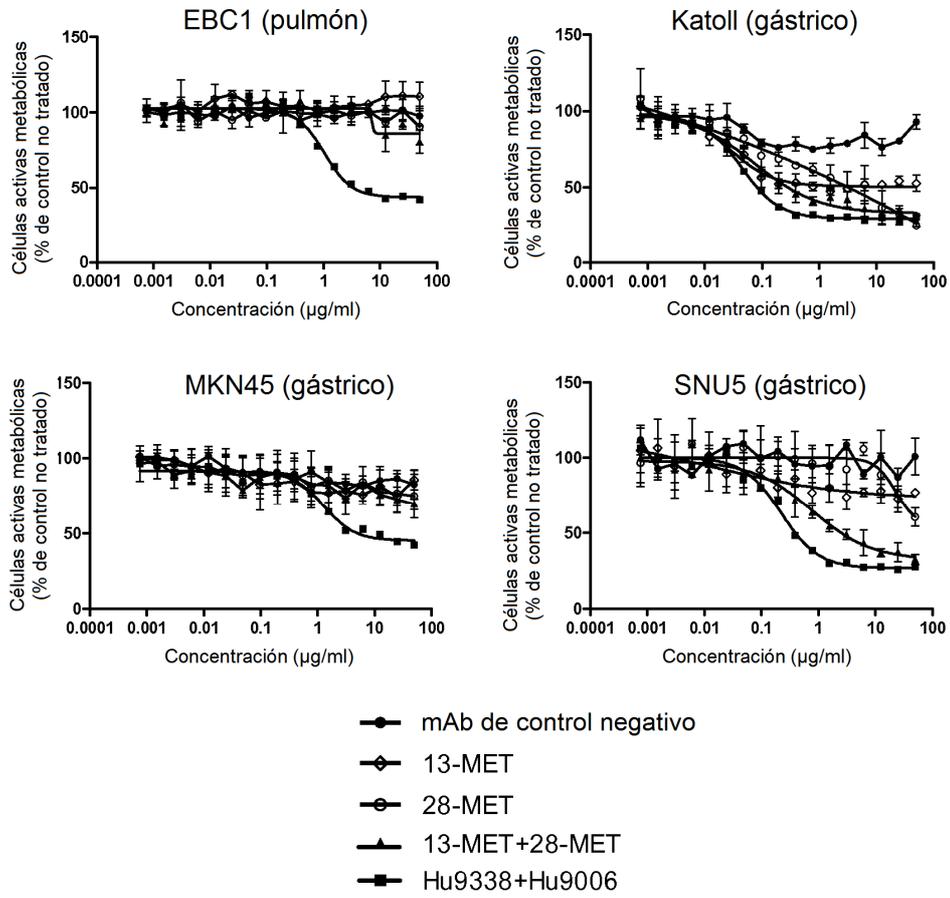


FIGURA 14

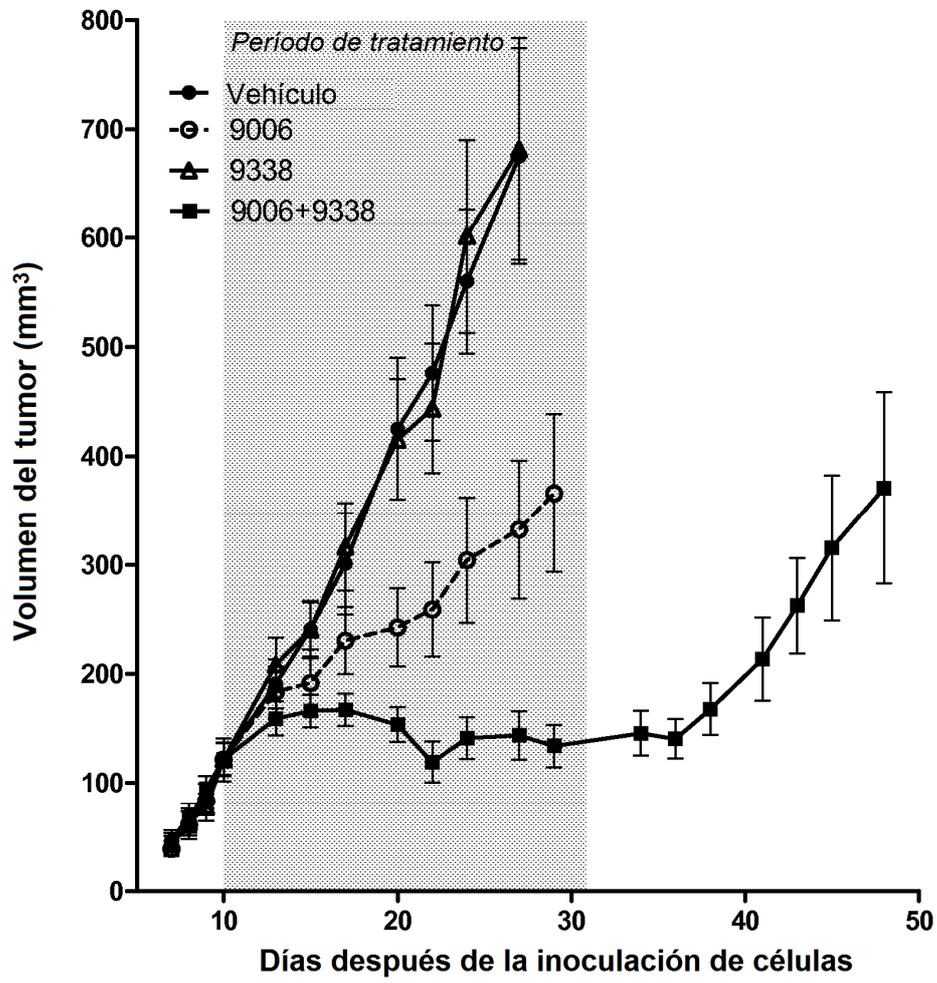


FIGURA 15

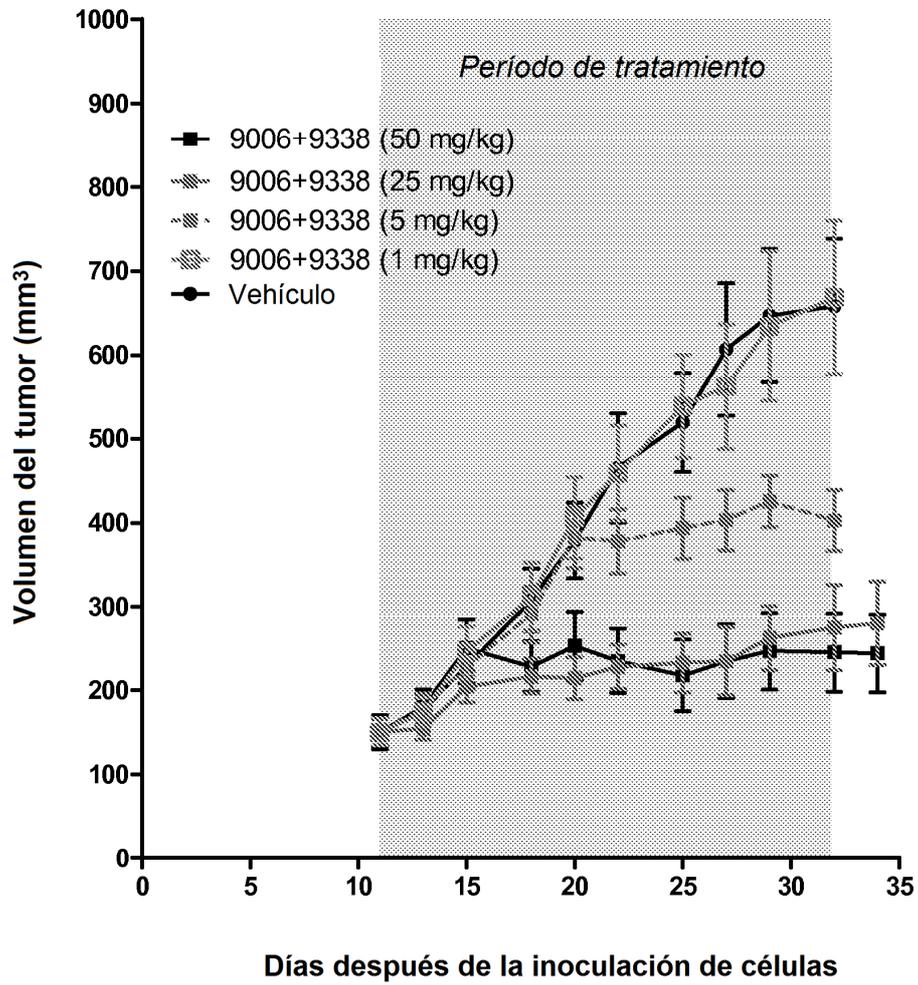


FIGURA 16

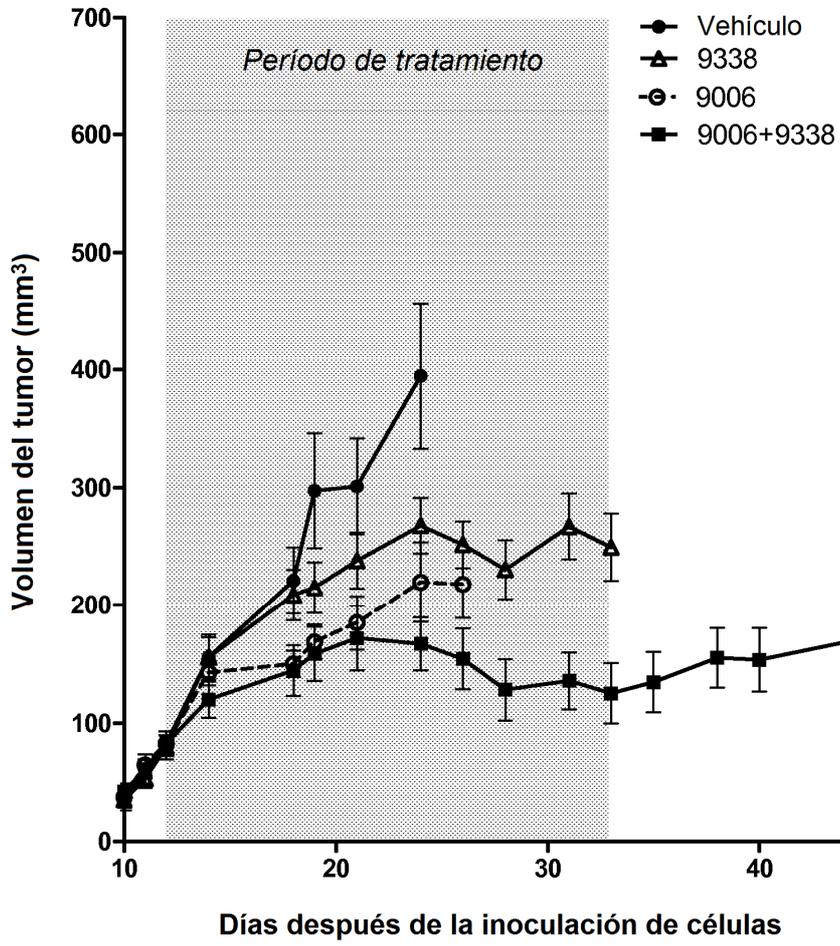


FIGURA 17

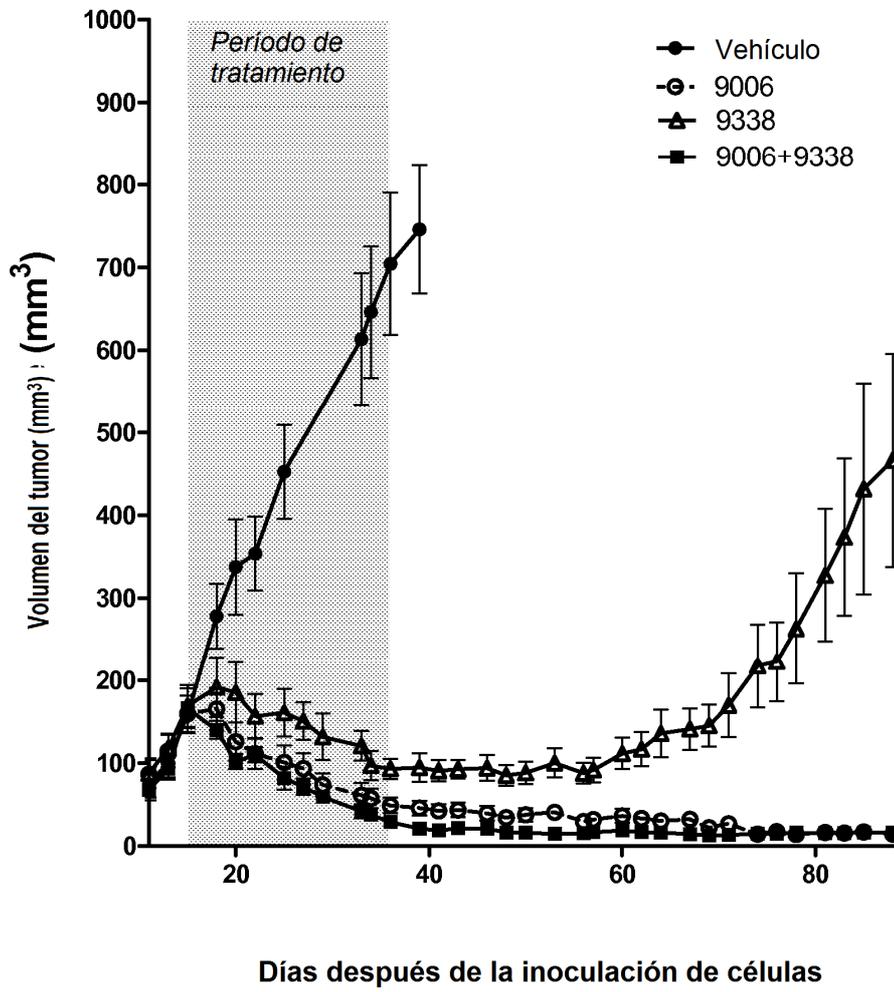


FIGURA 18

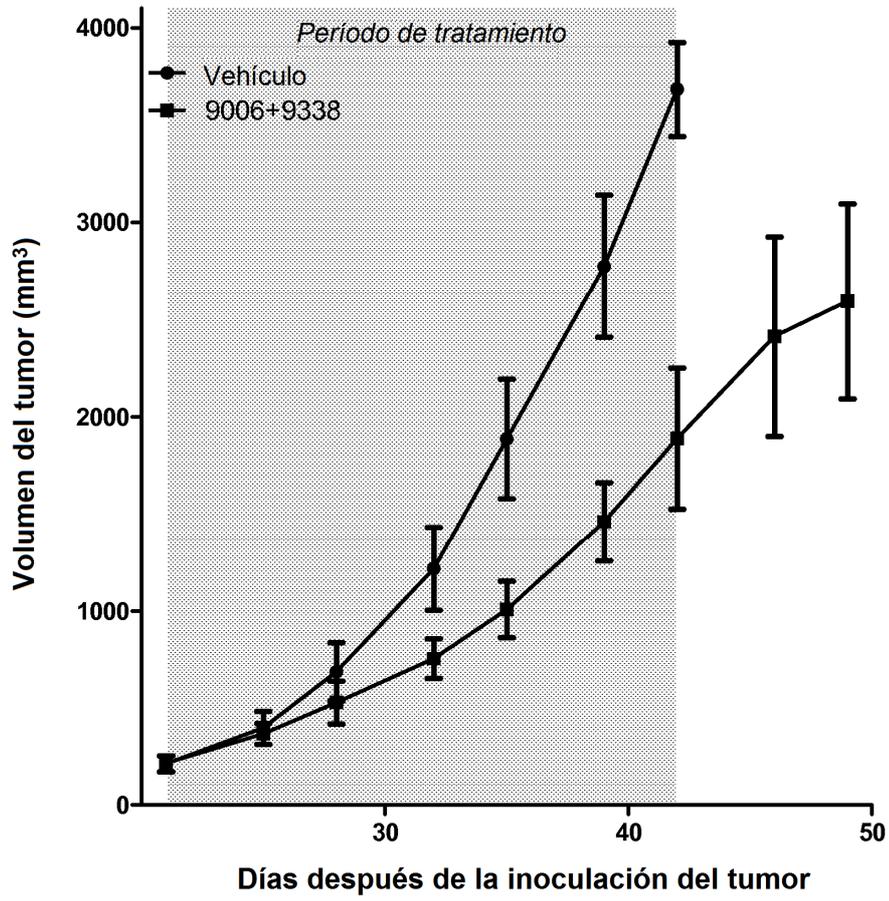


FIGURA 19

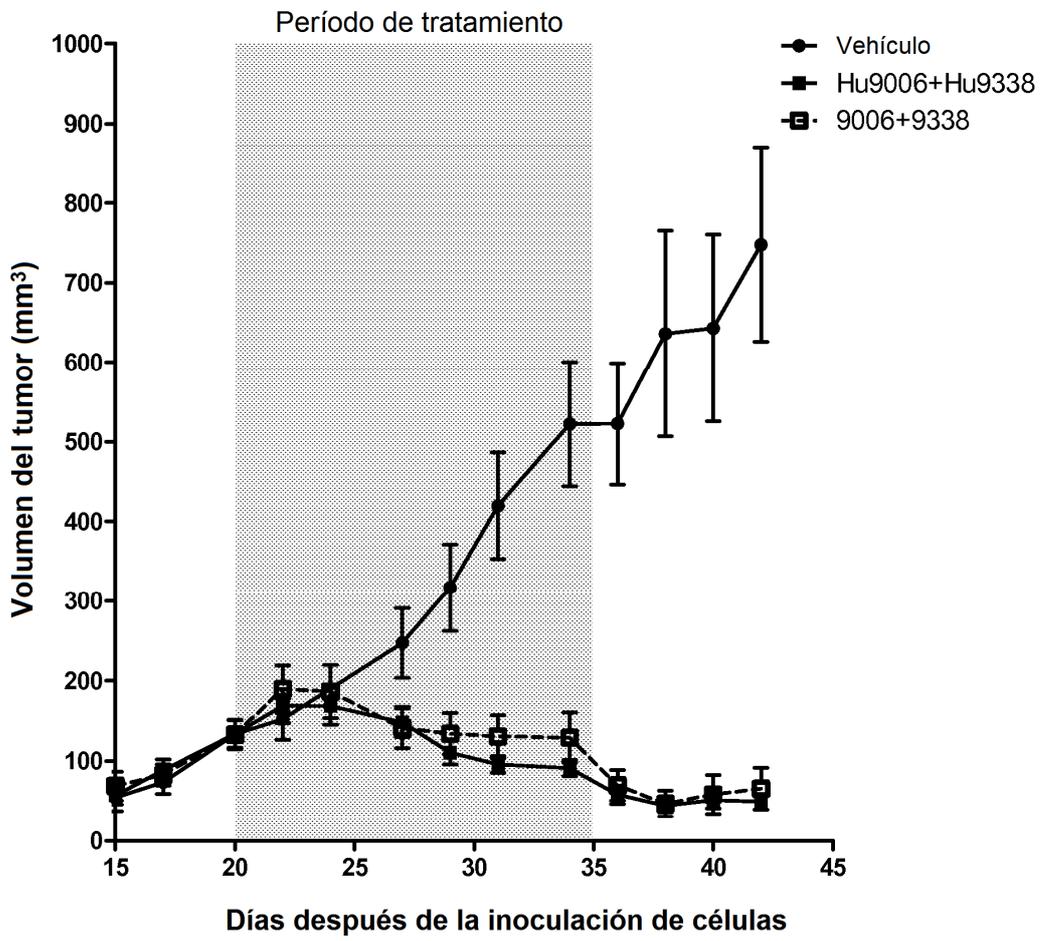


FIGURA 20

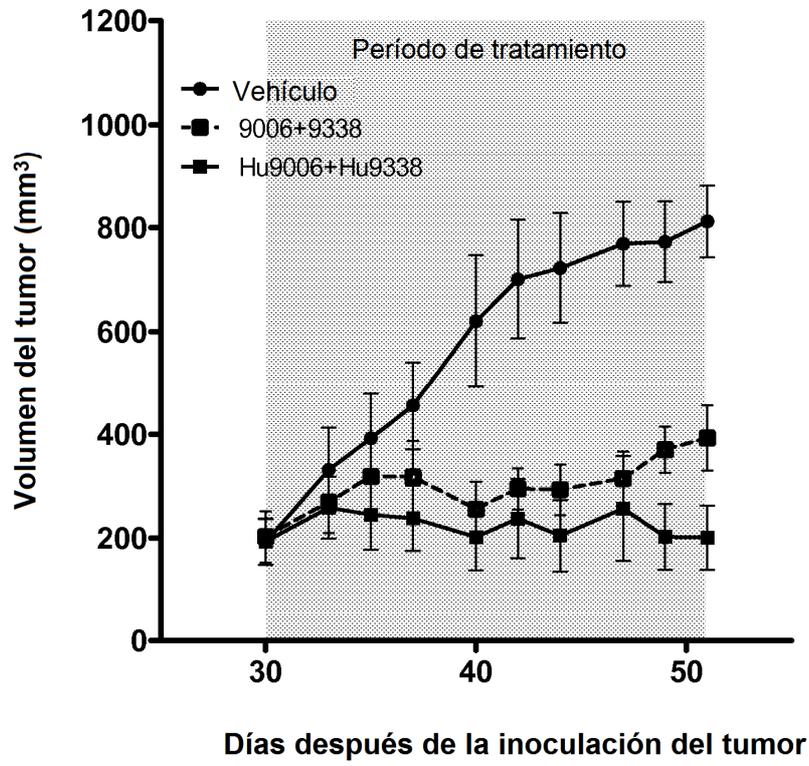


FIGURA 21

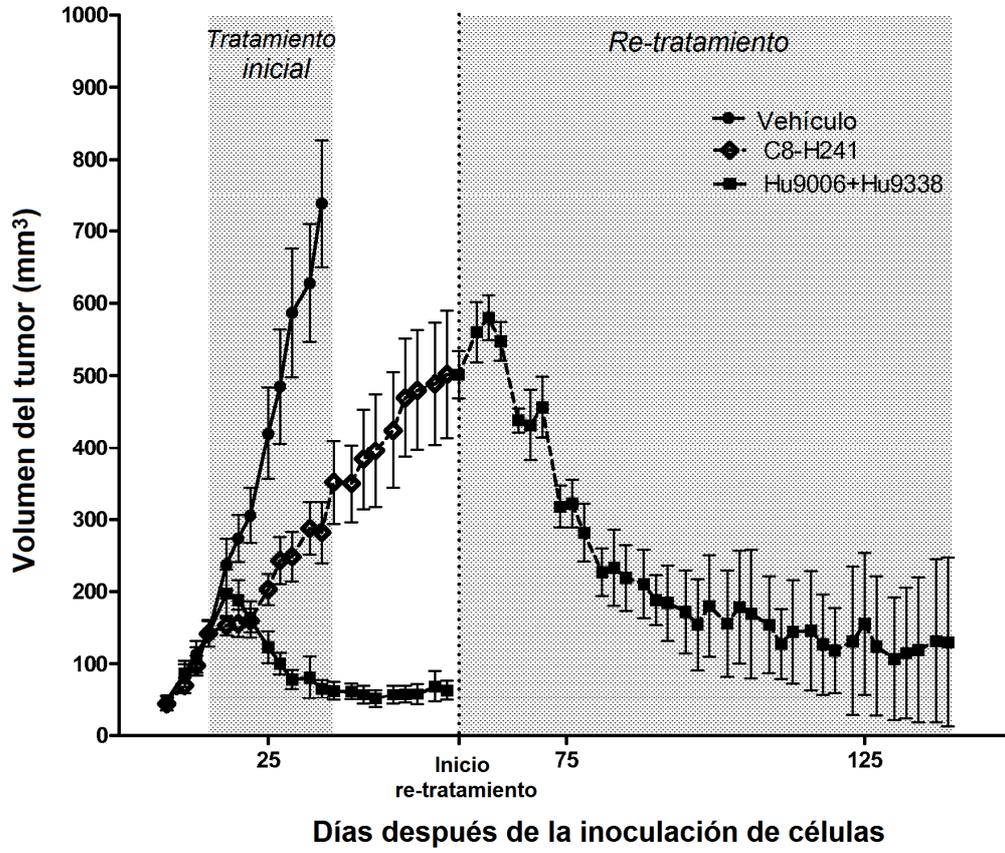


FIGURA 22

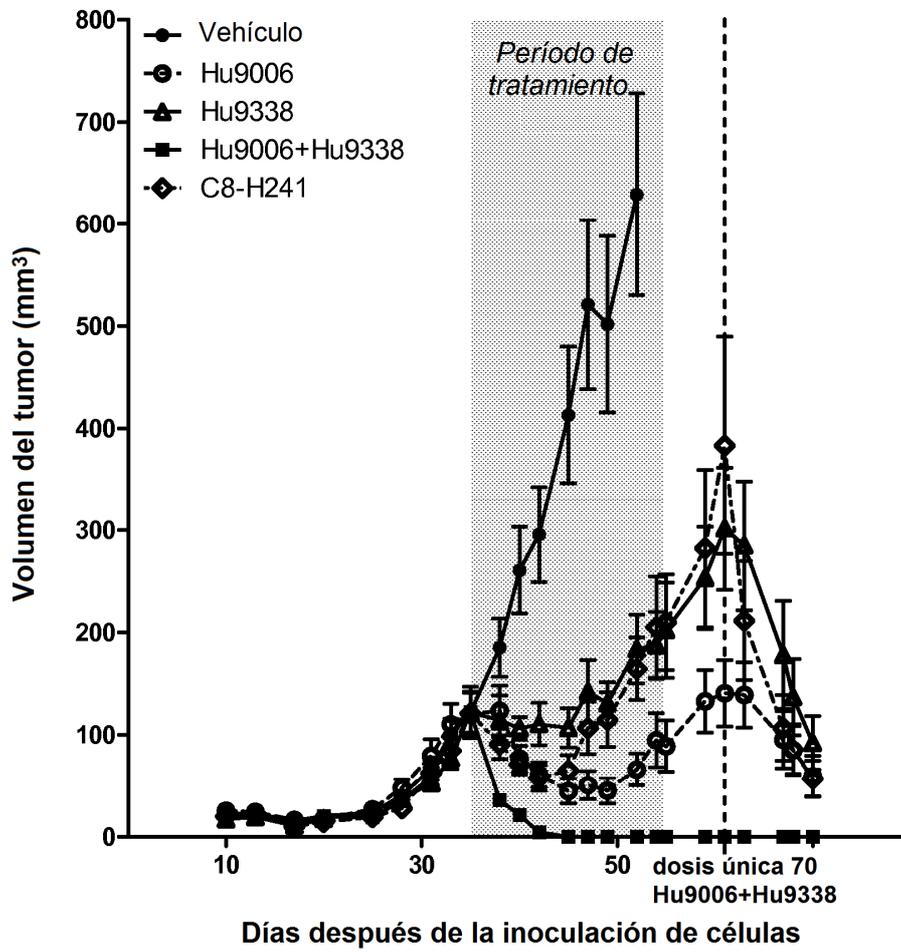


FIGURA 23

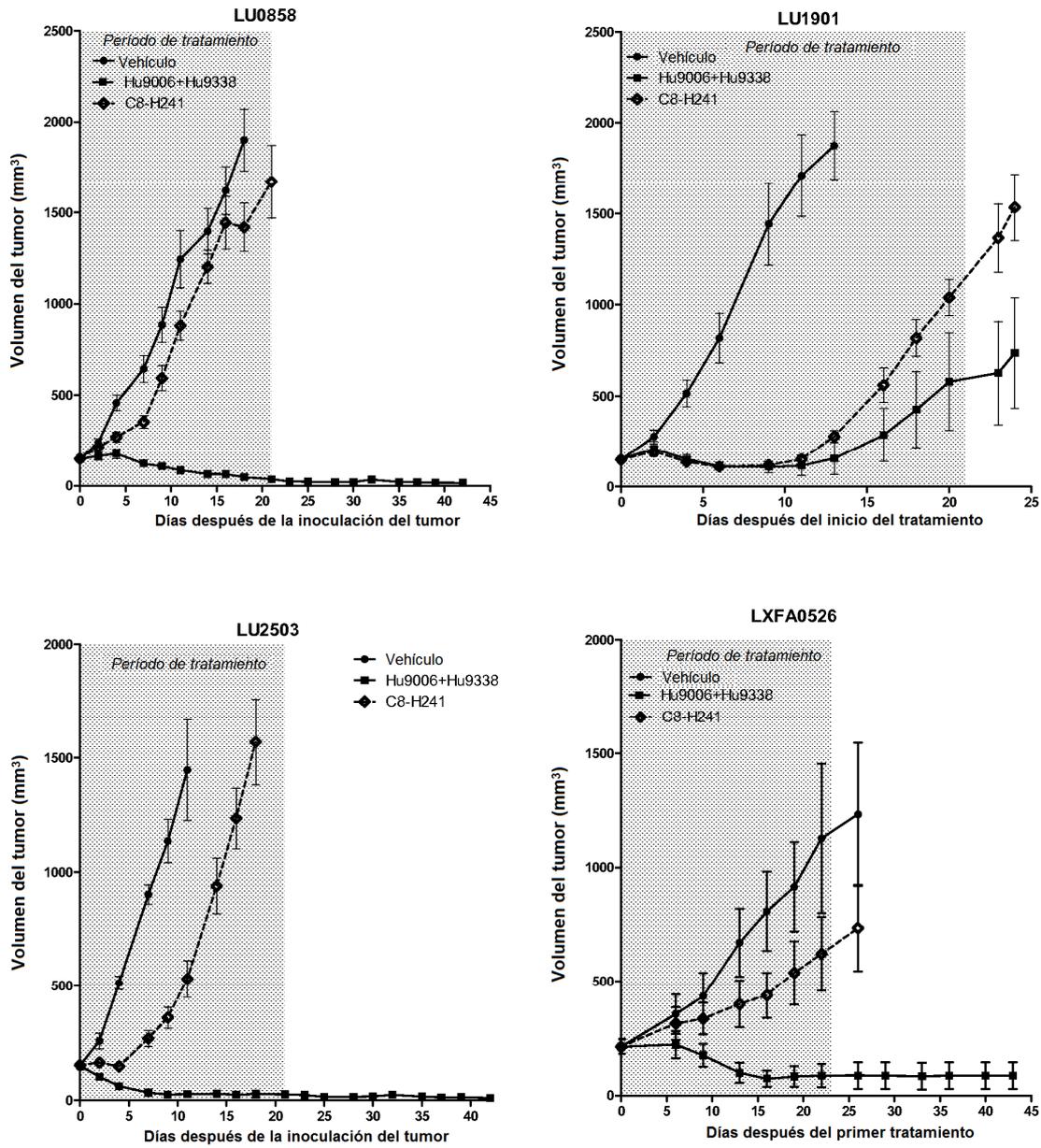


FIGURA 24

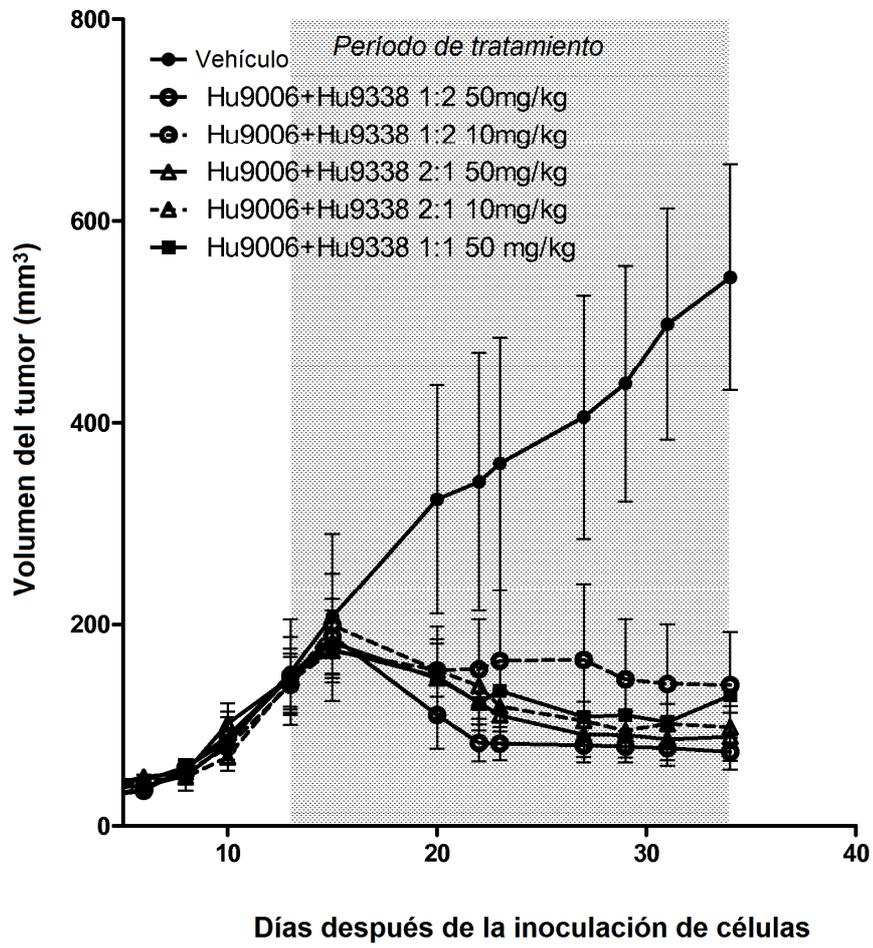


FIGURA 25

VH + VL de 9006 quimérico

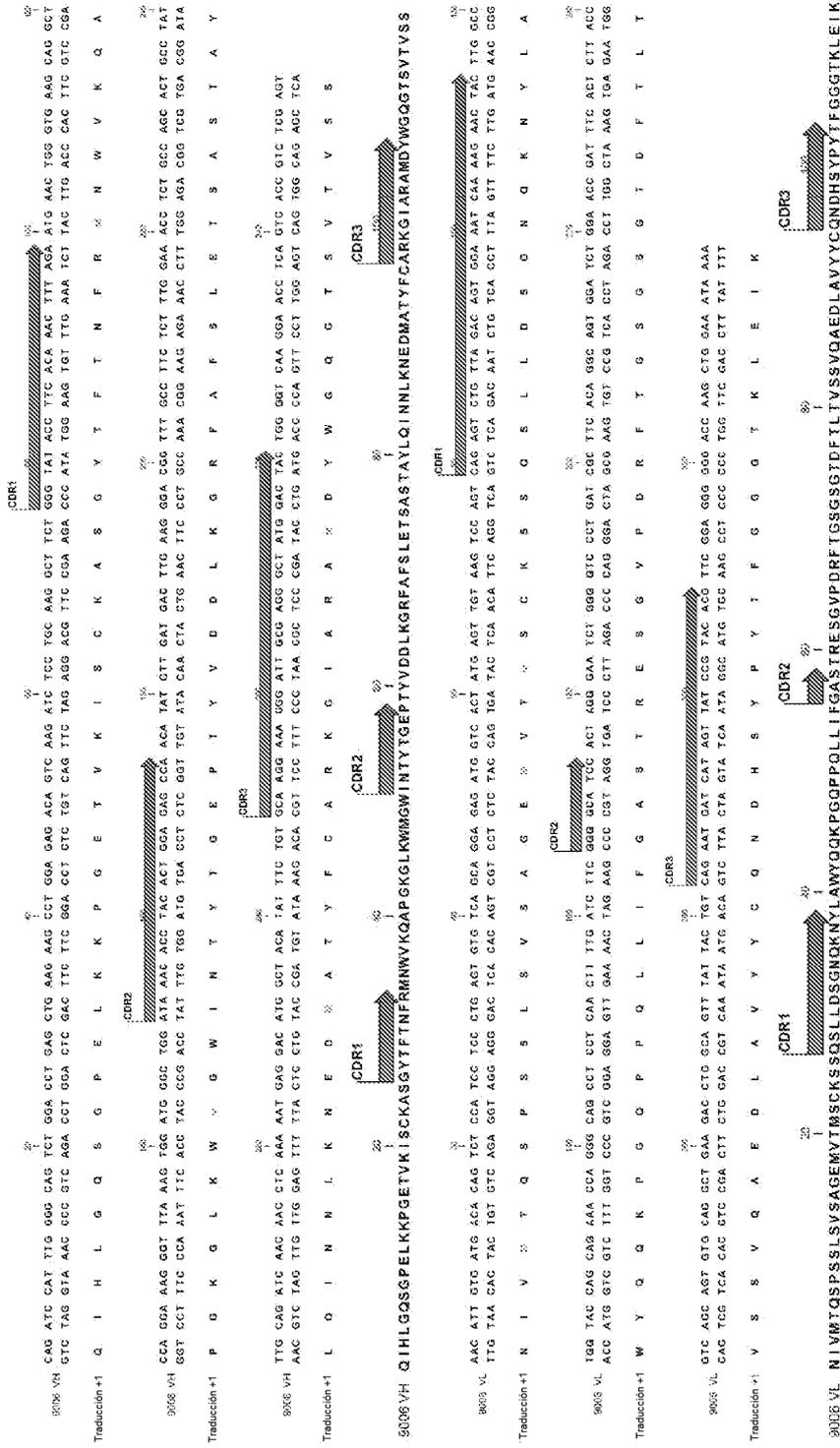


FIGURA 26

VH + VL de 9338 quimérico

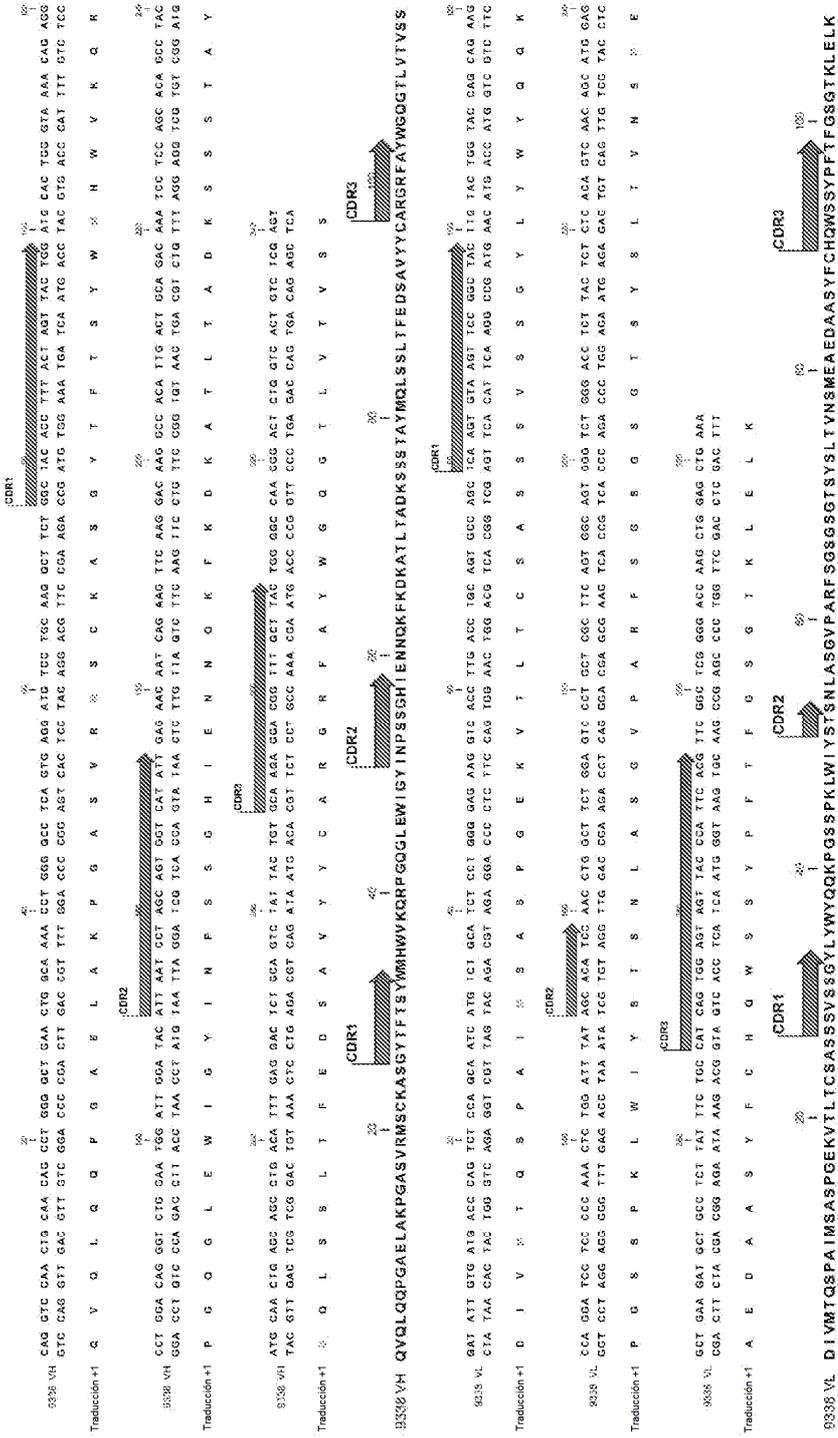


FIGURA 27

VH + VL de 9006 humanizado

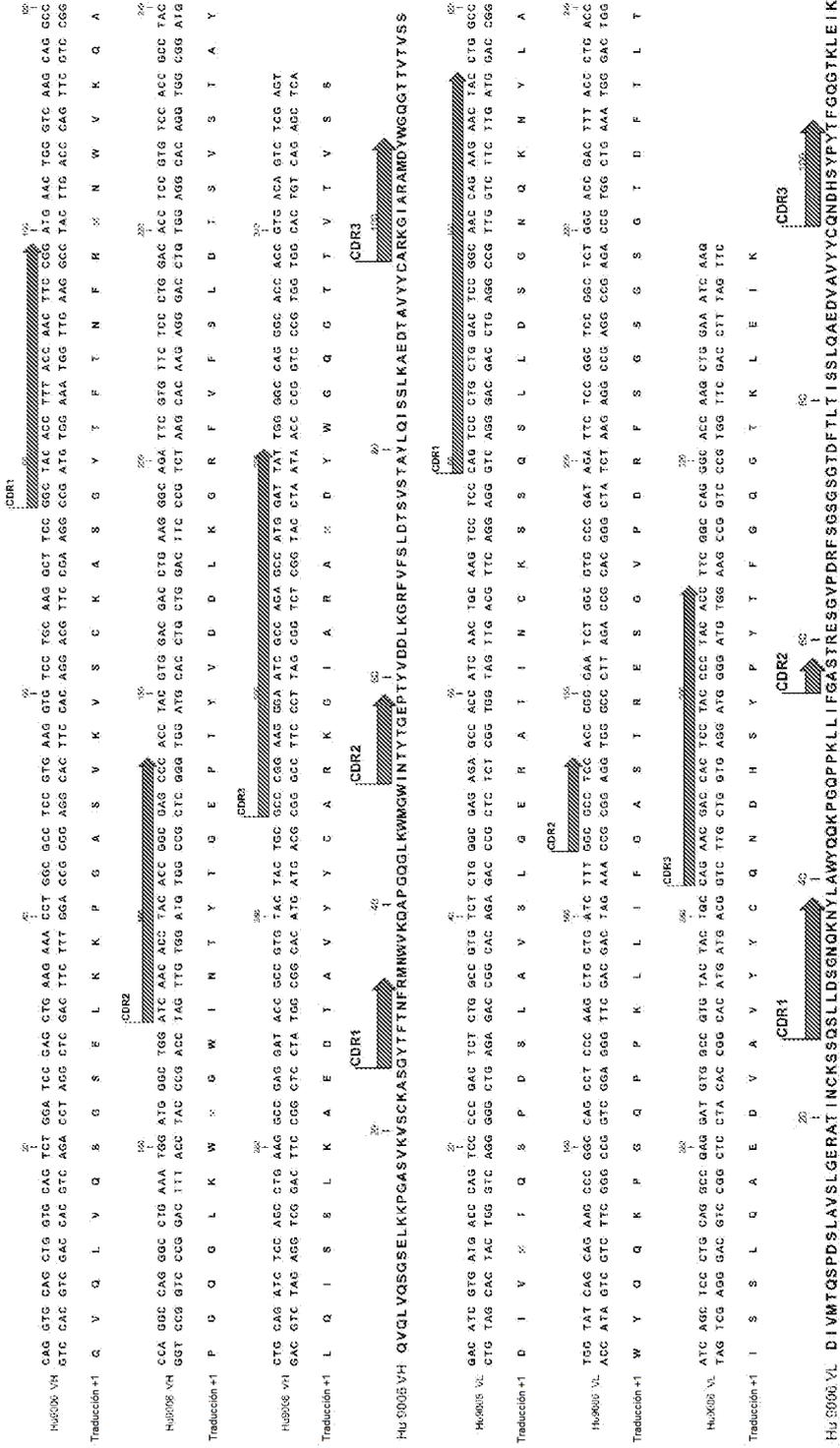
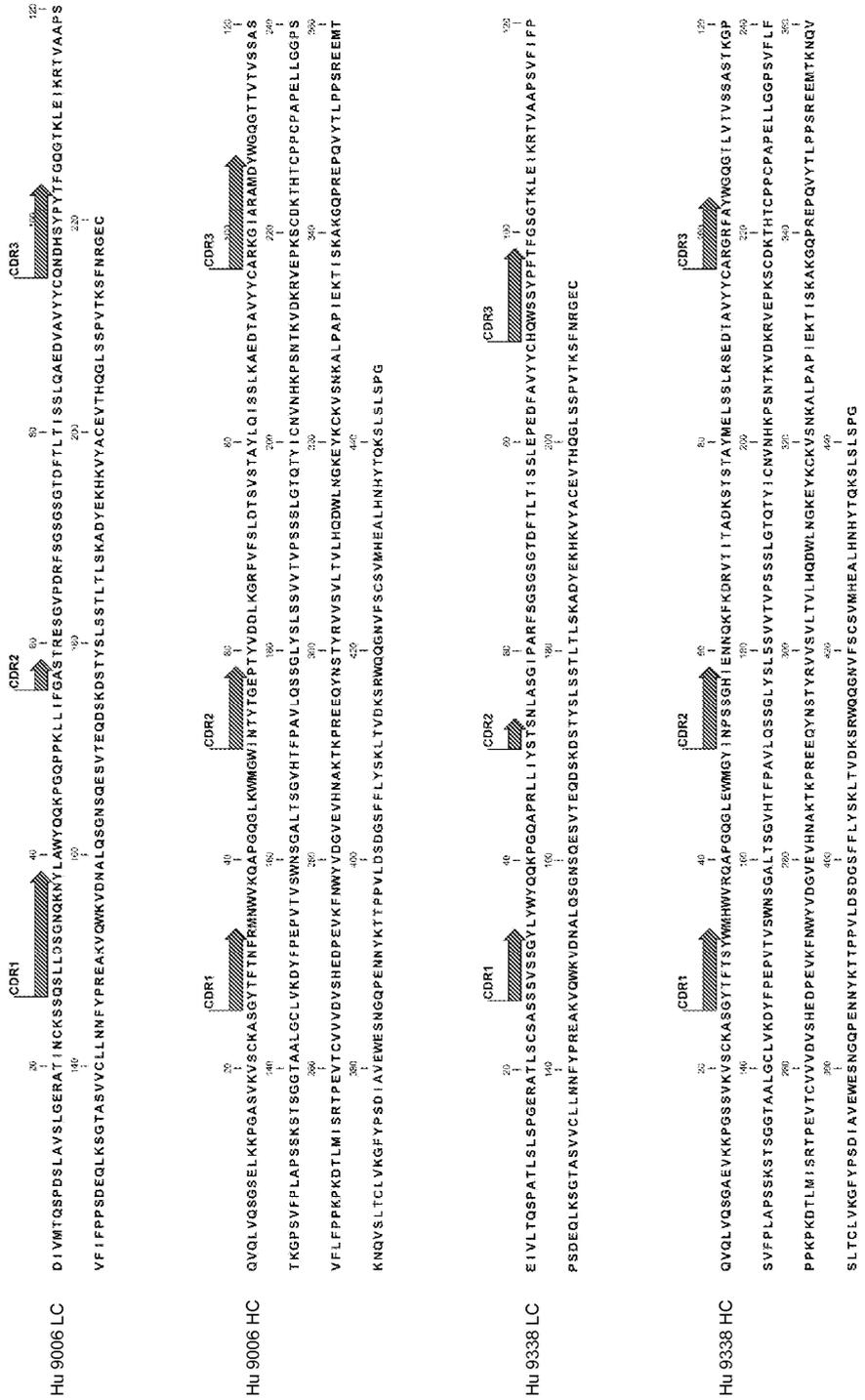


FIGURA 28





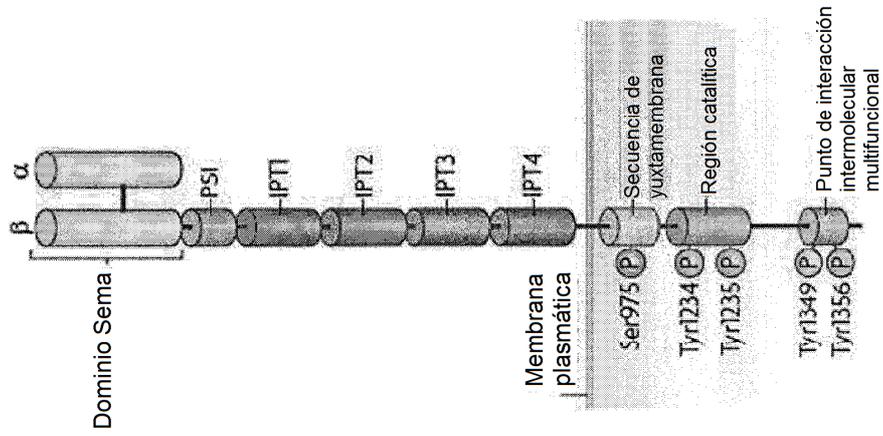


FIGURA 31