



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 323 425**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04754499 .4**

(96) Fecha de presentación : **04.06.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1636593**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **22.03.2006**

(54) Título: **Modulación de la interacción entre la cadena β de HGF y *c-met*.**

(30) Prioridad: **06.06.2003 US 476778 P**
23.12.2003 US 532117 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.07.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.07.2009

(73) Titular/es: **Genentech, Inc.**
1 Dna Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

(72) Inventor/es: **Kirchhofer, Daniel, K.;**
Lazarus, Robert, A. y
Yao, Xiaoyi

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 323 425 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

Modulación de la interacción entre la cadena β de HGF y *c-met*.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere en general a los ámbitos de la biología molecular y la regulación del factor de crecimiento. Más específicamente, la invención se refiere a moduladores de la ruta de señalización de HGF/*c-met* y a usos de dichos moduladores.

10 **Antecedentes**

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), también conocido como factor dispersor (SF), es el ligando para Met (Bottaro *et al.*, 1991), una tirosina quinasa receptora codificada por el protooncogen *c-met* (Cooper *et al.*, 1984a &b). la unión de HGF a Met induce la fosforilación del dominio quinasa intracelular dando como resultado la activación de una compleja serie de rutas intracelulares que conducen al crecimiento, diferenciación y migración celular en diversos tipos celulares; varios estudios publicados recientemente proporcionan una exhaustiva visión global (Birchmeier *et al.*, 2003; Trusolino y Comoglio, 2002; Maulik *et al.*, 2002). Además de su importancia fundamental en el desarrollo embrionario y regeneración tisular, la ruta de señalización de HGF/Met también estaba implicada en el crecimiento tumoral invasivo y metástasis y, como tal, representa una diana terapéutica interesante (Birchmeier *et al.*, 2003; Trusolino y Comoglio, 2002; Danilkovitch-Miagkova y Zbar, 2002; Ma *et al.*, 2003).

HGF pertenece a la familia del factor de crecimiento relacionado con plasminógeno y comprende una cadena α de 69 kDa que contiene el dominio del dedo N-terminal (N) y cuatro dominios de Kringle (K1-K4), y una cadena β de 34 kDa que tiene una gran similitud con dominios de serina proteasas similares a quimotripsina del Clan PA(S)/Familia S1 (Nakamura *et al.*, 1989; Donate *et al.*, 1994; Rawlings *et al.*, 2002). Al igual que el plasminógeno y otros zimógenos de serina proteasa, HGF se secreta en forma precursora de cadena sencilla (scHGF). scHGF se une a proteoglicanos de heparán sulfato, tales como sindecán-1 (Derksen *et al.*, 2002) en superficies celulares o en la matriz extracelular. Los proteoglicanos de heparán sulfato se unen al dominio N (Hartmann *et al.*, 1998), que también contribuyen a la unión de Met de alta afinidad junto con aminoácidos situados en K1 (Lokker *et al.*, 1994). Aunque scHGF es capaz de unirse a Met con alta afinidad, no puede activar al receptor (Lokker *et al.*, 1992; Hartmann *et al.*, 1992). La adquisición de la actividad de señalización de HGF depende de la escisión proteolítica (activación) de scHGF en Arg494-Val495 que da como resultado la formación de HGF maduro, un heterodímero α/β unido mediante puentes disulfuro (Lokker *et al.*, 1992; Hartmann *et al.*, 1992; Naldini *et al.*, 1992).

El documento US-A-5 879 910 describe variantes del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) que comprenden una alteración de aminoácidos en un punto dentro del dominio proteasa de HGF y que conservan sustancialmente afinidad completa de unión al receptor de HGF de tipo salvaje correspondiente.

Lokker *et al.* (1992), al que se hace referencia en otras partes de este documento, describe que algunas mutaciones en el dominio similar a proteasa de HGF (en las posiciones Y673 y V692) dan como resultado variantes que son defectuosas para la actividad mitogénica, aunque muestran afinidades de unión al receptor evidentes, similares al HGF de tipo salvaje.

Matsumoto *et al.* (1991), al que se hace referencia en otras partes de este documento, también describe mutantes de HGF, en los que Q534 y/o Y673 se sustituirían respectivamente por His y Ser.

El dominio similar a proteasa de HGF (cadena- β de HGF) está desprovisto de actividad catalítica puesto que carece de la tríada catalítica requerida Asp [c102]-His [c57]-Ser [c195] (numeración de quimotripsinógeno convencional entre corchetes en todo el documento) descubierta en todas las serina proteasas (Perona y Craik, 1995; Hedstrom, 2002), que tienen un Gln534 [c57] y Tyr673 [c195].

Debido a su importancia en la regulación de la actividad de HGF, este proceso debe estar controlado estrechamente por enzimas convertidoras de HGF y sus inhibidores fisiológicos correspondientes. La activación de scHGF se mide *in vitro* por serina proteasas similares a quimotripsina incluyendo el activador de factor de crecimiento de hepatocitos (HGFA) (Miyazawa *et al.*, 1993), matriptasa/MT-SP1 (Takeuchi *et al.* 1999; Lin *et al.*, 1999), activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (Naldini *et al.*, 1992), factor XIIa (Shimomura *et al.*, 1995), factor XIa (Peek *et al.*, 2002) y kalikreína plasmática (Peek *et al.*, 2002). Similares a scHGF, estas proteasas se producen en forma de precursores inactivos; sus actividades enzimáticas también están fuertemente reguladas por otras proteasas de activación e inhibidores tanto de tipo Kunitz como de tipo serpina.

Las serina proteasas y su proceso de activación se han descrito (Donate *et al.*, 1994). En las serina proteasas, la escisión de activación del zimógeno produce una reordenación conformacional del llamado dominio de activación dando origen a un punto activo formado adecuadamente y la región de interacción sustrato/inhibidor. El dominio de activación constituye tres bucles expuestos en superficie llamados bucles [c140], [c180] y [c220] y la inserción del extremo N recién formado en un bolsillo hidrofóbico (Huber y Bode, 1978). En el par homólogo a ligando/receptor de proteína estimuladora de macrófagos (MSP)/Ron, la cadena β de MSP similar a serina proteasa proporciona la energía principal para la unión al receptor (Wang *et al.*, 1997; Miller y Leonard, 1998). Esto se invierte a partir del sistema

HGF/Met, donde el punto de unión al receptor de alta afinidad para Met está en la cadena α de HGF (Lokker, *et al.*, 1994; Okigaki *et al.*, 1992).

Descripción de la invención

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), un factor de crecimiento relacionado con plasminógeno, se une a su tirosina quinasa receptora Met (también mencionado en este documento como c-Met o c-met), que está implicado en el desarrollo, regeneración tisular y crecimiento tumoral invasivo. La expresión y purificación con éxito de la cadena β similar a proteasa de HGF, que se describe en este documento, permitía una determinación definitiva de la naturaleza de la interacción de HGF, específicamente la cadena β de HGF, con c-Met, que condujo a una mejor comprensión del mecanismo para la activación de c-Met. Se ha demostrado empíricamente en este documento que la propia cadena β de HGF similar a serina proteasa se une a Met. En comparación, la forma similar a zimógeno de HGF β tiene una unión a Met mucho más débil, lo que sugería interacciones óptimas resultantes de cambios conformacionales después del procesamiento. Un panel de mutantes de cadena β ensayados en migración celular, fosforilación de Met, proliferación celular dependiente de HGF y ensayos de unión a Met mostraba que la reducida actividad biológica de mutantes de HGF de longitud completa se debe al menos en parte a la reducida unión de la cadena β de HGF a Met. El punto de unión funcional comprende el "dominio de activación" y la "región del punto activo", similares al punto de procesamiento del sustrato de serina proteasas. Los datos indican que la cadena β activada (pero no la forma similar a zimógeno) puede comprender un interfaz necesario para la interacción óptima con otra molécula tal como otra cadena β de HGF para realizar una máxima/óptima activación de c-met. Los análisis de mutación descritos en este documento proporcionan una base para el diseño de mutantes de HGF capaces de inhibir la interacción de HGF de tipo salvaje/c-met en un espectro de potencias. Los ejemplos de dichos mutantes se describen en este documento. Estos mutantes son capaces de competir con HGF de tipo salvaje por la unión a c-met, aunque muestran una capacidad reducida para realizar las funciones biológicas asociadas a c-met. Esto es particularmente ventajoso cuando la completa o sustancial inhibición del eje HGF/cmet es indeseable; Esto es particularmente importante puesto que HGF y c-met se expresan de forma ubicua en células y tejidos normales. Estos mutantes también pueden usarse como agentes terapéuticos ventajosos para tratar afecciones patológicas en las que la actividad biológica reducida, pero no su completa ausencia, de HGF/c-met es deseable. El método y las composiciones de la invención se basan en general en estos descubrimientos, que se describen con más detalle posteriormente. Se muestra que la cadena β de HGF y su interacción con c-met puede ser una diana única y ventajosa para un mayor ajuste fino en el diseño de enfoques profilácticos y/o terapéuticos contra afecciones patológicas asociadas con la señalización anormal o no deseada de la ruta de HGF/c-met. De este modo, la invención proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación para identificar y usar sustancias que son capaces de modular la ruta de HGF/c-met a través de la modulación de la unión de la cadena β de HGF a c-met, y para la modulación de actividades biológicas/fisiológicas asociadas con la señalización de HGF/c-met.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un método de cribado (o identificación) de una sustancia que se une selectivamente a la cadena β del factor de crecimiento de hepatocitos activada, comprendiendo dicho método: (a) comparar (i) la unión de una sustancia candidata a una cadena β de HGF activada (como se describe con más detalle posteriormente), con (ii) la unión de la sustancia candidata a una cadena β de HGF de referencia, donde dicha cadena β de referencia no es capaz de unirse específica y/o sustancialmente a c-met; con lo que una sustancia candidata que muestra mayor afinidad de unión por la cadena β de HGF activada que por la cadena β de HGF de referencia se selecciona (o identifica) como una sustancia que se une selectivamente a la cadena β de HGF activada, como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, la cadena β de referencia está contenida en polipéptidos de HGF de cadena sencilla. En algunas realizaciones, la cadena β de referencia se fusiona en su extremo N a una parte de la región C-terminal de la cadena α de HGF, donde la posición 494 (correspondiente a HGF humano de tipo salvaje) de la región C-terminal es un aminoácido diferente de arginina (por ejemplo, ácido glutámico). En algunas realizaciones, la parte de la región C-terminal de la cadena α de HGF comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos del resto 479 a 494 de HGF humano.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de cribado de una sustancia que bloquea la activación de c-met, comprendiendo dicho método cribar una sustancia que se une (preferente, pero no necesariamente, específicamente) a c-met y bloquea la unión específica de la cadena β de HGF a c-met. En algunas realizaciones, la sustancia compite con la cadena β de HGF por la unión a c-met. En una realización, la sustancia comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% de similitud o identidad en la secuencia con respecto a la cadena β de HGF de tipo salvaje (por ejemplo, humano), por ejemplo, cadena β humana que comprende los restos de aminoácidos 495(Val) a 728(Ser) (por ejemplo, la cadena β de HGF de tipo salvaje como se describe en este documento). En algunas realizaciones en las que la sustancia comprende, consiste o consiste esencialmente en dicha secuencia de aminoácidos, la posición 604 y/o 561 es un aminoácido diferente de cisteína. En algunas de estas realizaciones, la sustancia no es sustancialmente capaz de formar un enlace (covalente o no covalente) con la cadena α de HGF o una parte de la misma.

En algunas realizaciones de métodos de cribado (identificación) de la invención, los métodos comprenden determinar la afinidad de unión de una sustancia candidata con respecto a un antígeno diana que comprende, consiste o consiste esencialmente en una parte de o toda la cadena β de HGF en una forma de origen natural o forma variante. Dichos antígenos diana pueden incluir cualquier polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de cadena β de HGF que comprende al menos una mutación (en particular donde dicha al menos una mutación provoca un cambio de la capacidad de la cadena β de HGF para unirse a c-Met). En algunas

realizaciones, los polipéptidos comprenden, consisten o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos de cadena β de HGF (de tipo salvaje o que comprende al menos una mutación) fusionada a una secuencia polipeptídica heteróloga (tal como una parte de o toda la cadena α de HGF). Los ejemplos de dichas cadenas β de HGF incluyen los descritos en este documento, por ejemplo, cadenas β de HGF similar a zimógeno (por ejemplo, mutación en la posición 494), cadena β de HGF (Cys⁶⁰⁴Ser), y mutantes de “región del punto activo”. Los mutantes de HGF que tienen una mutación en una o más posiciones en la cadena β (incluyendo mutaciones en la región del punto activo), tales como posiciones 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 y/o 702 se describen en este documento. Otros mutantes que se describen incluyen los que tienen mutaciones en posiciones en HGF que le hacen incapaz de ser activado (por ejemplo, escindido) *in vitro* o *in vivo*; un ejemplo de uno de dichos mutantes comprende una mutación en las posiciones 424 y/o 494.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de cribado de un antagonista del receptor de HGF que bloquea la unión de HGF a su receptor (por ejemplo, la unión de HGF a una primera molécula receptora, y/o la unión de HGF, por ejemplo a través de una o de ambas cadenas α y β , a una segunda molécula receptora para la dimerización del receptor), comprendiendo dicho método seleccionar una sustancia que se une a al menos un, dos, tres, cuatro, o cualquier número hasta todos los restos 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 y/o 702 de la cadena β de HGF. Las combinaciones de dos o más restos pueden incluir cualquiera de los restos 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 y/o 702 de la cadena β de HGF. En una realización, la sustancia se une a al menos uno, o a ambos, de los restos 673 y 695. En otra realización, la sustancia se une a (i) al menos uno, o a ambos, de los restos 673 y 695, y (ii) al resto 692. En otra realización, la sustancia se une a (i) al menos uno, o a ambos, de los restos 673 y 695, y (ii) al resto 692, y a (iii) al menos uno, o a ambos, de los restos 534 y 578. En otra realización, la sustancia se une a (i) al menos uno, o a ambos, de los restos 673 y 695, y (ii) a al menos uno, dos o todos de los restos 534, 578 y 692. En otra realización, la sustancia se une a (i) al menos uno, dos o todos de los restos 673, 695 y 696, y a (ii) al menos uno, dos o cualquier número hasta todos de los restos 534, 578, 692 y 694. En una realización, la sustancia se une a la cadena β de HGF en la que, si hay una mutación en la posición 534, 673 y/o 692, dicha cadena β también comprende una mutación en al menos una, dos o cualquier número hasta todas de las posiciones 578, 694, 695 y 696. En algunas realizaciones de estas moléculas, la cadena β activada tiene una conformación de cadena β obtenida mediante escisión de HGF de cadena sencilla; y en algunas de estas realizaciones, dicha escisión es en o adyacente a los restos 494 y 495 del HGF de cadena sencilla, por ejemplo, dicha escisión puede producirse entre los restos 494 y 495 del HGF de cadena sencilla. En una realización, la sustancia se une a al menos uno de los restos 673, 693, 694, 695 y 696. En una realización, la sustancia se une a al menos uno de los restos 692 y 702. En una realización, la sustancia se une a al menos uno de los restos 534 y 578. En una realización, la sustancia se une a al menos uno de los restos 513, 516, 619 y 699. En una realización, la sustancia se une a dos o más restos seleccionados entre el grupo que consiste en un primer grupo que consiste en los restos 673, 693, 694, 695 y 696, un segundo grupo que consiste en los restos 692 y 702, un tercer grupo que consiste en los restos 534 y 578 y un cuarto grupo que consiste en los restos 513, 516, 619 y 699. Dichos dos o más restos pueden seleccionarse entre el mismo grupo o una combinación de cualquiera de los 4 grupos. En algunas realizaciones, la sustancia se une además al resto 423, 424, 494 y/o 495.

Como sería evidente para un experto en la materia, los ensayos de cribado coherentes con los descritos anteriormente también pueden comprender una primera etapa de cribado basada en una lectura funcional para obtener una primera serie de sustancia moduladora candidata, seguida de una segunda etapa de cribado basada en la capacidad de la primera serie de sustancia moduladora candidata para modular la unión de HGF β a c-met. Una lectura funcional puede ser cualquiera que sería evidente para un experto en la materia, en base a un conocimiento de actividades biológicas asociadas con la ruta de señalización de HGF/c-met. Estas actividades biológicas incluyen aunque sin limitación fosforilación de C-met, fosforilación de moléculas celulares que son sustratos de C-met quinasa, crecimiento celular (proliferación, supervivencia, etc.), angiogénesis, migración celular, morfogénesis celular, etc.

En un aspecto, la invención proporciona antagonistas de HGF/c-met que alteran la ruta de señalización de HGF/c-met. Por ejemplo, la invención proporciona una molécula que se une a la cadena β activada del factor de crecimiento de hepatocitos e inhibe la unión específica de dicha cadena β de HGF activada a c-met como se define en las reivindicaciones. En una realización, la afinidad de unión de la molécula por la forma activada de la cadena β es mayor que la afinidad de unión de la molécula por la cadena β en forma de zimógeno. En algunas realizaciones, la molécula se une al punto/dominio activo de la cadena β . En algunas realizaciones, dicho punto activo comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o todos de los restos 534, 578, 673, 692, 694, 695 y/o 696 de la cadena β . Las combinaciones de dos o más restos pueden incluir cualquiera de los restos 534, 578, 673, 692, 694, 695 y/o 696 de la cadena β de HGF. En algunas realizaciones, la molécula se une a al menos uno, dos, tres, cuatro, o cualquier número hasta todos de los restos 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 y/o 702 de la cadena β de HGF. Las combinaciones de dos o más restos pueden incluir cualquiera de los restos 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 y/o 702 de la cadena β de HGF. En una realización, la sustancia se une a al menos uno, o a ambos, de los restos 673 y 695. En otra realización, la sustancia se une a (i) al menos uno, o a ambos, de los restos 673 y 695, y (ii) al resto 692. En otra realización, la sustancia se une a (i) al menos uno, o a ambos, de los restos 673 y 695, y (ii) al resto 692, y (iii) al menos uno, o a ambos, de los restos 534 y 578. En otra realización, la sustancia se une a (i) al menos uno, o a ambos, de los restos 673 y 695, y (ii) al menos uno, dos o todos de los restos 534, 578 y 692. En otra realización, la sustancia se une a (i) al menos uno, dos o todos de los restos 673, 695 y 696, y (ii) al menos uno, dos o cualquier número hasta todos de los restos 534, 578, 692 y 694. En una realización, la sustancia se une a la cadena β de HGF donde, si hay una mutación en la posición 534, 673 y/o 692, dicha cadena β también comprende una mutación en al menos una, dos o cualquier número hasta todas de las posiciones 578, 694, 695 y 696. En una realización, la sustancia se une a al menos uno de los restos 673, 693, 694, 695 y 696. En una realización, la sustancia se une a al menos uno de los restos 692 y

702. En una realización, la sustancia se une a al menos uno de los restos 534 y 578. En una realización, la sustancia se une a al menos uno de los restos 513, 516, 619 y 699. En una realización, la sustancia se une a dos o más restos seleccionados entre el grupo que consiste en un primer grupo que consiste en los restos 673, 693, 694, 695 y 696, un segundo grupo que consiste en los restos 692 y 702, un tercer grupo que consiste en los restos 534 y 578 y un cuarto grupo que consiste en los restos 513, 516, 619 y 699. Dichos dos o más restos pueden seleccionarse entre el mismo grupo o una combinación de cualquiera de los 4 grupos. En algunas realizaciones, la sustancia se une además al resto 423, 424, 494 y/o 495. En algunas realizaciones de estas moléculas, la cadena β activada tiene una conformación de cadena β obtenida mediante escisión de HGF de cadena sencilla; y en algunas de estas realizaciones, dicha escisión es en o adyacente a los restos 494 y 495 del HGF de cadena sencilla, por ejemplo, dicha escisión puede producirse entre los restos 494 y 495 del HGF de cadena sencilla.

Como se define en las reivindicaciones, la sustancia o molécula es o comprende un péptido, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o una combinación de los mismos.

En este documento también se describe un mutante de HGF que tiene actividad moduladora de HGF/c-met, por ejemplo un antagonista de la actividad HGF/c-met o una variante de HGF que muestra una reducción, pero no una ausencia, de actividad biológica de HGF (por ejemplo, actividad estimuladora del crecimiento celular). En una realización, un antagonista de la invención es capaz de inhibir la actividad biológica de HGF de tipo salvaje (*in vivo*) (dicha actividad biológica incluye, aunque sin limitación, estimulación de la proliferación celular, potenciación de la supervivencia celular, promoción de la angiogénesis, inducción/promoción de la migración celular). Una variante de HGF puede proporcionar actividad promotora del crecimiento celular reducida (incluyendo aunque sin limitación proliferación celular, supervivencia celular, angiogénica, migración celular). El mutante de HGF puede ser una cadena β de HGF similar a zimógeno (por ejemplo, mutación en la posición 494). Por ejemplo, estos mutantes incluyen aquellos que tienen mutaciones en posiciones en HGF que le hacen incapaz de ser activado (por ejemplo, escindido) *in vitro* o *in vivo*; un ejemplo de uno de dichos mutantes comprende una mutación en posiciones 424 y 494. El mutante de HGF puede ser un HGF de cadena sencilla, por ejemplo HGF que comprende una mutación en la posición 424 y/o 494, y/o una posición adyacente al resto 424 y/o 494. Un mutante de HGF puede comprender además una mutación en la posición 604 (por ejemplo cadena β de HGF Cys⁶⁰⁴Ser). Un mutante de HGF puede ser un mutante de la “región del punto activo” como se ha descrito anteriormente. Los mutantes de HGF pueden tener una mutación en una o más posiciones en la cadena β (incluyendo mutaciones en la región del punto activo), tales como posiciones 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 y/o 702.

En algunas realizaciones, la unión de una sustancia o molécula de la invención a la cadena β activada inhibe la activación de c-met por HGF. En algunas realizaciones, la unión de dicha sustancia o moléculas a la cadena β activada inhibe el crecimiento celular (tal como proliferación, supervivencia, angiogénesis, morfogénesis, migración celular) inducido por HGF. En algunas realizaciones, la unión de dicha sustancia o molécula a la cadena β activada inhibe la dimerización del receptor c-met.

En algunas realizaciones, una sustancia o molécula de la invención se obtiene mediante un método de cribado o identificación de la invención como se describe en este documento.

En algunas realizaciones, una sustancia o molécula de la invención comprende un péptido. En algunas realizaciones, dicho péptido comprende la secuencia VDWVCFRDLGCDWEL. En algunas realizaciones, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% de identidad o similitud en la secuencia con la secuencia VDWVCFRDLGCDWEL. Las variantes de esta secuencia pueden obtenerse mediante métodos conocidos en el sector, por ejemplo mediante mutagénesis combinatoria (por ejemplo, mediante presentación en fagos). Los ejemplos específicos de dichas variantes incluyen aunque sin limitación los representados en la Tabla 1 posteriormente. En algunas realizaciones, estos péptidos comprenden modificaciones que potencian su efecto inhibidor y/o terapéutico (incluyendo, por ejemplo, mayor afinidad, propiedades farmacocinéticas mejoradas (tales como semi-vida, estabilidad, tasa de eliminación), reducida toxicidad para el sujeto). Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones que implican glicosilación, pegilación, sustitución con aminoácidos de origen no natural pero funcionalmente equivalentes, grupos enlazantes, etc. Las modificaciones adecuadas se conocen bien en el sector, y además pueden determinarse empíricamente según sea necesario.

ES 2 323 425 T3

TABLA 1

	V D W I C F R D I G C D W V V
5	V D W I C L R D V G C D W V Q
	V D W V C F R D F G C D W V V
	V D W V C F R D F G C D W V L
10	V D W V C F R D F G C D W V H
	V D W V C F R D F G C Y W E Q
	V D W V C F R D F G C W F E S
15	V D W V C F R D H G C E Y V E
	V D W V C F R D I G C D W V L
	V D W V C F R E F G C D W V L
20	V D W V C F R E I G C D W V L
	V D W V C F R G I G C D W V L
	V D W V C L R D I G C D W V P
25	V D W V C F R D L G C D Y E H
	V D W V C F R D L G C D Y V L
	V D W V C F R E L G C D W V V
30	V D W V C F R E L G C D W V F
	V D W V C F R D M G C Y Y E L
	V D W V C F R D M G C D W V L
35	V D W V C F R D S G C Y Y A T
	V D W V C F R D T G C D W V L
	V D W V C F R D V G C D W V Q
40	V D W V C F R D V G C D W V L
	V D W V C F R E V G C D W V L
	V D W V C F R D V G D W V M
45	V D W V C F R D Y G C D M V P
	V D W V C F R D V G C D W V Q
	V D W V C F R D Y G C E W V A
50	V D W V C F R D V G C E W V V
	V N W V C F R D I G C D W V L
	V N W V C F R D L G C D W V A
55	V N W V C F R D L G C D W V L
	V N W V C F R D L G C D W V P
	V N W V C F R D L G C D W V V
60	V N W V C F R D Q G C D W V L
	V N W V C F R D V G C D W V L
	V N W V C F R E L G C D W V L
65	V N W V C L R D V G C D W V L

En este documento se describe un antagonista de HGF/c-met que es una sustancia o molécula que compite con la cadena β del factor de crecimiento de hepatocitos por la unión a c-met, donde dicha molécula puede inhibir la multimerización del receptor c-met (por ejemplo, dimerización). Dicha molécula puede comprender una cadena β variante (mutante) que tiene una capacidad reducida para interactuar (por ejemplo, multimerizar/dimerizar) con otra molécula de cadena β , o puede inhibir la multimerización de la cadena β de HGF (por ejemplo, dimerización). Dicha molécula puede unirse a c-met pero muestra una capacidad reducida para realizar la activación de c-met (por ejemplo, como se indica mediante fosforilación reducida de c-met, fosforilación de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), y/o migración celular, proliferación celular, supervivencia celular, morfogénesis celular dependiente de HGF/c-met reducida, etc.). La molécula puede comprender, consistir o consistir esencialmente en un polipéptido que comprende al menos una parte de una cadena β de HGF, donde dicha cadena β comprende una mutación en una o más de las posiciones 695, 696 y 673, o en una o más de las posiciones 695, 696 y 673, y en una o más de las posiciones 534, 578, 692 y 694. Las combinaciones de dos o más restos pueden incluir cualquiera de los restos 534, 578, 673, 692, 694, 695 y 696 de la cadena β de HGF. La molécula puede comprender, consistir o consistir esencialmente en un polipéptido que comprende al menos una parte de una cadena β de HGF, donde dicha cadena β comprende una mutación en al menos uno, o en ambos, de los restos 673 y 695, o comprende una mutación en al menos uno, o en ambos, de los restos 673 y 695, y (ii) el resto 692, o comprende una mutación en al menos uno, o en ambos, de los restos 673 y 695, y (ii) el resto 692, y (iii) al menos uno, o en ambos, de los restos 534 y 578, o comprende una mutación en al menos uno, o en ambos, de los restos 673 y 695, y (ii) al menos uno, dos o todos de los restos 534, 578 y 692, o comprende una mutación en al menos uno, dos o todos de los restos 673, 695 y 696, y (ii) al menos uno, dos o cualquier número hasta todos de los restos 534, 578, 692 y 694, o comprende una mutación, y donde, si hay una mutación en la posición 534, 673 y/o 692, dicha cadena β también comprende una mutación en al menos una, dos o cualquier número hasta todas de las posiciones 578, 694, 695 y 696, o comprende una mutación en una o más posiciones en la cadena β (incluyendo mutaciones en la región del punto activo), tales como las posiciones 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 y/o 702. La molécula puede comprender, consistir o consistir esencialmente en al menos una parte de HGF, donde dicha parte comprende una mutación en una o más posiciones en HGF que le hace incapaz de ser activado (por ejemplo, escindido) *in vitro* o *in vivo*; un ejemplo de dicho mutante comprende una mutación en las posiciones 424 y/o 494. En algunos casos, la cadena β está unida (por ejemplo, mediante un puente disulfuro) a al menos una parte de la cadena alfa de HGF (o equivalentes funcionales de la misma), o la cadena β está unida (por ejemplo, mediante un puente disulfuro) a sustancialmente toda la cadena alfa de HGF (o equivalentes funcionales de la misma). En algunos casos, la cadena β no está unida a una secuencia de cadena alfa de HGF (o equivalentes funcionales de la misma). Otras sustancias o moléculas pueden obtenerse mediante métodos de cribado o identificación de la invención. En algunos casos, la sustancia o molécula puede ser el producto de iteraciones de modificación de una sustancia o molécula de partida diseñada a partir de la información proporcionada en este documento, por ejemplo, a partir de estructuras de moléculas pequeñas o secuencias peptídicas de las que se predijo que interactuarán con un resto funcionalmente significativo, incluyendo aunque sin limitación restos en el dominio de activación, región activa, y/o restos específicos (tales como uno o más de los restos 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 y/o 702) de la cadena β de HGF (por ejemplo, restos en el dominio similar a proteasa).

En cualquier molécula de la invención donde una o más posiciones están mutadas con respecto a la secuencia equivalente de tipo salvaje, la mutación puede ser de cualquier forma que reduzca o elimine (o en algunos casos aumente) el efecto funcional del resto de tipo salvaje correspondiente. Una mutación puede obtenerse en cualquier forma adecuada conocida en el sector (y/o determinarse empíricamente), por ejemplo mediante sustitución, inserción, adición y/o eliminación. En alguna realización, una mutación comprende una sustitución no conservativa. Las mutaciones adecuadas incluyen aunque sin limitación las descritas en este documento (en particular en los Ejemplos), por ejemplo con aminoácidos tales como alanina y serina.

En un aspecto, una molécula/sustancia (por ejemplo, moduladores de HGF/c-met como se describen en este documento) está unida a una toxina tal como un agente citotóxico. Estas moléculas/sustancias pueden formularse o administrarse en combinación con un aditivo/agente potenciador, tal como un agente de radiación y/o quimioterapéutico.

La invención también proporciona usos y composiciones médicas útiles para modular estados de enfermedad asociados con disregulación del eje de señalización de HGF/c-met. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona usos médicos para modular la activación de c-met en un sujeto, usando una molécula moduladora de HGF/c-met de la invención (por ejemplo, una sustancia que inhibe la unión específica de la cadena β de HGF de tipo salvaje (nativa) a c-met), con lo que la activación de c-met se modula como se define en las reivindicaciones. Dicha molécula es un antagonista de HGF/c-met que inhibe la actividad de HGF/c-met. En una realización, dicho antagonista inhibe la unión específica de HGF β a c-met. En un aspecto, la invención proporciona usos médicos para tratar una afección patológica asociada con la activación de c-met en un sujeto, usando un antagonista de c-met de la invención (por ejemplo, una sustancia que inhibe la unión específica de la cadena β de HGF de tipo salvaje (nativa) a c-met), con lo que la activación de c-met se inhibe como se define en las reivindicaciones.

La ruta de señalización de HGF/c-met está implicada en múltiples funciones biológicas y fisiológicas, incluyendo, por ejemplo, estimulación del crecimiento celular (por ejemplo proliferación celular, supervivencia celular, migración celular, morfogénesis celular) y angiogénesis. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona usos médicos para inhibir el crecimiento celular activado por c-met (por ejemplo, proliferación y/o supervivencia), usando un antagonista de c-met de la invención (por ejemplo, una sustancia que inhibe la unión específica de la cadena β de HGF de tipo salvaje (nativa) a c-met), con lo que la proliferación celular asociada con la activación de c-met se inhibe como se define en las reivindicaciones. En otro aspecto más, la invención proporciona métodos médicos para modular la

angiogénesis, en un sujeto con una afección asociada con la angiogénesis anormal usando un antagonista de c-met de la invención (por ejemplo, una sustancia que inhibe la unión específica de la cadena β de HGF de tipo salvaje (nativa) a c-met), con lo que se modula la angiogénesis.

5 En un aspecto, la invención proporciona el uso de un antagonista de c-met de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno de proliferación celular, un trastorno inmune (tal como autoinmune) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis. El antagonista de c-met puede ser de cualquier forma descrita en este documento, incluyendo anticuerpo, fragmento de anticuerpo, polipéptido (por ejemplo, un oligopéptido), ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido, tal como un oligonucleótido antisentido), o una combinación de los mismos.

10 En un aspecto, la invención proporciona el uso de un ácido nucleico de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno de proliferación celular, un trastorno inmune (tal como autoinmune) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis.

15 En un aspecto, la invención proporciona el uso de un vector de expresión de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno de proliferación celular, un trastorno inmune (tal como autoinmune) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis.

20 En un aspecto, la invención proporciona el uso de una célula huésped de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno de proliferación celular, un trastorno inmune (tal como autoinmune) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis.

25 En un aspecto, la invención proporciona el uso de un artículo de fabricación de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno de proliferación celular, un trastorno inmune (tal como autoinmune) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis.

30 En un aspecto, la invención proporciona el uso de un kit de la invención en la preparación un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno de proliferación celular, un trastorno inmune (tal como autoinmune) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis.

35 En un aspecto, la invención se refiere a usos médicos para inhibir la proliferación celular activada por c-met, usando una cantidad eficaz de un antagonista de c-met de la invención, con lo que se inhibe la proliferación celular asociada con la activación de c-met.

40 En un aspecto, la invención se refiere a usos médicos para tratar una afección patológica asociada con la disregulación de la activación de c-met en un sujeto, usando una cantidad eficaz de un antagonista de c-met de la invención, con lo que se trata dicha afección.

45 En un aspecto, la invención se refiere a usos médicos para inhibir el crecimiento de una célula que expresa c-met o el factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, usando un antagonista de c-met de la invención, causando de este modo una inhibición del crecimiento de dicha célula.

50 En un aspecto, la invención proporciona usos médicos para tratar terapéuticamente a un mamífero que tiene un tumor canceroso que comprende una célula que expresa c-met o el factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, usando una cantidad eficaz de un antagonista de c-met de la invención, tratando de este modo eficazmente a dicho mamífero.

55 En un aspecto, la invención proporciona usos médicos para tratar o prevenir un trastorno de proliferación celular asociado con una mayor expresión o actividad de c-met o del factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, usando una cantidad eficaz de un antagonista de c-met de la invención, tratando o previniendo de este modo eficazmente dicho trastorno de proliferación celular. En una realización, dicho trastorno de proliferación es cáncer.

60 En un aspecto, la invención se refiere a usos médicos para inhibir el crecimiento de una célula, donde el crecimiento de dicha célula depende al menos en parte de un efecto potenciador del crecimiento de c-met o del factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, usando una cantidad eficaz de un antagonista de c-met de la invención, inhibiendo de este modo el crecimiento de dicha célula. En una realización, la célula entra en contacto con HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, a través de un efecto paracrino).

65 En un aspecto, la invención proporciona usos médicos para tratar terapéuticamente un tumor en un mamífero, donde el crecimiento de dicho tumor depende al menos en parte de un efecto potenciador del crecimiento de c-met o del factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, usando una cantidad eficaz de un antagonista de c-met de la invención, tratando de este modo eficazmente dicho tumor. En una realización, la célula entra en contacto con HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, a través de un efecto paracrino).

Los medicamentos de la invención pueden usarse en métodos para afectar a cualquier estado patológico adecuado, por ejemplo, células y/o tejidos asociados con la disregulación de la ruta de señalización de HGF/c-met. En una realización; una célula que se fijó como objetivo en un método de la invención es una célula cancerosa. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser una seleccionada entre el grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer colorrectal, una célula de cáncer de pulmón, una célula de carcinoma papilar (por ejemplo, de la glándula tiroides), una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer de cuello del útero, una célula de cáncer del sistema nervioso central, una célula de sarcoma osteogénico, una célula de carcinoma hepatocelular, una célula de cáncer de vejiga, una célula de carcinoma gástrico, una célula de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, una célula de melanoma y una célula de leucemia. En una realización, una célula que se fijó como objetivo en un método de la invención es una célula hiperproliferativa y/o hiperplásica. En una realización, una célula que se fijó como objetivo en un método de la invención es una célula displásica. En otra realización más, una célula que se fijó como objetivo en un método de la invención es una célula metastásica.

Los métodos indicados en los usos médicos de la invención pueden comprender además etapas de tratamiento adicionales. Por ejemplo, en una realización, un método comprende además una etapa en la que una célula y/o tejido fijado como objetivo (por ejemplo, una célula cancerosa) se expone a tratamiento por radiación o a un agente quimioterapéutico.

Como se describe en este documento, la activación de c-met es un importante proceso biológico cuya disregulación conduce a numerosas afecciones patológicas. Por consiguiente, en una realización de la invención, una célula que se fijó como objetivo (por ejemplo, una célula cancerosa) es una en la que la activación de c-met se potencia en comparación con una célula normal del mismo origen tisular. En una realización, un método indicado en los usos médicos de la invención provoca la muerte de una célula fijada como objetivo. Por ejemplo, el contacto con un antagonista de la invención puede provocar la incapacidad de una célula para señalar a través de la ruta de c-met, lo que da como resultado la muerte celular.

La disregulación de la activación de c-met (y por lo tanto de la señalización) puede ser el resultado de varios cambios celulares, incluyendo, por ejemplo, sobreexpresión de HGF (ligando afín de c-met) y/o del propio c-met. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un método indicado en los usos médicos de la invención comprende fijar como objetivo una célula en la que c-met o el factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, es expresado de forma más abundante por dicha célula (por ejemplo, una célula cancerosa) en comparación con una célula normal del mismo origen tisular. Una célula que expresa c-met puede regularse mediante HGF de diversas fuentes, es decir de manera autocrina o paracrina. Por ejemplo, en una realización de métodos indicados en los usos médicos de la invención, una célula fijada como objetivo se pone en contacto con/se une al factor de crecimiento de hepatocitos expresado en una célula diferente (por ejemplo, mediante un efecto paracrino). Dicha célula diferente puede ser del mismo o de un origen tisular diferente. En una realización, una célula fijada como objetivo se pone en contacto con/se une a HGF expresado por la propia célula fijada como objetivo (por ejemplo, mediante un efecto autocrino/de bucle).

En este documento se describe un método que comprende administrar a un sujeto una variante de HGF capaz de realizar actividad biológica de HGF a un nivel supra-normal (por ejemplo, menor que el nivel de actividad obtenido con una cantidad similar de HGF de tipo salvaje en condiciones terapéuticas similares), donde la actividad de HGF se desea a un nivel sub-óptimo (es decir, menor que el tipo salvaje), con lo que se alcanza la cantidad deseada de actividad biológica de HGF. Dicha variante de HGF puede comprender una mutación en una o más de las posiciones 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 y/o 702, o comprender una mutación en HGF que le hace incapaz de ser activado (por ejemplo, escindido) *in vitro* o *in vivo*; un ejemplo de dicho mutante comprende una mutación en las posiciones 424 y/o 494. Las afecciones adecuadas para ser tratadas mediante este método incluyen afecciones patológicas cualesquiera que están asociadas con un nivel fisiológico anormal/indeseablemente bajo de actividad de HGF/c-met en un sujeto, y donde existe una necesidad de regular fuertemente la cantidad de actividad de HGF/c-met inducida por un agente terapéutico. Los ejemplos de dichas afecciones incluyen aunque sin limitación cicatrización de heridas, hipertrofia cardíaca, infarto de miocardio, isquemia de los miembros, enfermedad arterial periférica, etc.

Cualquiera de los antagonistas de c-met de la invención puede usarse en usos médicos de la invención.

En algunas realizaciones de usos médicos de la invención, la sustancia o molécula es o comprende un péptido, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones de usos médicos de la invención, un antagonista de c-met es una sustancia o molécula que comprende, consiste o consiste esencialmente en un péptido, que en algunas realizaciones comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia VDWVCFRDLGCDWEL. En algunas realizaciones, el péptido comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% de identidad o similitud en la secuencia con la secuencia VDWVCFRDLGCDWEL. En una realización, una variante de esta secuencia es cualquiera de las representadas en la Tabla 1 anteriormente. En algunas realizaciones, estos péptidos comprenden modificaciones que potencian su efecto inhibidor y/o terapéutico (incluyendo, por ejemplo, mayor afinidad, propiedades farmacocinéticas mejoradas (tales como semi-vida, estabilidad, tasa de eliminación), toxicidad reducida para el sujeto). Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones que implican glicosilación, pegilación, sustitución con aminoácidos de origen no natural pero funcionalmente equivalentes, grupos enlazantes, etc. Las modificaciones adecuadas se conocen bien en el sector, y además pueden determinarse empíricamente según sea necesario.

En algunas realizaciones, los usos médicos de la invención utilizan una sustancia o molécula obtenida mediante cualquiera de los métodos de cribado y/o identificación de la invención.

En algunas realizaciones de usos y composiciones médicas de la invención, una sustancia/molécula que inhibe la señalización de HGF/c-met no interfiere sustancialmente en la interacción de unión entre componentes celulares diferentes de una cadena β de HGF activada y c-met. Por ejemplo, en una realización, la sustancia/molécula no interfiere sustancialmente en la unión de la cadena α de HGF a c-met.

En un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden una o más sustancias/moléculas (por ejemplo, antagonistas de HGF/c-met) de la invención y un portador. En una realización, el portador es farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican una sustancia/molécula (por ejemplo, un antagonista de HGF/c-met) de la invención. En una realización, un ácido nucleico de la invención codifica una sustancia/molécula (por ejemplo, un antagonista de HGF/c-met) que es o comprende un polipéptido (por ejemplo, un oligopéptido). En una realización, un ácido nucleico de la invención codifica una sustancia/molécula (por ejemplo, un antagonista de HGF/c-met) que es o comprende un anticuerpo o fragmento del mismo.

En un aspecto, la invención proporciona vectores que comprenden un ácido nucleico de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona células huésped que comprenden un ácido nucleico o un vector de la invención. Un vector puede ser de cualquier tipo, por ejemplo un vector recombinante tal como un vector de expresión. Cualquiera de diversas células huésped puede usarse. En una realización, una célula huésped es una célula procariota, por ejemplo, *E. coli*. En una realización, una célula huésped es una célula eucariota, por ejemplo una célula de mamífero tal como una célula de Ovario de Hámster Chino (CHO).

En un aspecto, la invención proporciona métodos para preparar una sustancia/molécula (por ejemplo, un antagonista de HGF/c-met) de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona un método de preparación de un antagonista de c-met que es o comprende un anticuerpo (o fragmento del mismo), comprendiendo dicho método expresar en una célula huésped adecuada un vector recombinante de la invención que codifica dicho anticuerpo (o fragmento del mismo), y recuperar dicho anticuerpo. En otro ejemplo, la invención proporciona un método de preparación de una sustancia/molécula (por ejemplo, un antagonista de HGF/c-met) que es o comprende un polipéptido (tal como un oligopéptido), comprendiendo dicho método expresar en una célula huésped adecuada un vector recombinante de la invención que codifica dicho polipéptido (tal como un oligopéptido), y recuperar dicho polipéptido (tal como un oligopéptido).

En un aspecto, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente; y una composición contenida dentro del recipiente, donde la composición comprende una o más sustancias/moléculas (por ejemplo, antagonistas de HGF/c-met) de la invención. En una realización, la composición comprende un ácido nucleico de la invención. En una realización, una composición que comprende una sustancia/molécula (por ejemplo, un antagonista de HGF/c-met) comprende además un portador, que, en algunas realizaciones, es farmacéuticamente aceptable. En una realización, un artículo de fabricación de la invención comprende además instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el antagonista) a un sujeto.

En un aspecto, la invención proporciona un kit que comprende un primer recipiente que comprende una composición que comprende una o más sustancias/moléculas (por ejemplo, antagonistas de HGF/c-met) de la invención; y un segundo recipiente que comprende un tampón. En una realización, el tampón es farmacéuticamente aceptable. En una realización, una composición que comprende una sustancia/molécula (por ejemplo, un antagonista de HGF/c-met) comprende además un portador que, en algunas realizaciones, es farmacéuticamente aceptable. En una realización, un kit comprende además instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el antagonista) a un sujeto.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 Unión Directa y Competitiva y Actividad de HGF β en Ensayos de Fosforilación de Met.

(A) Unión de HGF β al dominio extracelular de Met (Met ECD) mediante resonancia del plasmón superficial. El Met ECD se capturó sobre un chip CM5 a ~2000 unidades de resonancia. HGF β se inyectó en una serie de concentraciones de 12,5 nM a 100 nM. Las flechas indican el inicio de las fases de asociación y disociación. Los datos se analizaron mediante Global Fit usando un modelo de unión 1:1 a partir del cual se determinaron valores de k_{on} , k_{off} y K_d .

(B) ELISA competitivo de HGF β /Met-IgG. Se capturó Met-IgG sobre una placa recubierta con IgG Fc de conejo anti-humana y se incubó con una mezcla que contenía HGF β de tipo salvaje biotinilado acoplado con maleimida 250 nM y una serie de concentraciones de HGF β no marcado (●) y proHGF β (■). La cantidad de HGF β de tipo salvaje biotinilado unido a la placa se detectó mediante neutravidina-HRP. Los datos de al menos 3 determinaciones independientes cada una, se normalizaron, promediaron y ajustaron mediante un ajuste de cuatro parámetros usando Kaleidagraph a partir del cual se determinaron valores de CI_{50} ; las barras de error representan desviaciones típicas.

(C) la fosforilación de Met dependiente de HGF en células A549 se realizó como se describe en los Ejemplos usando HGF (▲) y HGF β (●).

(D) la inhibición de la fosforilación de Met dependiente de HGF se realizó por duplicado como se describe en los Ejemplos usando HGF a 0,5 nM (◆), 0,25 nM (▲) y 0,125 nM (■) para estimular a las células A549 en presencia de concentraciones en aumento de HGF β .

(E) ELISA competitivo de HGF de longitud completa/Met-IgG. Esto se realizó de forma similar a (A) usando HGF biotinilado acoplado a NHS 1 nM y una serie de concentraciones de HGF no marcado (O), y HGF- (●). Los datos de 3 determinaciones independientes cada una, se normalizaron, promediaron y ajustaron como anteriormente.

Fig. 2 migración celular dependiente de HGF mediante mutantes de HGF. (A) Pureza representativa de mutantes de HGF. La pureza de todos los mutantes de HGF analizados mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras se ilustra para HGF I623A purificado mediante intercambio catiónico. La conversión incompleta de la forma secretada de cadena sencilla mediante expresión de CHO en FBS al 1% (v/v) se muestra en la banda 1. La exposición adicional a FBS al 5% completaba el proceso de activación que producía HGF I623A puro de doble cadena (banda 2). Los marcadores de peso molecular se muestran como Mr $\times 10^3$. B) Migración de células MDA-MB435 en un ensayo transversal en presencia de mutantes de HGF 1 nM. Las actividades se expresan como el porcentaje de migración de células de control expuestas a HGF de tipo salvaje 1 nM; se muestra la numeración de la secuencia de HGF de longitud completa [numeración de quimotripsinógeno]. Los valores representan las medias de 4-8 experimentos independientes $\pm$ SD. (C) Fotografías de migración celular de MDA-MB435 en ausencia de HGF de tipo salvaje (a), con HGF de tipo salvaje 1 nM (b), HGF R695A 1 nM (c) y HGF G696A 1 nM (d).

Fig. 3 fosforilación de Met dependiente de HGF mediante mutantes de HGF. La fosforilación de Met de células A549 se realizó como se describe en los Ejemplos usando diversas concentraciones de HGF (●), proHGF (◆), HGF Q534A (O), HGF D578A (▲), HGF Y673A (Δ), HGF V692A (◇), HGF R695A (□) y HGF G696A (▼).

Fig. 4 Unión competitiva a Met de mutantes de HGF β . Se uso ELISA competitivo de HGF β /Met-IgG para evaluar la unión a Met de HGF β de tipo salvaje (Δ), HGF β (●) y mutantes de HGF β Q534A [c57] (○), D578A [c102] (▲), Y619A [c143] (◇), R695A [c217] (□), G696A [c219] (▼) y I699A [c221a] (◆). Los datos se ajustaron mediante un ajuste de cuatro parámetros usando Kaleidagraph; se muestran los ensayos competitivos individuales representativos para múltiples determinaciones independientes donde $n \geq 3$.

Fig. 5 Efectos de mutaciones de la cadena β en HGF β y HGF de dos cadenas. Se muestran los datos de unión competitiva a Met de mutantes de HGF β en el ELISA de unión competitiva de HGF β /Met y actividad de migración celular de mutantes de HGF de dos cadenas en el ensayo de migración celular de MDA-MB-435. Los mutantes de cadena β de HGF se prepararon en un fondo de C604S a menos que se indique otra cosa.

Fig. 6 Efecto de mutaciones de HGF sobre la estimulación e inhibición de la proliferación celular. (A) proliferación celular dependiente de HGF mediante HGF de 2 cadenas y mutantes de HGF de 2 cadenas (que tienen las mutaciones indicadas) en células BxPC3. (B) Inhibición de la proliferación celular dependiente de HGF mediante mutante de HGF de 2 cadenas en cadena β de HGF (que tiene las mutaciones indicadas) y mediante HGF de 1 cadena en células BxPC3.

Fig. 7 Afinidades de unión relativas de mutantes de HGF a Met determinadas mediante el ELISA de unión competitiva de HGF/Met.

Fig. 8 Actividades pro-migratorias de mutantes de HGF a diferentes concentraciones.

Fig. 9 Análisis de la unión de pro-HGF de cadena sencilla y HGF de dos cadenas a c-Met-IgG determinada mediante ELISA competitivo de cadena β de HGF. Los datos se ajustaron mediante un ajuste de cuatro parámetros usando Kaleidagraph y se determinó la CI_{50} para HGF de dos cadenas. El pro-HGF de cadena sencilla a concentraciones de hasta 100 nM no competía con la cadena β de HGF por la unión a c-Met-IgG.

Modos para realizar la invención

La invención proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación para identificar inhibidores de la ruta de señalización de HGF/c-met (en particular, inhibidores de la unión de la cadena β de HGF a c-met), y métodos de uso de dichos inhibidores.

Detalles de estos métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación se proporcionan en este documento.

Técnicas Generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, e inmunología, que están dentro del alcance de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tales como, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989); “Oligonucleotide Synthesis” (M. J. Gait, ed., 1984); “Animal Cell Culture” (R. I. Freshney, ed., 1987); “Methods in Enzymology” (Academic Press, Inc.); “Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987, y actualizaciones periódicas); “PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis *et al.*, ed., 1994); “A Practical Guide to Molecular Cloning” (Perbal Bernard V., 1988).

Definiciones

“Porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos” con respecto a un péptido (por ejemplo, VDWVC-FRDLGCDWEL) o secuencia polipeptídica se define como el porcentaje de los restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en el péptido o secuencia polipeptídica específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar cualesquiera sustituciones conservativas como parte de la identidad en la secuencia. El alineamiento para fines de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas maneras que están dentro del alcance de la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo mediante algoritmos necesarios para alcanzar el máximo alineamiento en la longitud completa de las secuencias comparadas. Para los fines de esta invención, sin embargo, los valores de % de identidad en la secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, donde el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla A posteriormente. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era propiedad de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla A posteriormente se presentó con la documentación para el usuario en la “U.S. Copyright Office”, Washington D.C., 20559, donde está registrada con el N° de Registro de Derechos de Autor de EEUU (*U.S. Copyright Registration N°*) TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede compilarse a partir del código fuente proporcionado en la Figura 8 posteriormente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A respecto a, con, o contra una secuencia de aminoácidos dada B (que como alternativa puede expresarse como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de aminoácidos respecto a, con, o contra una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula de la siguiente manera:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de los restos de aminoácidos valorados como emparejamiento idénticos por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de ese programa de A y B, y donde Y es el número total de los restos de aminoácidos en B. Se entenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A respecto a B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B respecto a A.

A menos que se indique específicamente otra cosa, todos los valores de % de identidad en la secuencia de aminoácidos usados en este documento se obtienen como se ha descrito en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2.

ES 2 323 425 T3

TABLA A

```

5      /*
      *
10     * C-C increased from 12 to 15
      * Z is average of EQ
      * B is average of ND
15     * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
      */
20     #define _M      -8      /* value of a match with a stop */

      int      _day[26][26] = {
25     /*      A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
      /* A */   { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
      /* B */   { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
30     /* C */   {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
      /* D */   { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
      /* E */   { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
35     /* F */   {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
      /* G */   { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
40     /* H */   {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
      /* I */   {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
45     /* J */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
      /* K */   {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
50     /* L */   {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},

```

ES 2 323 425 T3

```

/* M */ {-1,-2,-5,-3,-2,0,-3,-2,2,0,0,4,6,-2,_M,-2,-1,0,-2,-1,0,2,-4,0,-2,-1},
/* N */ {0,2,-4,2,1,-4,0,2,-2,0,1,-3,-2,2,_M,-1,1,0,1,0,0,-2,-4,0,-2,1},
/* O */ {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,
0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */ {1,-1,-3,-1,-1,-5,-1,0,-2,0,-1,-3,-2,-1,_M,6,0,0,1,0,0,-1,-6,0,-5,0},
/* Q */ {0,1,-5,2,2,-5,-1,3,-2,0,1,-2,-1,1,_M,0,4,1,-1,-1,0,-2,-5,0,-4,3},
/* R */ {-2,0,-4,-1,-1,-4,-3,2,-2,0,3,-3,0,0,_M,0,1,6,0,-1,0,-2,2,0,-4,0},
/* S */ {1,0,0,0,0,-3,1,-1,-1,0,0,-3,-2,1,_M,1,-1,0,2,1,0,-1,-2,0,-3,0},
/* T */ {1,0,-2,0,0,-3,0,-1,0,0,0,-1,-1,0,_M,0,-1,-1,1,3,0,0,-5,0,-3,0},
/* U */ {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0},
/* V */ {0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2,4,0,-2,2,2,-2,_M,-1,-2,-2,-1,0,0,4,-6,0,-2,-2},
/* W */ {-6,-5,-8,-7,-7,0,-7,-3,-5,0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5,2,-2,-5,0,-6,17,0,0,-6},
/* X */ {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0},
/* Y */ {-3,-3,0,-4,-4,7,-5,0,-1,0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3,0,-2,0,0,10,-4},
/* Z */ {0,1,-5,2,3,-5,0,2,-2,0,0,-2,-1,1,_M,0,3,0,0,0,0,-2,-6,0,-4,4}
};

/*
*/

#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP      16    /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP     24    /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS       1024  /* max jmps in an path */
#define MX         4     /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT        3    /* value of matching bases */
#define DMIS        0    /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0       8    /* penalty for a gap */
#define DINS1       1    /* penalty per base */
#define PINS0       8    /* penalty for a gap */
#define PINS1       4    /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for delay) */

```

ES 2 323 425 T3

```

    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
};                               /* limits seq to 2^16 -1 */

5
struct diag {
    int      score;          /* score at last jmp */
10    long     offset;        /* offset of prev block */
    short    ijmp;          /* current jmp index */
    struct jmp jp;          /* list of jmps */
15
};

struct path {
20    int      spc;           /* number of leading spaces */
    short    n[JMPs];       /* size of jmp (gap) */
    int      x[JMPs];       /* loc of jmp (last elem before gap) */
25
};

char      *ofile;           /* output file name */
30 char      *namex[2];      /* seq names: getseqs() */
char      *prog;            /* prog name for err msgs */
char      *seqx[2];         /* seqs: getseqs() */
35 int      dmax;            /* best diag: nw() */
int      dmax0;            /* final diag */
int      dna;              /* set if dna: main() */
40 int      endgaps;         /* set if penalizing end gaps */
int      gapx, gapy;        /* total gaps in seqs */
int      len0, len1;        /* seq lens */
45 int      ngapx, ngapy;    /* total size of gaps */
int      smax;             /* max score: nw() */
int      *xbm;             /* bitmap for matching */
50 long     offset;          /* current offset in jmp file */
struct diag *dx;            /* holds diagonals */
55 struct path pp[2];        /* holds path for seqs */

char      *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
60 char      *getseq(), *g_calloc();

```

65

ES 2 323 425 T3

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
5  * usage: progs file1 file2
*   where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
*   The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
10 * Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
*   Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
*   A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
15 *   Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
20 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/

#include "nw.h"
25 #include "day.h"

static _dbval[26] = {
30     1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

35 static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
40    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
45 };

main(ac, av)                                main
{
    int    ac;
50    char   *av[];

    prog = av[0];
55    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
60
65

```

ES 2 323 425 T3

```

    fprintf(stderr,"where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
    fprintf(stderr,"The sequences can be in upper- or lower-case\n");
5    fprintf(stderr,"Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
    fprintf(stderr,"Output is in the file \"align.out\"\n");
    exit(1);
10    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
15    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0;                /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";        /* output file */
25

    nw();                      /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps();                /* get the actual jmps */
30    print();                  /* print stats, alignment */

    cleanup(0);                /* unlink any tmp files */
35    }

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
45 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
50 * to a gap in seq y.
 */

55    nw()                      nw
{
    char        *px, *py;      /* seqs and ptrs */
    int         *ndely, *dely; /* keep track of dely */
60    int         ndelx, delx;   /* keep track of delx */

65

```

ES 2 323 425 T3

```

int      *tmp;          /* for swapping row0, row1 */
int      mis;           /* score for each type */
5  int      ins0, ins1;   /* insertion penalties */
register  id;            /* diagonal index */
register  ij;            /* jmp index */
10 register  *col0, *col1; /* score for curr, last row */
register  xx, yy;        /* index into seqs */

15
dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
20 dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
25 ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

30
smax = -10000;
if (endgaps) {
    for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
35         col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
        ndely[yy] = yy;
    }
    col0[0] = 0;    /* Waterman Bull Math Biol 84 */
}
else
45     for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
        dely[yy] = -ins0;

50
/* fill in match matrix
*/
55 for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
    /* initialize first entry in col
    */
    if (endgaps) {
60         if (xx == 1)

```

ES 2 323 425 T3

```

col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
else
5   col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
   ndelx = xx;
}
10 else {
   col1[0] = 0;
   delx = -ins0;
15   ndelx = 0;
}

20
...nw
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
25   mis = col0[yy-1];
   if (dna)
       mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
30   else
       mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

35   /* update penalty for del in x seq;
   * favor new del over ongoing del
   * ignore MAXGAP if weighting endgaps
40   */
   if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
       if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
45           dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
           ndely[yy] = 1;
       } else {
50           dely[yy] -= ins1;
           ndely[yy]++;
       }
55   } else {
       if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
           dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
60           ndely[yy] = 1;

```

65

ES 2 323 425 T3

```

    } else
        ndely[yy]++;
5      }

    /* update penalty for del in y seq;
10     * favor new del over ongong del
    */
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
15        if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
20        } else {
            delx -= ins1;
            ndelx++;
25        }
    } else {
        if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
30            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
35            ndelx++;
    }

40    /* pick the maximum score; we're favoring
    * mis over any del and delx over dely
    */
45

50

55

        ...nw

60    id = xx - yy + len1 - 1;
    if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
65

```

ES 2 323 425 T3

```

col1[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
5   col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
10   && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
15   writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
20   offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
30 }
else {
    col1[yy] = dely[yy];
35   ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
40   && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
45   writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
50   offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
55   dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely[yy];
60 }
if (xx == len0 && yy < len1) {
65

```

ES 2 323 425 T3

```

/* last col
*/
5      if (endgaps)
        col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
        if (col1[yy] > smax) {
10          smax = col1[yy];
          dmax = id;
        }
15    }
    }
    if (endgaps && xx < len0)
20      col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
      if (col1[yy-1] > smax) {
        smax = col1[yy-1];
25      dmax = id;
      }
      tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
30  }
  (void) free((char *)ndely);
  (void) free((char *)dely);
35  (void) free((char *)col0);
  (void) free((char *)col1);
}

40 /*
  *
  * print() -- only routine visible outside this module
  *
45  * static:
  * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
  * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
50  * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
  * nums() -- put out a number line: dumpblock()
  * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
55  * stars() - -put a line of stars: dumpblock()
  * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
60  */

```

65

ES 2 323 425 T3

```

#include "nw.h"

5      #define SPC    3
      #define P_LINE    256    /* maximum output line */
      #define P_SPC 3    /* space between name or num and seq */

10
      extern _day[26][26];
      int    olen;          /* set output line length */
15      FILE  *fx;          /* output file */

      print()                                print
20      {
          int    lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

25          if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
              fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
              cleanup(1);
30          }
          fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
          fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
35          olen = 60;
          lx = len0;
          ly = len1;
40          firstgap = lastgap = 0;
          if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
              pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
45              ly -= pp[0].spc;
          }
          else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
50              pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
              lx -= pp[1].spc;
          }
55          if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
              lastgap = len0 - dmax0 - 1;
              lx -= lastgap;
60
65

```

ES 2 323 425 T3

```

    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) {      /* trailing gap in y */
5         lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
10    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

15

20

/*
 * trace back the best path, count matches
25 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
30     int    lx, ly;                      /* "core" (minus endgaps) */
     int    firstgap, lastgap;            /* leading trailing overlap */
{
35     int          nm, i0, i1, siz0, siz1;
     char          outx[32];
     double        pct;
40     register      n0, n1;
     register char  *p0, *p1;

45     /* get total matches, score
        */
     i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
50     p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
     p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
     n0 = pp[1].spc + 1;
55     n1 = pp[0].spc + 1;

     nm = 0;
60     while ( *p0 && *p1 ) {
65

```

```

    if (siz0) {
        p1++;
        n1++;
        siz0--;
    }
    else if (siz1) {
        p0++;
        n0++;
        siz1--;
    }
    else {
        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
            nm++;
        if (n0++ == pp[0].x[i0])
            siz0 = pp[0].n[i0++];
        if (n1++ == pp[1].x[i1])
            siz1 = pp[1].n[i1++];
        p0++;
        p1++;
    }
}

/* pct homology:
 * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
 * else, knock off overhangs and take shorter core
 */
if (endgaps)
    lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
else
    lx = (lx < ly)? lx : ly;
pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
fprintf(fx, "\n");
fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

ES 2 323 425 T3

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
...getmat
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per
base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per
residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];       /* jmp index for a path */

```

ES 2 323 425 T3

```

static      nc[2];          /* number at start of current line */
static      ni[2];          /* current elem number -- for gapping */
5  static      siz[2];
static char  *ps[2];         /* ptr to current element */
static char  *po[2];         /* ptr to next output char slot */
10 static char  out[2][P_LINE]; /* output line */
static char  star[P_LINE]; /* set by stars() */

15 /*
   * print alignment of described in struct path pp[]
   */
20 static
pr_align()                                pr_align
{
25     int      nn;          /* char count */
     int      more;
     register  i;

30     for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
         nn = stripname(name[x[i]]);
35         if (nn > lmax)
             lmax = nn;

40         nc[i] = 1;
         ni[i] = 1;
         siz[i] = ij[i] = 0;
45         ps[i] = seqx[i];
         po[i] = out[i];      }

50     for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {                                ...pr_align
         for (i = more = 0; i < 2; i++) {
55             /*
                 * do we have more of this sequence?
                 */
60             if (!*ps[i])

```

65

ES 2 323 425 T3

```

5      more++;

      if (pp[i].spc) { /* leading space */
10         *po[i]++ = ' ';
         pp[i].spc--;
      }
15      else if (siz[i]) { /* in a gap */
         *po[i]++ = '-';
         siz[i]--;
20      }
      else { /* we're putting a seq element
              */
25         *po[i] = *ps[i];
         if (islower(*ps[i]))
             *ps[i] = toupper(*ps[i]);
30         po[i]++;
         ps[i]++;

35         /*
          * are we at next gap for this seq?
          */
40         if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
             /*
              * we need to merge all gaps
              * at this location
              */
45             siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
             while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
50                 siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
             }
55         ni[i]++;
      }
  }

60  if (++nn == olen || !more && nn) {

```

65

ES 2 323 425 T3

```

        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()                                dumpblock
{
    register      i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';

    (void) putc('\n', fx);
    for (i = 0; i < 2; i++) {
        if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
            if (i == 0)
                nums(i);
            if (i == 0 && *out[1])
                stars();
            putline(i);
            if (i == 0 && *out[1])
                fprintf(fx, star);
            if (i == 1)
                nums(i);
        }
    }
}

```

...dumpblock

```

5  /*
   * put out a number line: dumpblock()
   */
static
nums(ix)                                nums
10      int    ix;    /* index in out[] holding seq line */
   {
       char    nline[P_LINE];
15      register    i, j;
       register char    *pn, *px, *py;

20      for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
          *pn = ' ';
       for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
25           if (*py == ' ' || *py == '-')
               *pn = ' ';
           else {
30               if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                   j = (i < 0)? -i : i;
                   for (px = pn; j; j /= 10, px--)
35                       *px = j%10 + '0';
                   if (i < 0)
                       *px = '-';
40               }
               else
                   *pn = ' ';
45               i++;
           }
       }
50      *pn = '\0';
       nc[ix] = i;
       for (pn = nline; *pn; pn++)
55           (void) putc(*pn, fx);
       (void) putc('\n', fx);
60   }
65

```

ES 2 323 425 T3

```

5  /*
   * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
   */
static
putline(ix)                                putline
10      int      ix;                        {

15                                          ...putline

      int      i;
      register char  *px;

20      for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
          (void) putc(*px, fx);
25      for (; i < lmax+P_SPC; i++)
          (void) putc(' ', fx);

30      /* these count from 1:
       * ni[] is current element (from 1)
       * nc[] is number at start of current line
35      */
      for (px = out[ix]; *px; px++)
          (void) putc(*px&0x7F, fx);
40      (void) putc('\n', fx);
      }

45

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
50  */
static
stars()                                    stars
55  {

      int      i;
      register char  *p0, *p1, cx, *px;
60

65

```

ES 2 323 425 T3

```

5      if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
            return;
        px = star;
        for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
10            *px++ = ' ';

        for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
15            if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

                if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
20                    cx = '*';
                    nm++;
                }
                else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
25                    cx = '.';
                else
30                    cx = ' ';

            }
            else
35                cx = ' ';

            *px++ = cx;
        }
40    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
45    }

50

55    /*
    * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
60    */

65

```

ES 2 323 425 T3

static

stripname(pn)

stripname

```

5      char    *pn;    /* file name (may be path) */
    {
        register char    *px, *py;

10
        py = 0;
        for (px = pn; *px; px++)
15            if (*px == '/')
                py = px + 1;

        if (py)
20            (void) strcpy(pn, py);
        return(strlen(pn));

25    }

30    /*
        * cleanup() -- cleanup any tmp file
        * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
35        * g_calloc() -- calloc() with error checkin
        * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
        * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
40        */
        #include "nw.h"
        #include <sys/file.h>

45
        char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";    /* tmp file for jumps */
        FILE    *fj;

50

        int    cleanup();    /* cleanup tmp file */
        long    lseek();

55

        /*
        * remove any tmp file if we blow
60        */

```

65

ES 2 323 425 T3

```

cleanup(i)                                cleanup
    int    i;

5      {
        if (fj)
            (void) unlink(jname);
10      exit(i);
    }

15      /*
        * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
        * skip lines starting with ';', '<', or '>'
        * seq in upper or lower case
        */
20      char    *
getseq(file, len)                            getseq
    char    *file; /* file name */
    int     *len; /* seq len */

30      {
        char        line[1024], *pseq;
        register char    *px, *py;
35        int        natgc, tlen;
        FILE        *fp;

40        if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
            exit(1);
45        }
        tlen = natgc = 0;
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
50            if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                continue;
            for (px = line; *px != '\n'; px++)
55                if (isupper(*px) || islower(*px))
                    tlen++;
        }
60        if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
65

```

ES 2 323 425 T3

```

        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
5      }
      pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

10

...getseq

15      py = pseq + 4;
      *len = tlen;
      rewind(fp);

20

      while (fgets(line, 1024, fp)) {
          if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
25              continue;
          for (px = line; *px != '\n'; px++) {
              if (isupper(*px))
30                  *py++ = *px;
              else if (islower(*px))
                  *py++ = toupper(*px);
35              if (index("ATGCU", *(py-1)))
                  natgc++;
          }
40      }
      *py++ = '\0';
      *py = '\0';
45      (void) fclose(fp);
      dna = natgc > (tlen/3);
      return(pseq+4);
50  }

char *
55  g_calloc(msg, nx, sz)                                g_calloc
        char *msg;          /* program, calling routine */
        int nx, sz;         /* number and size of elements */
60  {

65

```

ES 2 323 425 T3

```

char          *px, *calloc();

5      if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
            if (*msg) {
                    fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg,
10      nx, sz);
                    exit(1);
            }
15      }
      return(px);
}

20
/*
* get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
25 */
readjmps()
{
30      int          fd = -1;
      int          siz, i0, i1;
      register      i, j, xx;

35
      if (fj) {
              (void) fclose(fj);
40      if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
              fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
              cleanup(1);
45      }
      }
      for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
50      while (1) {
              for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                      ;

55
                      ...readjmps

              if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
40      (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
65

```

ES 2 323 425 T3

```

5      (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
      (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset,
      sizeof(dx[dmax].offset));

      dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
10    else
        break;
    }
15    if (i >= JMPS) {
        fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
        cleanup(1);
    }
    if (j >= 0) {
25        siz = dx[dmax].jp.n[j];
        xx = dx[dmax].jp.x[j];
        dmax += siz;
        if (siz < 0) {          /* gap in second seq */
30            pp[1].n[i1] = -siz;
            xx += siz;
            /* id = xx - yy + len1 - 1
            */
            pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
            gapy++;
            ngapy -= siz;
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
45        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) {        /* gap in first seq */
50        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
60        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;

```

65

```

        }
    }
    else
        break;
}

/* reverse the order of jmps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejumps(ix)                                writejumps
{
    char    *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);

```

```

        cleanup(1);
    }
5    if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
        exit(1);
10   }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
15   (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);

```

El término “vector”, como se usa en este documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN de doble cadena circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector en fago. Otro tipo de vector es un vector viral, donde segmentos adicionales de ADN pueden ligarse en el genoma viral. Algunos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped después de la introducción en la célula huésped, y de este modo se replican junto con el genoma del huésped. Además, algunos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos de forma operativa. Dichos vectores se denominan en este documento como “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores recombinantes”). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinantes a menudo están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden usarse de forma intercambiable puesto que el plásmido es la forma más habitualmente usada de vector.

“Polinucleótido”, o “ácido nucleico”, como se usan de forma intercambiable en este documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificadas, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que puede incorporarse en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa, o mediante una reacción de síntesis. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si estuviera presente, la modificación de la estructura nucleotídica puede impartirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la síntesis, tal como mediante conjugación con una marca. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, caperuzas (“caps”), sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fósforo- tioatos, fósforoditioatos, etc.), los que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), los que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), los que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido (o de los polinucleótidos). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los azúcares puede sustituirse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos mediante grupos protectores convencionales, o activados para preparar enlaces adicionales con nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse a soportes sólidos o semi-sólidos. El OH 5' y 3' terminal puede fosforilarse o sustituirse por aminas o restos orgánicos de grupos formadores de caperuzas de desde 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que se conocen generalmente en el sector, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosa o lixosa, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, psedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósido abásicos tales como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden sustituirse mediante grupos enlazantes alternativos. Estos grupos enlazantes alternativos incluyen, aunque sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se sustituye por P(O)S (“tioato”), P(S)S (“ditioato”), (O) NR.sub.2 (“amidato”), P(O)R, P(O)OR', CO o CH.sub.2 (“formacetal”), donde cada uno de R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C.) que opcionalmente contiene un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La anterior descripción se aplica a todos los polinucleótidos mencionados en este documento, incluyendo ARN y ADN.

“Oligonucleótido”, como se usa en este documento, se refiere en general a polinucleótidos cortos generalmente de cadena sencilla, generalmente sintéticos que general, pero no necesariamente, tienen menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos “oligonucleótido” y “polinucleótido” no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para polinucleótidos es igual y completamente aplicable a oligonucleótidos.

La expresión “factor de crecimiento de hepatocitos” o “HGF”, como se usa en este documento, se refiere, a menos que se indique específica o contextualmente otra cosa, a cualquier polipéptido de HGF nativo o variante (ya sea nativa o sintética) que es capaz de activar la ruta de señalización de HGF/cmet en condiciones que permiten que ocurra dicho proceso. La expresión “HGF de tipo salvaje” se refiere en general a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína de HGF de origen natural. La expresión “secuencia de HGF de tipo salvaje” se refiere en general a una secuencia de aminoácidos que se encuentra en un HGF de origen natural.

“Cadena β de HGF activada”, o variantes de la misma, se refiere a cualquier cadena β de HGF que tiene la conformación que es adoptada por la cadena β de HGF de tipo salvaje después de la conversión de proteína de HGF de tipo salvaje de una forma de cadena sencilla a una forma de 2 cadenas (es decir, cadenas α y β), resultando dicha conversión al menos en parte de la escisión entre el resto 494 y el resto 495 de la proteína de HGF de tipo salvaje. En algunas realizaciones, dicha conformación se refiere específicamente a la conformación del dominio de activación del dominio similar a proteasa en la cadena β . En algunas realizaciones, dicha conformación se refiere aún más específicamente a la conformación de la región del punto activo del dominio similar a proteasa en la cadena β . Generalmente, la adopción de dicha conformación revela un punto de unión a c-met, como se describe en este documento.

Los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” se usan de forma intercambiable en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que muestren la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpo (como se describe con más detalle en este documento). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o de afinidad madurada.

“Fragmentos de anticuerpo” comprenden solamente una parte de un anticuerpo intacto, donde la parte preferentemente conserva al menos una, preferentemente la mayoría o todas, de las funciones normalmente asociadas con esa parte cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un punto de unión al antígeno del anticuerpo intacto y por lo tanto conserva la capacidad de unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como unión a FcRn, modulación de la semi-vida del anticuerpo, función ADCC y unión al complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semi-vida *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión al antígeno unido a una secuencia Fc capaz de otorgar estabilidad *in vivo* al fragmento.

La expresión “anticuerpo monoclonal” como se usa en este documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, al estar dirigidos contra un único antígeno. Además, al contrario que las preparaciones de anticuerpo policlonal que habitualmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno.

Los anticuerpos monoclonales en este documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la cadena (o cadenas) es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)).

Las formas “Humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima obtenida de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, restos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas de las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de estudio y referencias citadas en esos documentos: Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1.038 (1995); Hurler y Gross, Curr. Opin. Biotech. 5: 428-433 (1994).

Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se ha descrito en este documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión al antígeno no humanos.

Un anticuerpo “de afinidad madurada” es uno con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esta alteración (o alteraciones). Los anticuerpos de afinidad madurada preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen mediante procedimientos conocidos en el sector. Marks *et al.* Bio/technology 10: 779-783 (1992) describe maduración de afinidad mediante cambios de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de restos de CDR y/o marco se describe por: Barbas *et al.* Proc Nat. Acad. Sci, USA 91: 3809-3813 (1994); Schier *et al.* Gene 169: 147-155 (1995); Yelton *et al.* J. Immunol. 155: 1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, J. Immunol. 154(7): 3310-9 (1995); y Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226: 889-896 (1992).

Un anticuerpo “de bloqueo” o un anticuerpo “antagonista” es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une (por ejemplo, cadena β de HGF activada o punto/epítipo en c-met al que se une HGF β activado). Los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

Un “anticuerpo agonista”, como se usa en este documento, es un anticuerpo que mimetiza al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo podría proporcionar al menos una de las funciones activadoras de c-met de la cadena β de HGF activada).

Un “trastorno” es cualquier afección que podría beneficiarse del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero para el trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en este documento incluyen tumores malignos y benignos; tumores no de leucemia y linfoides; trastornos neuronal, glial, astrocítico, hipotalámico y otros glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromáticos y blastocélulas; y trastornos inflamatorios, inmunológicos y otros relacionados con la angiogénesis.

Las expresiones “trastorno de proliferación celular” y “trastorno de proliferación” se refieren a trastornos que están asociados con cierto grado de proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno de proliferación celular es cáncer.

“Tumor”, como se usa en este documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásico, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos. Las expresiones “cáncer”, “canceroso”, “trastorno de proliferación celular”, “trastorno de proliferación” y “tumor” no son mutuamente excluyentes como se mencionan en este documento.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por crecimiento/proliferación celular no regulada. Los ejemplos de cáncer incluyen aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón macrocítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello del útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio o carcinoma uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Como se usa en este documento, “tratamiento” se refiere a intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o célula que se está tratando, y puede realizarse por profilaxis o durante el curso de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen prevenir la aparición o recurrencia de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualesquiera consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, prevenir la metástasis, reducir la velocidad de avance de la enfermedad, mejoría o alivio del estado de enfermedad, y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, se usan anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno.

Una “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de una sustancia/molécula de la invención, agonista o antagonista puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula, agonista o antagonista para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales de la sustancia/molécula, agonista o antagonista son mucho menores que los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Habitual pero no necesariamente, puesto que se usa una dosis profiláctica en sujetos

antes de o en una fase temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

La expresión “agente citotóxico” como se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de células y/o causa la destrucción de células. La expresión pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos por ejemplo metotrexato, adriamicina, alcaloides de vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, y los diversos agentes antitumorales o anticáncer que se describen posteriormente. Otros agentes citotóxicos se describen posteriormente. Un agente tumoricida causa la destrucción de las células tumorales.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN® ciclosfosfamida; alquil sulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos de adozolesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina I y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM 1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma II y caliqueamicina omega II (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemina, incluyendo dinemina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; una neocarzinostatina cromóforo y cromóforos de antibiótico de la cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; rellenos de ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamina glicósido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amasacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofílico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2''-triclortrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazona; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido (“Ara-C”); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ sin Cremofor, formulación de nanopartículas de paclitaxel con inserción de albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE®; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en la definición de “agente quimioterapéutico” anterior agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores tales como anti-estrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno FARESTON; inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, y anastrozol ARIMIDEX®; y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Ralf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®,

vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se usa en este documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula cuyo crecimiento depende de la activación de HGF/c-met *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células dependientes de HGF/c-met en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el avance del ciclo celular (en un punto diferente de la fase S), tales como agentes que inducen parada en G1 y parada en la fase M. Los bloqueantes de fase M convencionales incluyen los inhibidores de la vinca (vincristina y vinblastina), taxanos, y topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también se extienden su acción a la parada de fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse más información en “The Molecular Basis of Cancer”, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” de Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticáncer que se obtiene ambos del árbol del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), obtenido del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos impidiendo la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en las células.

“Doxorrubicina” es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de la doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxi-a-L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenediona.

Construcción de Vectores

Las secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos descritos en este documento pueden obtenerse usando técnicas recombinantes convencionales. Las secuencias de polinucleótidos deseadas pueden aislarse y secuenciarse a partir de células fuente apropiadas. Las células fuente para anticuerpos incluirían células productoras de anticuerpos tales como células de hibridoma. Como alternativa, pueden sintetizarse polinucleótidos usando sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican las inmunoglobulinas se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en una célula huésped. Muchos vectores que están disponibles y se conocen en el sector pueden usarse para los fines de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos a insertar en el vector y la célula huésped particular a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambos) y su compatibilidad con la célula huésped particular en la que reside. Los componentes del vector generalmente incluyen, aunque sin limitación: un origen de replicación (en particular cuando el vector se inserta en una célula procariota), un gen marcador de selección, un promotor, un punto de unión al ribosoma (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, los vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y de control que se obtienen de una especie compatible con la célula huésped se usan junto con estos huéspedes. El vector habitualmente tiene un punto de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma habitualmente usando pBR322, un plásmido obtenido de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y por lo tanto proporciona medios sencillos para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o bacteriófago también pueden contener, o modificarse para contener, promotores que pueden ser usados por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas.

Además, vectores de fagos que contienen secuencias de replicón y de control que son compatibles con el microorganismo huésped pueden usarse como vectores transformantes junto con estos huéspedes. Por ejemplo, bacteriófagos tales como λGEM.TM.-11 pueden utilizarse para preparar un vector recombinante que puede usarse para transformar células huésped susceptibles tales como *E. coli* LE392.

Promotores constitutivos o inducibles pueden usarse en la presente invención, según las necesidades de una situación particular, que puede ser evaluada por un experto en la materia. Gran número de promotores reconocidos por diversas células huésped potenciales se conocen bien. El promotor seleccionado puede estar unido de forma operativa al ADN del cístron que codifica un polipéptido descrito en este documento retirando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de elección. La secuencia promotora nativa y muchos promotores heterólogos pueden usarse para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. Sin embargo, se prefieren promotores heterólogos, puesto que generalmente permiten una mayor transcripción y mayores rendimientos del gen diana expresado en comparación con el promotor polipeptídico diana nativo.

Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de β-galactamasa y lactosa, un sistema promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor *tac* o *trc*. Sin embargo, otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o

de fagos conocidos) también son adecuados. Sus secuencias nucleotídicas se han publicado, con lo que se permite a un experto en la materia unir las de forma operativa a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist *et al.* (1980) Cell 20: 269) usando enlazadores o adaptadores para suministrar cualesquiera puntos de restricción requeridos.

En algunas realizaciones, cada cistrón en un vector recombinante comprende una componente de secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede formar parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para los fines de la presente invención debe ser una que es reconocida y procesada (es decir escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procariontes que no reconocen ni procesan las secuencias señal nativas para los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal sustituye a una secuencia señal procarionte seleccionada, por ejemplo, entre el grupo que consiste en fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp, o líderes de enterotoxina II termoestable (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP.

Células huésped procariontes adecuadas para expresar polipéptidos incluyen Archeobacterias y Eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), Bacilos (por ejemplo, *B. subtilis*), Enterobacteria, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, o *Paracoccus*. Preferentemente, se usan células gram-negativas. Preferentemente la célula huésped debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, e idealmente pueden incorporarse inhibidores de proteasa adicionales en el cultivo celular.

Producción de Polipéptidos

Las Células huésped se transforman o transfectan con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transfección se refiere la captación de un vector de expresión por una célula huésped, se expresen o no de hecho cualesquiera secuencias codificantes. El experto en la materia conoce muchos métodos de transfección, por ejemplo, precipitación con CaPO_4 y electroporación. La transfección con éxito se reconoce generalmente cuando cualquier indicación del funcionamiento de este vector se produce en la célula huésped.

Transformación significa introducir ADN en el huésped procarionte de modo que el ADN sea replicable, como un elemento extracromosómico o mediante un integrante del cromosoma. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio se usa generalmente para células bacterianas que contienen barreras de la pared celular sustanciales. Otro método de transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica usada es la electroporación.

Las células procariontes usadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en el sector y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo luria (LB) más suplementos de nutrientes necesarios. En realizaciones preferidas, el medio también contiene un agente de selección, seleccionado en base a la construcción del vector de expresión, para permitir de forma selectiva el crecimiento de células procariontes que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a medios para el cultivo de células que expresan un gen de resistencia a ampicilina.

También pueden incluirse cualesquiera suplementos necesarios además de fuentes de carbono, nitrógeno, y fosfato inorgánico a concentraciones apropiadas introducidas en solitario o en forma de mezcla con otro suplemento o medio tal como una fuente compleja de nitrógeno. Opcionalmente el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados entre el grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotritol.

Las células huésped procariontes se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el cultivo de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida varía entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 39°C, más preferentemente entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 37°C, aún más preferentemente a aproximadamente 30°C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varía entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. Para *E. coli*, el pH está preferentemente entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,4, y más preferentemente aproximadamente 7,0.

Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión, se induce la expresión de proteínas en condiciones adecuadas para la activación del promotor. Por ejemplo, si se usa un promotor PhoA para controlar la transcripción, las células huésped transformadas pueden cultivarse en un medio limitante de fosfato para la inducción. Pueden usarse diversos inductores diferentes, según la construcción vectorial empleada, como se conoce en el sector.

Los polipéptidos descritos en este documento expresados en un microorganismo pueden secretarse en y recuperarse del periplasma de las células huésped. La recuperación de proteínas habitualmente implica romper los microorganismos, generalmente mediante medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que se han roto las células, los restos celulares o las células completas pueden eliminarse mediante centrifugado o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad en resina. Como alternativa,

las proteínas pueden transportarse al medio de cultivo y aislarse de éste. Las células pueden retirarse del cultivo y el sobrenadante del cultivo filtrarse y concentrarse para una purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse e identificarse adicionalmente usando métodos conocidos habitualmente tales como fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; resinas de afinidad hidrofóbicas, afinidad por ligando usando un antígeno adecuado inmovilizado en una matriz y ensayo de transferencia de Western.

Además de las células huésped procariotas, sistemas de célula huésped eucariota también están bien establecidos en el sector. Los huéspedes adecuados incluyen líneas celulares de mamífero tales como CHO, y células de insecto tales como las que se describen posteriormente.

Purificación de Polipéptidos

Los polipéptidos que se producen pueden purificarse para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Pueden emplearse métodos de purificación de proteínas convencionales conocidos en el sector. Los siguientes procedimientos son ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

Métodos de la invención

La invención proporciona diversos métodos basados en el descubrimiento de que HGF β activado es capaz de unirse directamente a c-met, y que dicha unión puede inhibirse con la sustancia o molécula apropiada.

Diversas sustancias o moléculas (incluyendo péptidos, etc.) pueden emplearse como agentes terapéuticos. Estas sustancias o moléculas pueden formularse según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, con lo que el producto de éstas se combina en mezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Se preparan formulaciones terapéuticas para almacenamiento mezclando el ingrediente activo que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina del suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTTM, PLURONICSTM o PEG.

Las formulaciones a usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución.

Las composiciones terapéuticas en este documento generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

La vía de administración es según métodos conocidos, por ejemplo inyección o infusión mediante vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, administración tópica o mediante sistemas de liberación sostenida.

Las dosificaciones y concentraciones de fármacos deseadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo del uso particular previsto. La determinación de la dosificación o vía de administración apropiada está al alcance de un médico especialista. Los experimentos animales proporcionan una guía fiable para la determinación de dosis eficaces para terapia humana. El aumento a escala interespecífico de dosis eficaces puede realizarse siguiendo los principios expuestos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" en Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi *et al.*, Eds., Pergamon Press, Nueva York 1989, págs. 42-96.

Cuando se emplea la administración *in vivo* de una sustancia o molécula de la invención, las cantidades de dosificación normales pueden variar entre aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más al día, preferentemente de aproximadamente 1 μ g/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. En la bibliografía se proporciona guía sobre dosificaciones y métodos de administración particulares; véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N°. 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Se anticipa que diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, que la administración dirigida a un órgano o tejido, por ejemplo, puede requerir administración de una manera diferente de la dirigida a otro órgano o tejido.

Cuando se desea la administración de liberación sostenida de una sustancia o molécula en una formulación con características de liberación adecuadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que requiere la administración de la sustancia o molécula, se contempla la microencapsulación de la sustancia o molécula. La microencapsulación de proteínas recombinantes para liberación sostenida se ha realizado con éxito con hormona del crecimiento humana (rhGH), interferón- (rhIFN-), interleuquina-2, y MN rgp120. Johnson *et al.*, Nat. Med., 2: 795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27: 1221-1223 (1993); Hora *et al.*, Bio/Technology, 8: 755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems", en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds, (Plenum Press: Nueva York, 1995), págs. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; y Patente de Estados Unidos N°. 5.654.010.

Las formulaciones de liberación sostenida de estas proteínas se desarrollaron usando polímero de ácido poli-láctico-coglicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y amplia gama de propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, ácidos láctico y glicólico, pueden eliminarse rápidamente del cuerpo humano. Además, la degradabilidad de este polímero puede ajustarse de meses a años dependiendo de su peso molecular y composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", en: M. Chasin and R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: Nueva York, 1990), págs. 1-41.

La presente invención abarca métodos de cribado de compuestos para identificar los que inhiben la señalización de HGF/c-met a través de interferencia en la interacción de la cadena β de HGF y c-met. Se diseñan ensayos de cribado para identificar compuestos que se unen o complejan con la cadena β de HGF y/o c-met activado (y preferentemente no similar a zimógeno) (en el punto en c-met que inhibe la unión de la cadena β de HGF activada a c-met), o interfieren de otro modo en la interacción de la cadena β de HGF activada con otras proteínas celulares. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles para cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, que les hacen particularmente adecuados para identificar fármacos candidatos de molécula pequeña.

Los ensayos pueden realizarse en diversos formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en el sector.

Todos los ensayos para antagonistas tiene en común que requieren la puesta en contacto del fármaco candidato con un punto en la cadena β de HGF (o equivalente de la misma) y/o c-met que está implicado en la interacción de unión de la cadena β de HGF activada y c-met, en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen.

En ensayos de unión, la interacción es la unión, y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, una sustancia o molécula candidata se inmoviliza sobre una fase sólida, por ejemplo, sobre una placa de microvaloración, mediante enlaces covalentes o no covalentes. La unión no covalente se consigue generalmente recubriendo la superficie sólida con una solución de la sustancia/molécula y secando. Como alternativa, una molécula de afinidad inmovilizada, tal como un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para la sustancia/molécula a inmovilizar, puede usarse para anclarla a una superficie sólida. El ensayo se realiza añadiendo el componente no inmovilizado, que puede estar marcado mediante una marca detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando la reacción está completa, se retiran los componentes que no reaccionaron, por ejemplo, lavando, y se detectan los complejos anclados en la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado porta una marca detectable, la detección de la marca inmovilizada sobre la superficie indica que se produjo la complejación. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no porta una marca, la complejación puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato interactúa con, pero no se une a, una cadena β de HGF activada o c-met, su interacción con el polipéptido puede ensayarse mediante métodos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen enfoques convencionales, tales como, por ejemplo, reticulación, co-inmunoprecipitación, y co-purificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden supervisarse usando un sistema genético basado en levadura descrito por Fields y colaboradores (Fields y Song, Nature (Londres), 340: 245-246 (1989); Chien *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9578-9582 (1991)) según lo descrito por Chevray y Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente separados, uno que actúa como dominio de unión a ADN, funcionando el otro como dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levadura descrito en las anteriores publicaciones (denominado en general como el "sistema di-híbrido") aprovecha esta propiedad, y emplea dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana está fusionada al dominio de unión a ADN de GAL4, y otra, en la que las proteínas que activan al candidato están fusionadas al dominio de activación. La expresión de un gen informador de GAL1-*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 mediante interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interactúan se detectan con un sustrato cromogénico para p-gatactosidasa. Un kit completo (MATCHMAKERTM) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas que usa la técnica di-híbrida, está disponible en el mercado de Clontech. Este sistema también puede extenderse al mapeo de dominios de proteínas implicadas en interacciones proteicas específicas así como a la localización con exactitud de los restos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

Los compuestos que interfieren en la interacción de la cadena β de HGF activada y c-met pueden ensayarse de la siguiente manera: habitualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene la cadena β de HGF activada y c-met (o equivalente del mismo que comprende punto de unión afín a la cadena β de HGF activada en c-met) en condiciones y durante un tiempo que permite la interacción y la unión de los dos productos. Para ensayar la capacidad de un compuesto candidato de inhibir la unión, la reacción se realiza en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, un placebo puede añadirse a una tercera mezcla de reacción, para que sirva de control positivo. La unión (formación del complejo) entre el compuesto de ensayo y la cadena β de HGF activada y/o c-met (o equivalente del mismo como se ha descrito anteriormente) presente en la mezcla se supervisa como se ha descrito anteriormente en este documento. La formación de un complejo en la reacción (o reacciones) de control pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo impide la interacción de la cadena β de HGF activada y c-met.

Para ensayar inhibidores (tales como antagonistas), puede añadirse HGF de 2 cadenas que comprende la cadena β de HGF activada a una célula junto con el compuesto a cribar para una actividad particular y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del HGF de 2 cadenas sugiere que el compuesto podría ser un antagonista de la cadena β de HGF activada, una propiedad que podría confirmarse adicionalmente determinando su capacidad de unirse o interactuar específicamente con la cadena β de HGF activada y no con la cadena α de HGF (por ejemplo, como se descubrió en HGF de 2 cadenas o HGF de cadena sencilla).

Ejemplos más específicos de antagonistas potenciales incluyen un oligonucleótido (que puede ser un aptámero) que se une a la cadena β de HGF activada y/o su punto de unión en c-met, y, en particular, anticuerpos incluyendo, sin limitación, anticuerpos poli- y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos anti-idiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos. Como alternativa, un antagonista potencial puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada de la cadena β de HGF que reconoce a un socio de unión a la cadena β de HGF pero no causa ningún efecto, inhibiendo de este modo de forma competitiva la acción de la cadena β de HGF de tipo salvaje.

Los antagonistas potenciales incluyen pequeñas moléculas que se unen al punto activo de la cadena β de HGF, el punto de unión de la cadena β de HGF activada en c-met, u otro punto de unión relevante de la cadena β de HGF activada, bloqueando de este modo la actividad biológica normal de la cadena β de HGF activada. Los ejemplos de pequeñas moléculas incluyen, aunque sin limitación, pequeños péptidos o moléculas similares a péptidos, preferentemente péptidos solubles, y compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos no de peptidilo.

Estas pequeñas moléculas pueden identificarse mediante uno cualquiera o más de los ensayos de cribado descritos anteriormente en este documento y/o mediante cualesquiera otras técnicas de cribado bien conocidas por los expertos en la materia.

Como se describe en este documento, una sustancia/molécula de la invención puede ser un péptido. Los métodos para obtener dichos péptidos se conocen bien en el sector, en incluyen cribar bibliotecas peptídicas para aglutinantes para un antígeno diana adecuado. En una realización, antígenos diana adecuados comprenderían la cadena β de HGF activada (o una parte de la misma que comprende un punto de unión para c-met), que se describe con detalle en este documento. Por ejemplo, un antígeno diana adecuado es un polipéptido de cadena β de HGF activada como se describe en este documento, o un polipéptido de HGF de 2 cadenas (que, como se describe en este documento, comprende un componente de la cadena β de HGF activada). En algunos casos, en particular cuando una sustancia/molécula deseada es una que se une en cualquier grado significativo a la cadena β de HGF activada pero no a la cadena α de HGF y/o a la forma de zimógeno de la cadena β de HGF, un aglutinante candidato también puede cribarse para la falta de capacidad de unión sustancial con respecto a un polipéptido que comprende la cadena β de HGF en forma de zimógeno (es decir, cadena β de HGF inactivada) (por ejemplo, HGF de cadena sencilla). Las bibliotecas de péptidos se conocen bien en el sector, y también pueden prepararse según métodos de la técnica. Véase, por ejemplo, Clark *et al.*, Patente de Estados Unidos N°. 6.121.416. Las bibliotecas de péptidos fusionadas a un componente de proteína heteróloga, tal como una proteína de la envuelta de un fago, se conocen bien en el sector, por ejemplo, como se describe en Clark *et al.*, *supra*. En una realización, un péptido que tiene capacidad de bloquear la unión de la cadena β de HGF activada a c-met comprende la secuencia de aminoácidos VDWVCFRDLGCDWEL, o variantes de la misma. Las variantes de un primer aglutinante peptídico pueden generarse cribando mutantes del péptido para obtener las características de interés (por ejemplo, potenciar la afinidad de unión a la diana, farmacocinética potenciada, toxicidad reducida, índice terapéutico mejorado, etc.). Las técnicas de mutagénesis se conocen bien en el sector. Además, técnicas de mutagénesis de barrido (tales como las que se basan en barrido de alanina) pueden ser especialmente útiles para evaluar la importancia estructural y/o funcional de los restos de aminoácidos individuales en un péptido.

La determinación de la capacidad de una sustancia/molécula candidata de la invención, tal como un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos VDWVCFRDLGCDWEL o variante de la misma, para modular la señalización de HGF/c-met y/o actividades biológicas asociadas con dicha señalización, puede realizarse ensayando la capacidad moduladora de la sustancia/molécula en ensayos *in vitro* o *in vivo*, que están bien establecidos en el sector, por ejemplo, como se describe en Okigaki *et al.*, *supra*; Matsumoto *et al.*, *supra*; Date *et al.*, FEBS Let. (1997), 420: 1-6; Lokker *et al.*, *supra*; Hartmann *et al.*, *supra*.

Anticuerpos Anti-cadena β de HGF Activada

La presente invención proporciona además métodos que comprenden el uso de anticuerpos anti-cadena β de HGF activada. Los anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos anti-cadena β de HGF activada pueden comprender anticuerpos policlonales. Los métodos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos por los expertos en la materia. Pueden generarse anticuerpos policlonales en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Habitualmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectará en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir una cadena β de HGF activada (o una parte de la misma) o una proteína de fusión de la misma. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína que se sabe que es inmunógena en el mamífero que se inmuniza. Los ejemplos de dichas proteínas inmunógenas incluyen aunque sin limitación hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, trehalosa dicorinomicolato sintético). El protocolo de inmunización puede seleccionarlo un experto en la materia sin gran experimentación.

2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos anti-cadena β de HGF activada pueden ser, como alternativa, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster, u otro huésped animal apropiado, se inmuniza habitualmente con un agente inmunizante para generar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

El agente inmunizante incluirá habitualmente la cadena β de HGF activada (o una parte de la misma) o una proteína de fusión de la misma. Generalmente, se usan linfocitos de la sangre periférica ("PBL"), si se desean células de origen humano, o se usan células esplénicas o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamífero de origen no humano. Los linfocitos se fusionan a continuación con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) págs. 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Habitualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células no fusionadas inmortalizadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas habitualmente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son las que se fusionan eficazmente, soportan una expresión a alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma múridas, que pueden obtenerse, por ejemplo, a partir del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromioma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos humanos monoclonales [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) págs. 51-63].

A continuación puede ensayarse la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la cadena β de HGF activada en el medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en el sector. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Una vez que las células de hibridoma deseadas se han identificado, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante métodos convencionales [Goding, *supra*]. Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, Medio Eagle Modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Como alternativa, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo o líquido ascítico mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinantes, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped tales como células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producirían proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias homólogas murinas [Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison *et al.*, *supra*] o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia que codifica un polipéptido no de inmunoglobulina. Dicho polipéptido no de inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un punto de combinación con un antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes se conocen bien en el sector. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de cadena ligera de inmunoglobulina y cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc para impedir la reticulación de la cadena pesada. Como alternativa, los restos de cisteína relevantes se sustituyen por otro resto de aminoácido o se eliminan para impedir la reticulación.

Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, puede conseguirse usando técnicas rutinarias conocidas en el sector.

También pueden generarse anticuerpos cribando bibliotecas de presentación en fagos para anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen con afinidad adecuada/deseable a la cadena β de HGF activada (o equivalente). Dichas técnicas se conocen bien en el sector, por ejemplo, como se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 5.750.373; 5.780.279; 5.821.047; 6.040.136; 5.427.908; 5.580.717, y referencias en esos documentos.

3. Anticuerpos Humanos y Humanizados

Los anticuerpos anti-cadena β de HGF activada de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión al antígeno) que contienen una mínima secuencia obtenida de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, restos del marco Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos y al menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de forma óptima al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana [Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)].

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos se conocen bien en el sector. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan como restos "importados", que habitualmente se toman de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988)], sustituyendo CDR o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sustituido a la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR sustituyen a restos de puntos análogos en anticuerpos de roedor.

Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en el sector, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole *et al.*, y Boerner *et al.*, también están disponibles para la preparación de anticuerpos humanos monoclonales (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner *et al.*, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]. Análogamente, pueden prepararse anticuerpos humanos mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los

que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Después de la exposición, se observa producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo reordenación génica, ensamblaje, y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995).

Los anticuerpos también pueden madurar su afinidad usando métodos de selección y/o mutagénesis conocidos, como se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos de afinidad madurada preferidos tienen una afinidad que es cinco veces, más preferentemente 10 veces, aún más preferentemente 20 o 30 veces mayor que el anticuerpo de partida (generalmente murino, humanizado o humano) a partir del cual se prepara el anticuerpo madurado.

4. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es por la cadena β de HGF activada y/o el punto de unión a la cadena β de HGF de c-met, la otra es por cualquier otro antígeno, y preferentemente por una proteína o receptor o subunidad receptora de la superficie celular.

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos se conocen en el sector. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades [Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983)]. Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. Procedimientos similares se describen en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

Los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (puntos de combinación de anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferentemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2, y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el punto necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión diferentes, y se contranfectan en un organismo huésped adecuado. Para más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

Según otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011, el interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. El interfaz preferido comprende al menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más pequeñas cadenas laterales de aminoácidos del interfaz de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena(s) lateral(es) grande(s) en el interfaz de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo grandes cadenas laterales de aminoácidos por otras más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar la producción del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando un enlace químico. Brennan *et al.*, *Science* 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico para estabilizar ditioles vecinales e impedir la formación de puentes disulfuro intermoleculares. Los Fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado de F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo era capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas tumores de cáncer de mama.

Diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente del cultivo celular recombinante también se han descrito. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se re-oxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) proporcionó un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, se fuerza a los dominios V_H y V_L de un fragmento a emparejarse con los dominios complementarios V_L y V_H de otro fragmento, formando de este modo dos puntos de unión al antígeno. Otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena sencilla (sFv) también se ha descrito. Véase, Gruber *et al.*, J. Immunol. 152: 5368 (1994).

Se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol. 147: 60 (1991).

Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítopos diferentes en la cadena β de HGF activada o a un epítipo en la cadena β de HGF activada y a un epítipo en otro polipéptido (por ejemplo, c-met o cadena de HGF).

5. Anticuerpos Heteroconjugados

los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas [Patente de Estados Unidos N° 4.676.980], y para el tratamiento de infección por VIH [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluyendo los que implican agentes reticulantes. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

6. Manipulación de la Función Efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, para potenciar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento de cáncer. Por ejemplo, pueden introducirse restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de puentes disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una mayor destrucción celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron *et al.*, J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad anti-tumoral potenciada también pueden prepararse usando reticulantes heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.* Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, puede diseñarse un anticuerpo que tiene regiones Fc dobles y de este modo puede tener capacidades de lisis del complemento y ADCC potenciadas. Véase Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989).

7. Inmunoconjugados

La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos no de unión de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Diversos radionúclidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , y ^{186}Re . Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan usando diversos agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como di-succinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoyl) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoyl)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolieno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase el documento W094/11026.

En otra realización, el anticuerpo puede conjugarse a un “receptor” (como estreptavidina) para la utilización en la fijación previa como objetivo de tumores donde el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación y a continuación la administración de un “ligando” (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

8. *Inmunoliposomas*

Los anticuerpos descritos en este documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Se preparan liposomas que contienen el anticuerpo mediante métodos conocidos en el sector, tales como los descritos en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y Patentes de Estados Unidos N°. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con un periodo de circulación potenciado se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.013.556.

Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los Liposomas se extruyen a través de filtros de un tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab’ del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse con los liposomas como se describe en Martin *et al.*, J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico (tal como Doxorrubicina) está contenido opcionalmente dentro del liposoma. Véase Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst., 81(19); 1484 (1989).

9. *Composiciones Farmacéuticas de Anticuerpos*

Los anticuerpos, así como otras moléculas identificadas mediante los ensayos de cribado descritos anteriormente en este documento, pueden administrarse, para el tratamiento de diversos trastornos, en forma de composiciones farmacéuticas.

Si se usan anticuerpos completos como inhibidores, se prefieren anticuerpos de internalización. Sin embargo, también pueden usarse lipofecciones o liposomas para administrar una sustancia/molécula de la invención en células cuando esto se desea. Cuando se usan fragmentos de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño. Por ejemplo, en base a las secuencias de región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas peptídicas que conservan su capacidad de unirse a la cadena β de HGF activada y/o al punto de unión de la cadena β de HGF en c-met y/o interferir en la interacción entre la cadena β de HGF activada y c-met. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993). La formulación en este documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Como alternativa, o además, la composición puede comprender un agente que potencia su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citoquina, agente quimioterapéutico, o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

Los ingredientes activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describe en Remington’s Pharmaceutical Sciences, *supra*.

Las formulaciones para usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o alcohol poli(vinílico), poliláctidos (Patente de Estados Unidos N°. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros tales como etilen-vinil acetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, algunos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un periodo largo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios de inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de puentes S-S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando restos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

Los siguientes son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. Se entiende que diversas realizaciones más pueden ponerse en práctica, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplos

5

Materiales y métodos

Materiales

- 10 Las formas maduras del dominio Met ECD (Glu25 a Gln929) que contienen una marca His6 C-terminal se expresaron en células de insecto y se purificaron mediante quelato metálico Ni-NTA y cromatografía de filtración en gel usando protocolos convencionales descritos posteriormente. La proteína de fusión Met-IgG se obtuvo como se ha descrito anteriormente (Mark *et al.*, 1992).

15 *Expresión y purificación de proteínas de HGF β*

- Se expresaron proteínas de HGF β en células de insecto usando el vector de secreción de baculovirus pAcGP67 (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA), que contiene una secuencia señal para la secreción del producto en los medios. Todas las construcciones contenían una marca His6 en el extremo carboxilo y se purificaron hasta homogeneidad (>95% de pureza) mediante quelato metálico Ni NTA y cromatografía de filtración en gel. Para HGF β de tipo salvaje, un fragmento de ADNc que codifica la cadena β de HGF de los restos Val495 [c16] a Ser728 [c250] se clonó mediante PCR de modo que Val495 [c16] se insertó inmediatamente después de la secuencia señal de secreción. Se realizó mutagénesis dirigida usando QuikChangeTM (Stratagene, La Jolla, CA) con el oligonucleótido 5'CCTAAT TATGGATCCACAATTCCTG3' para preparar HGF β que contiene una mutación Cys604 [c128] a Ser (HGF β) para evitar complicaciones potenciales de una Cys expuesta no emparejada en el dominio similar a proteasa. Los mutantes de HGF β Y513A [c36], R516A [c39], Q534A [c57], D578A [c102], Y619A [c143], Y673A [c195], V692A [c214], P693D [c215], G694E [c216], R695A [c217], G696A [c219], I699A [c221a] y R702A [c224] se prepararon como anteriormente en la construcción de HGF β (que tiene la mutación C604S). El mutante de HGF β C561S [c78] (es decir, C561S:C604S) también se preparó como anteriormente en la construcción de HGF β para eliminar ambas cisteínas libres. proHGF β codifica HGF de los restos Asn479 a Ser728 y tiene una mutación R494E realizada usando el oligonucleótido 5'CAAAACGAAACAATTGGAAGTTGTAAATGGGATTC 3'. La cisteína no se alteraba en esta construcción para permitir la supuesta formación de puentes disulfuro entre Cys487 y Cys604. La numeración de la posición de aminoácidos es de la siguiente manera: secuencia HGF de longitud completa [numeración de quimotripsinógeno].

- 35 Vectores de baculovirus que contenían los insertos deseados se transfectaron en células de *Spodoptera frugiperda* (Sf 9) en placas en medio TNM-FH mediante el sistema de expresión "BaculogoldTM Expression System" según las instrucciones del fabricante (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Después de 2-4 rondas de amplificación de virus, 10 ml de solución madre viral se usaron para infectar 11 de las células High FiveTM (Invitrogen, San Diego, CA) en suspensión a 5×10^5 células/ml en medio TNM-FH. Los cultivos se incubaron a 27°C durante 72 h antes de recoger el medio de cultivo mediante centrifugado a 8.000 x g durante 15 min. El medio de cultivo celular se aplicó a una columna de agarosa Ni-NTA de 4 ml (Qiagen, Valencia, CA). Después de lavar con 4 volúmenes de columna de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, las proteínas de HGF β se eluyeron con Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM. El eluato se reunió y se aplicó a una columna SuperdexTM-200 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) se equilibró en HEPES 10 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM. Los picos de proteína se recogieron y concentraron usando un CentriprepTM YM-10 (Millipore, Bedford, MA). Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE al 12% teñida con azul de Coomassie. Todas las mutaciones se verificaron mediante secuenciación de ADN y espectrometría de masas. La concentración de proteína se determinó mediante análisis cuantitativo de aminoácidos. La secuenciación N-terminal mostró un único extremo N correcto presente para proHGF β y las proteínas de HGF β purificadas mostraban la masa molecular correcta en SDS-PAGE; las múltiples bandas observadas se debían probablemente a la glicosilación heterogénea, coherente con los datos de espectrometría de masas que tienen masas moleculares - 2 kDa superiores a las predichas a partir de la secuencia.

Construcción, expresión y purificación de proteínas de HGF de longitud completa

- 55 Se produjeron proteínas recombinantes en 11 cultivos de células de Ovario de Hámster Chino (CHO) mediante transfección transitoria (Peek *et al.*, 2002). Se introdujeron cambios de aminoácidos mediante mutagénesis dirigida (Kunkel, 1985) y se verificaron mediante secuenciación de ADN. El medio de expresión (F-12/Medio Eagle Modificado por Dulbecco) contenía el 1% (v/v) de suero fetal bovino ultra bajo en IgG (FBS) (Gibco, Grand Island, NY). Después de 8 días el medio se recogió y se suplementó con FBS para dar un contenido final del 5-10% (v/v). La incubación adicional durante 2-3 días a 37°C dio como resultado la conversión completa de HGF de cadena sencilla. Esta etapa se omitió para la expresión de proHGF, una forma de cadena sencilla no escindible, que tiene cambios de aminoácidos en el punto de escisión de activación (R494E) y en un punto susceptible a proteasa en la cadena α (R424A) (Peek *et al.*, 2002). Las proteínas mutantes se purificaron a partir del medio mediante cromatografía de intercambio catiónico HiTrap-Sepharose SP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) como se ha descrito (Peek *et al.*, 2002). El examen mediante SDS-PAGE (gradiente del 4-20% de gel) en condiciones reductoras y la tinción con "Simply Blue Safestain" mostraba que todas las proteínas de HGF mutantes eran puras >95% y se convertían completamente en α/β -heterodímeros excepto para proHGF, que permanecía como una forma de cadena sencilla. La concentración de proteínas para cada mutante se determinó mediante análisis cuantitativo de aminoácidos.

Afinidad de unión de HGF β y Met mediante resonancia del plasmón superficial

La afinidad de unión de HGF β por Met se determinó mediante resonancia del plasmón superficial usando un instrumento Biacore 3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ). El dominio Met ECD se inmovilizó en un chip CM5 usando
 5 acoplamiento de amina a ~2000 unidades de resonancia según las instrucciones del fabricante. Una serie de concentraciones de HGF β (es decir, mutante C604S) en HEPES 10 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM que variaban de 12,5 nM a 100 nM se inyectaron a un caudal de 20 μ l/min durante 40 s. Se permitió que el HGF β unido se disociara durante 10 min. Se realizó la apropiada sustracción del fondo. Las constantes de velocidad de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) se obtuvieron mediante un programa de ajuste global proporcionado con el instrumento; la relación
 10 de k_{off}/k_{on} se usó para calcular la constante de disociación (K_d).

Unión de HGF β a Met y ELISA de unión competitiva

Placas de microvaloración (Nunc, Roskilde, Dinamarca) se recubrieron durante una noche a 4°C con 2 μ g/ml de anticuerpo específico Fc de IgG anti-humana de conejo (Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA) en
 15 tampón carbonato sódico 50 mM, pH 9,6. Después de bloquear con BSA al 1% en tampón HBS (HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM y Tween-20 al 0,1%), se añadió 1 μ g/ml de proteína de fusión Met-IgG (Mark *et al.*, 1992) y las placas se incubaron durante 1 h con agitación suave a temperatura ambiente. Después de lavar con tampón HBS, se añadieron proteínas de HGF β durante 1 h. El HGF β unido se detectó usando anti-His-HRP (Qiagen,
 20 Valencia, CA) seguido de la adición de sustrato TMB/H₂O₂ (KPL, Gaithersburg, MD). La reacción se interrumpió con H₃PO₄ 1 M y la A₄₅₀ se midió en un lector de microplacas Molecular Devices SpectraMax Plus384. La concentración eficaz para dar la mitad de la unión máxima (CE₅₀) se determinó mediante un ajuste de cuatro parámetros usando Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA).

Para desarrollar un ELISA competitivo, HGF β de tipo salvaje se biotiniló usando un exceso molar de 20 veces de biotina-maleimida (Pierce, Rockford, IL) a temperatura ambiente durante 2 h. Las placas se trataron como anteriormente excepto que se usó HGF β de tipo salvaje biotinilado y se detectó usando HRP-neutravidina (Pierce, Rockford, IL). Los ensayos competitivos contenían una mezcla de HGF β de tipo salvaje biotinilado 250 nM y diversas concentraciones de proteínas según se indicaba (por ejemplo, variantes de HGF β no marcado, HGF (es decir, de 2 cadenas)
 30 o proHGF (es decir, HGF en forma de cadena sencilla)). Después de la incubación durante 1 h a temperatura ambiente, la cantidad de HGF β de tipo salvaje biotinilado unido en la placa se midió como se ha descrito anteriormente. Los valores de CI₅₀ se determinaron ajustando los datos a una ecuación de cuatro parámetros (Kaleidagraph, Synergy Software, Reading, PA).

Unión de mutantes de HGF a Met

Se preparó HGF biotinilado usando el kit "Sigma immunoprobe biotinylation kit" (Sigma, St. Louis, MO). Placas de microvaloración se recubrieron con anticuerpo específico Fc de IgG anti-humana de conejo como anteriormente. Las placas se lavaron en PBS con el 0,05% (v/v) de Tween-20 seguido de una incubación de 1 h con el 0,5% (p/v)
 40 de BSA, el 0,05% de Tween-20 en PBS, pH 7,4 a temperatura ambiente. Después de lavar, HGF biotinilado 1 nM y proteína de fusión Met-IgG 0,2 nM (Mark *et al.*, 1992) junto con diversas concentraciones de mutantes de HGF, HGF β de tipo salvaje se añadió a los pocillos y se incubó durante 2 h. Después de lavar, el HGF biotinilado unido se detectó mediante la adición de conjugado de estreptavidina peroxidasa de rábano picante diluido (1:3000) (Zymed, South San Francisco, CA) seguido de sustrato de peroxidasa SureBlue TMB y solución de interrupción TMB STOP
 45 (KPL, Gaithersburg, MD). La A₄₅₀ se midió y los valores de CI₅₀ se determinaron como se ha descrito anteriormente. Las afinidades de unión relativas se expresan como la CI₅₀ (mutante)/CI₅₀ (HGF de tipo salvaje).

Fosforilación de Met dependiente de HGF

El ensayo de activación del receptor de quinasa (KIRA) se realizó de la siguiente manera. Cultivos confluentes de células de carcinoma de pulmón A549 (CCL-185, ATCC, Manassas, VA), mantenidas previamente en medio de cultivo (F12 de Ham/DMEM 50:50 (Gibco, Grand Island, NY) que contenía FBS al 10%, (Sigma, St. Louis, MO), se separaron usando Accutase (ICN, Aurora, OH) y se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 50.000 células por pocillo. Después de una noche de incubación a 37°C, se retiró el medio de cultivo y a las células se les
 55 privó de suero durante de 30 a 60 min en medio que contenía FBS al 0,1%. La actividad de fosforilación de Met mediante HGF o mutantes de HGF se determinó a partir de la adición de diluciones sucesivas de 500 a 0,2 ng/ml en medio que contenía FBS al 0,1% seguido de una incubación durante 10 min a 37°C, retirada del medio y lisis celular con 1X tampón de lisis celular (N° de Cat 9803, Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) suplementado con 1X cóctel inhibidor de proteasa serie I (N° de Cat 539131, Calbiochem, San Diego, CA). La cadena β de HGF se realizó análogamente partiendo con 5 μ g/ml. La inhibición de la actividad de fosforilación de Met dependiente de HGF mediante la cadena β de HGF, se determinó a partir de la adición de diluciones sucesivas de 156 a 0,06 nM para ensayar
 60 placas seguido de una incubación de 15 min a 37°C, adición de HGF a 12,5, 25 o 50 nM, una incubación de 10 minutos adicionales a 37°C, retirada del medio y lisis celular como anteriormente. Se analizaron los lisados celulares para Met fosforilado mediante un ensayo de electroquimioluminiscencia usando un instrumento Bio Veris M-Series (Bio Veris Corporation, Gaithersburg, MD). El mAb 4G10 anti-fosfotirosina (Upstate, Lake Placid, NY) se marcó con la marca BV-TAG mediante química de NHS-éster según las instrucciones del fabricante (Bio Veris). El mAb 1928 Anti-Met ECD (Genentech, South San Francisco, CA) se biotiniló usando biotina-X-NHS (Research Organics, Cleveland, OH). El mAb 4G10 marcado con BV-TAG y el anti-Met biotinilado se diluyeron en tampón de ensayo (PBS, Tween-10 al

0,5%, BSA al 0,5%) y se añadió el cóctel a los lisados celulares. Después de incubación a temperatura ambiente con agitación vigorosa durante de 1,5 a 2 h, se añadieron perlas magnéticas de estreptavidina (Dynabeads, Bio Veris) y se incubaron durante 45 min. Las perlas con material unido (anticuerpo anti-Met/Met/anticuerpo anti-fosfotirosina) se capturaron mediante un imán aplicado externamente. Después de una etapa de lavado la señal quimioluminiscente generada mediante la fuente de luz se midió como unidades de luminiscencia relativa en un instrumento Bio Veris. Para cada experimento, la fosforilación de Met inducida por mutantes de HGF se expresó en porcentaje de la máxima señal obtenida con HGF de 2 cadenas.

Ensayo de proliferación

Las células BxPC3 (adenocarcinoma pancreático humano; ECACC No. 93120816) se obtuvieron de la European Collection of Cell Cultures (CAMR Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire (Reino Unido) y se usaron en un Ensayo de proliferación dependiente de HGF. Las células se cultivaron en medio RPMI que contenía FCS al 10% (Sigma F-6178, St. Louis, MO), HEPES 10 mM, glutamina 2 mM, 1X Penicilina-Estreptomicina (Invitrogen 15140-122, Carlsbad, CA), 100 X penicilina 10000 u/ml-estreptomicina 10000 $\mu\text{g/ml}$), y G418 (Invitrogen 10131-035) a 250 $\mu\text{g/ml}$. Las células se lavaron secuencialmente con PBS, PBS que contenía EDTA 10 mM, y después se retiraron usando tripsina. Las células se recogieron en medio que contenía suero y la densidad celular se determinó usando un hemocitómetro. Las células a 50000-75000/ml se sembraron a 200 μl por pocillo en una placa de microvaloración con fondo blanco (Cultur Plate™ 6005680 Packard/PerkinElmer, Boston, MA) usando solamente los 60 pocillos interiores y se dejaron en cultivo durante 24 h. El medio se retiró, las células se lavaron con PBS y 200 μl de medio sin suero que contenía BSA al 0,1% (SF-BSA) se volvieron a añadir a las células. Las células se cultivaron durante 24 h adicionales. El medio se retiró y las diversas proteínas de HGF de ensayo ($n=4$) en 150 μl de SF-BSA se añadieron a los pocillos. HGF de 2 cadenas se usó a 1 nM final para ensayos de inhibición. Se realizaron controles en ausencia de HGF y/o en ausencia de proteínas de HGF de ensayo.

Las células se dejaron en cultivo durante 72 h y a continuación se ensayaron usando el kit CellTiter-Glo Luminescent Kit (Promega G7571, Madison, WI). El procedimiento que se siguió se describe en Promega Technical Bulletin TB288. La placa de microvaloración se leyó en un luminómetro de microplacas TR717 (Berthold 75323 Bad Wildbad, Alemania). El porcentaje de estimulación o inhibición de la proliferación celular se normalizó con los controles apropiados.

Ensayo de migración celular

Células de cáncer de mama MDA-MB-435 (HTB-129, ATCC, Manassas, VA) se cultivaron en medio recomendado suplementado con suero. Las células confluyentes se separaron en PBS que contenía EDTA 10 mM y se diluyeron con medio libre de suero hasta una concentración final de $0,6-0,8 \times 10^5$ células/ml. 0,2 ml de esta suspensión ($1,2-1,6 \times 10^5$ células totales) se añadieron por triplicado a las cámaras superiores de placas Transwell de 24 pocillos (tamaño de poro de 8 μm) (HTS Multiwell™ Insert System, Falcon, Franklin Lakes, NJ) pre-recubiertas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de colágeno de tipo I de cola de rata (Upstate, Lake Placid, NY). HGF de tipo salvaje o mutantes de HGF se añadieron a la cámara inferior a 100 ng/ml en medio libre de suero, a menos que se especifique otra cosa. La cadena β de HGF también se ensayó a 30 $\mu\text{g/ml}$. Después de la incubación durante 13-14 h, las células en la parte apical de la membrana se retiraron y las que migraban a la parte basal se fijaron en paraformaldehído al 4% seguido de tinción con una solución de cristal violeta al 0,5%. Después de lavar y secar al aire, las células se disolvieron en ácido acético al 10% y la A_{560} se midió en un lector de microplacas Molecular Devices. Las actividades pro-migratorias de mutantes de HGF se expresaron como porcentaje de controles de HGF después de sustraer la migración basal en ausencia de HGF. Se tomaron fotografías de células teñidas con una cámara digital Spot (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI) conectada a un microscopio Leitz (Leica Mikroskope & Systeme GmbH, Wetzlar, Alemania). Las fotos se adquirieron mediante Adobe Photoshop 4.0.1 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA).

Resultados

Unión de HGF β a Met

La unión de HGF β a Met se evaluó a partir del cambio en unidades de resonancia medida mediante resonancia del plasmón superficial en un chip CM5 derivatizado con el dominio extracelular de Met (Met ECD). Los resultados muestran que HGF β se une a Met ECD con una K_d de 87 nM calculada a partir de constantes de velocidad de asociación ($k_{on} = 1,18 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y de disociación ($k_{off} = 0,0103 \text{ s}^{-1}$) relativamente rápidas (Fig. 1A). Se obtuvieron resultados similares para la unión al dominio Sema de c-met, donde se calculó una K_d de 27 nM (no se muestran los datos). La unión de HGF β a Met también se confirmó mediante un segundo método independiente usando una placa de ELISA. Después de la incubación de HGF β biotinilado con una fusión de Met-IgG apropiadamente orientada unida a un anticuerpo anti-Fc inmovilizado y la detección con HRP-neutravidina, se determinó un valor de CE_{50} de $320 \pm 140 \text{ nM}$ ($n = 6$; no se muestran los datos).

Puesto que el HGF de cadena sencilla se une a Met con afinidad comparable al HGF de dos cadenas, pero no induce la fosforilación de Met (Lokker *et al.*, 1992; Hartmann *et al.*, 1992), se formuló la hipótesis de que esto puede deberse a la falta de un punto de unión a Met en la forma no escindida de la cadena β . Para probar esta hipótesis, se expresó y purificó proHGF β , una forma similar a zimógeno de HGF β que contiene los 16 restos C-terminales de

la cadena α de HGF y una mutación en el punto de escisión (R494E) para asegurar que la forma de cadena sencilla permanecía intacta. La unión de HGF β y proHGF β a Met se determinó con un ELISA de unión competitiva, que daba como resultado valores de CI_{50} de $0,86 \pm 0,17$ y $11,6 \pm 1,8 \mu M$, respectivamente (Fig. 1B). La unión reducida 13,5 veces muestra que aunque de hecho existe un punto de unión a Met en el HGF β similar a zimógeno, éste no es óptimo.

5 La pérdida de afinidad de unión de proHGF β también se ejemplifica en los datos resumidos en la Fig. 5. En efecto, en otras rondas de experimentación, se descubrió que la cadena β similar a zimógeno era mucho menos eficaz en su capacidad para competir con la cadena β marcada por la unión a c-Met, que tiene una CI_{50} de aproximadamente $41 \mu M$, aproximadamente 75 veces mayor que el valor descubierto para la cadena β de HGF de $0,56 \mu M$ en este ensayo, demostrando que la cadena β de HGF similar a zimógeno tiene una unión significativamente reducida a c-Met (no se muestran los datos). Por lo tanto, diversos experimentos confirman que la cadena β similar a zimógeno (proHGF β) es un ligando de Met sub-óptimo.

Inhibición de la actividad mediante HGF β

15 Aunque HGF β se une a Met, no induce la fosforilación de Met (Fig. 1C). La Figura 1C muestra que HGF β era completamente inactivo, incluso a concentraciones que superaban la actividad de fosforilación óptima mediante HGF de longitud completa en > 1000 veces. Análogamente, en ensayos de migración celular MDA-MB-435, HGF β a concentraciones de hasta $0,95 \mu M$ no tenía ningún efecto. Sin embargo, HGF β inhibe la fosforilación de Met dependiente de HGF de manera dependiente de la concentración (Fig. 1D), aunque la inhibición era incompleta a la concentración más alta usada. La inhibición de la fosforilación de Met es coherente con una competencia directa con HGF por la unión a Met. Según esto, ensayos de unión competitivos muestran que HGF β inhibe la unión de HGF de longitud completa a Met (Fig. 1E), aunque a concentraciones bastante más altas ($CI_{50} = 830 \pm 26$ nM; $n = 3$). En comparación, HGF de longitud completa de tipo salvaje tenía un valor de CI_{50} de $0,86 \pm 0,47$ nM ($n = 3$) en este ensayo.

Las mutaciones en HGF y HGF β afectan a la migración celular y a la fosforilación de Met

Para identificar el punto de unión a Met en la cadena β cambiamos sistemáticamente restos en regiones correspondientes al dominio de activación y el punto activo de serina proteasas, denominado en este documento como “dominio de activación” y “región del punto activo” de HGF. La expresión inicial de mutantes de HGF en células CHO produjo una mezcla de formas de HGF de cadena sencilla y de dos cadenas, ejemplificadas mediante el mutante de HGF 1623A (Fig. 2A). La completa conversión de HGF no escindido residual se consiguió mediante exposición adicional del medio de cultivo recogido al 5-10% de suero durante varios días (Fig. 2A). La pureza de HGF 1623A después de la purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico es representativa de todos los mutantes de HGF (Fig. 2A).

La consecuencia funcional de mutar restos de la cadena β en HGF se evaluó determinando la capacidad de los mutantes de HGF para estimular la migración de células MDA-MB435. Los resultados mostraron que 3 mutantes de HGF, R695A [c217], G696A [c219] y Y673A [c195] estaban gravemente alterados, teniendo menos del 20% de actividad de tipo salvaje, mientras que 5 mutantes Q534A [c57], D578A [c102], V692A [c214], P693A [c215] y G694A [c216] tenían del 20%-60% de la actividad de tipo salvaje (Fig. 2B). Un conjunto adicional de 9 mutantes (R514A, P537A, Y619A, T620A, G621A, K649A, L699A, N701A y R702A) tenía del 60-80% de la actividad de tipo salvaje. Los restantes 21 mutantes tenían actividades $> 80\%$ que el tipo salvaje y se consideraban esencialmente sin cambios con respecto a HGF. Como se esperaba, proHGF no estimulaba la migración celular (Fig. 2B). La capacidad reducida de R695A [c217] o G696A [c219] 1 nM para promover la migración celular se ilustra en la Figura 2C, mostrando que la migración en presencia de cualquier mutante es similar a la migración basal en ausencia de HGF.

Para examinar si actividades reducidas en migración celular se correlacionaban con fosforilación reducida de Met, se examinó un subconjunto de mutantes de HGF en un ensayo del receptor de quinasa (KIRA). Para HGF de tipo salvaje y mutantes de HGF, la máxima fosforilación de Met se observó a concentraciones entre 0,63 y 1,25 nM (Fig. 3). La máxima fosforilación de Met conseguida mediante los mutantes Y673A [c195], R695A [c217] y G696A [c219] era de menos del 30% del tipo salvaje, de acuerdo con sus actividades premigratorias mínima o ausente. Los mutantes Q534A [c57], D578A [c102] y V692A [c214] tenían actividades intermedias (30-60%) en ensayos de migración celular; también tenían niveles intermedios de fosforilación de Met, teniendo el 56%-83% del de HGF de tipo salvaje. De acuerdo con su carencia de actividad de migración celular, proHGF no tenía actividad de fosforilación de Met (Fig. 3).

Efecto de mutaciones de la cadena β sobre la unión de HGF y la cadena β de HGF a Met

60 La afinidad de cada mutante por la proteína de fusión Met-IgG se analizó mediante unión competitiva a HGF. Excepto para K649A [c173] y Y673A [c195] (ambos con una unión aproximadamente 4 veces más débil), todos (> 30) los mutantes de HGF tenían esencialmente la misma afinidad de unión que HGF de dos cadenas ($CI_{50} = 0,83 \pm 0,32$ nM; $n = 30$), indicada mediante sus relaciones de CI_{50} ($IC_{50}mut/IC_{50}WT$), que variaban entre 0,36 y 2,25 (Figura 7). HGF Y673A [c195] y proHGF mostraban una unión aproximadamente 4 veces más débil a Met-IgG en comparación con HGF (Figura 7). [Debe observarse que aunque los valores absolutos de mediciones de afinidad de unión pueden variar entre experimentos, el efecto de mutaciones específicas sobre la capacidad de unión en comparación con el tipo salvaje es reproducible entre múltiples experimentos.] También examinamos las actividades de migración celular de mutantes seleccionados a concentraciones 10 y 50 veces más altas; no se observó aumento en la actividad promigratoria (Figura

8). Por lo tanto, la función alterada de mutantes de HGF no se debe a la unión reducida a Met, puesto que un aumento de la concentración de hasta 50 veces no tenía efecto compensatorio.

La mala correlación entre la unión de mutantes de HGF a Met y su migración celular dependiente de HGF o fosforilación de Met se debe probablemente a la respectivamente alta afinidad entre Met y la cadena α de HGF, que podría ocultar cualquier afinidad reducida debida a la cadena β . Por lo tanto, realizamos mutaciones seleccionadas en el propio HGF β para eliminar cualquier efecto de la cadena α . Los mutantes de HGF β Y513A [c36], R516A [c39], Q534A [c57], D578A [c102], Y619A [c143], Y673A [c195], V692A [c214], P693D [c215], G694E [c216], R695A [c217], G696A [c219], I699A [c221a] y R702A [c224] se ensayaron en un ELISA competitivo con unión de HGF β biotinilado a Met-IgG. El mutante de HGF β C561S [c78] (C604S:C561S) se ensayó para evaluar la actividad en mutantes sin cisteínas libres. Se realizaron mutantes en el fondo de HGF β C604S [c128] para evitar cualquier potencial dimerización durante la purificación, aunque esta mutación no tenía ningún efecto sobre la unión a Met-IgG. Las afinidades de unión de los mutantes se normalizaron a continuación con HGF β , que tenía un $CI_{50} = 0,55 \pm 0,38 \mu M$ ($n = 16$). Los resultados se muestran en la Fig. 5. Un subconjunto seleccionado de estos se representa en la Fig. 4. La mayoría de los mutantes tenía afinidad de unión a Met reducida y algunos mutantes - por ejemplo R695A [c217] y G696A [c219] - no competían en absoluto por la unión (véase la Fig. 5). Ahora observamos una fuerte correlación para la actividad reducida de mutantes de HGF de dos cadenas de longitud completa con unión reducida del mutante de HGF β correspondiente. Se descubrió que algunos mutantes (por ejemplo R695A [c217], G696A [c219] y Y673A [c195]), que tenían la mayor pérdida de actividad de migración (como mutantes de HGF de 2 cadenas de longitud completa) también tenían la mayor pérdida de unión a Met (como mutantes de HGF). A la inversa, los mutantes con una pequeña reducción de la actividad de migración (por ejemplo Y619A [c143] y I699A [c221a]) también tenían una pequeña (menos de 10 veces) reducción de la unión a Met Fig. 5. De este modo, la eliminación de la aportación de unión de la cadena α de HGF en este ensayo de unión a Met mostraba que la reducida actividad de migración de mutantes de HGF de longitud completa se debía a una interacción de unión alterada de la cadena β de HGF con el receptor Met.

Las mutaciones en HGF dan como resultado una reducción de la actividad estimuladora del crecimiento e inhibición potenciada de la proliferación celular dependiente de HGF

Como se muestra en la Fig. 6A, los mutantes en la cadena β de HGF son menos activos como activadores de la proliferación en células BxPC3. Los mutantes ejemplares de la Fig. 6A reflejan un amplio espectro de magnitudes de reducción de la actividad estimuladora del crecimiento. Véase que la actividad de HGF WT a 25 ng/ml era del $83,6 \pm 13,0\%$ ($n = 12$) de la actividad a 100 ng/ml. El % de actividad se refiere a la cantidad de proliferación en presencia de HGF o mutante de HGF (100 ng/ml o 25 ng/ml) menos la cantidad de proliferación en ausencia de HGF). SD es la desviación típica y n es el número de determinaciones independientes.

Los mutantes en la cadena β de HGF también son capaces de actuar como inhibidores de la proliferación celular en presencia de HGF de tipo salvaje (Fig. 6B). En la Fig. 6B, actividad relativa se refiere a la actividad relativa en el ensayo de proliferación. El % de inhibición puede calcularse de varias maneras, dos de las cuales se muestran en la Fig. 6B. el % de actividad I se refiere a la cantidad de proliferación normalizada con respecto a nada de HGF (0%) y 25 ng/ml de HGF WT (100%). De este modo HGF R695A o HGF R424A:494E inhiben el 79% o el 63% de actividad de proliferación celular dependiente de HGF, respectivamente. El % de actividad II se refiere a la cantidad de proliferación normalizada con respecto a 5 $\mu g/ml$ de HGF R695A (0%) o HGF R424A:494E (0%) y 25 ng/ml de HGF WT (100%). De este modo HGF R695A o HGF R424A:494E HGF inhiben el 68% o el 75% de actividad de proliferación celular dependiente de HGF, respectivamente. Véase que HGF WT estaba a 25 ng/ml de HGF de dos cadenas; R695A de 2 cadenas y R424A:494E de 1 cadena estaban a 5 $\mu g/ml$.

Pro-HGF de cadena sencilla no puede competir con la cadena β de HGF por la unión a c-Met

Nuestros datos indican que la cadena β de HGF se une a c-Met, y más específicamente al dominio Sema de c-Met. La cadena α de HGF también se une a c-Met y también puede unirse al dominio Sema. Tratamos de averiguar si los puntos de unión para estas dos cadenas podían solaparse en c-Met. Los resultados mostraron que el pro-HGF de cadena sencilla, que tiene una cadena α intacta y una cadena β similar a zimógeno, no compete con la unión de la cadena β de HGF a c-Met-IgG a las concentraciones indicadas en la Fig. 9. Sin embargo, el HGF de dos cadenas, que tiene una cadena α intacta y una cadena β activada, compete con un CI_{50} de 19 nM, lo que apoya la conclusión de que las cadenas α y β se unen en diferentes puntos en c-Met (Fig. 9). Un experimento de control en un ELISA competitivo mostraba que el pro-HGF de cadena sencilla competía con la unión de HGF de dos cadenas biotinilado a c-Met-IgG con un valor de CI_{50} de 12 nM, similar al valor de CI_{50} de 6 nM para HGF de dos cadenas (no se muestran los datos).

60 Discusión

HGF adquiere actividad biológica después de la conversión proteolítica de la forma precursora de cadena sencilla en HGF de dos cadenas (Naka *et al.*, 1992; Hartmann *et al.*, 1992; Lokker *et al.*, 1992; Naldini *et al.* 1992). Partiendo de la similitud estructural de HGF con serina proteasas similares a quimotripsina (Perona y Craik, 1995; Rawlings *et al.*, 2002; Donate *et al.*, 1994) y plasminógeno en particular, formulamos la hipótesis de que este proceso de activación está asociado con cambios estructurales que se producen en la cadena β de HGF. En este documento se proporcionan pruebas de que la cadena β de HGF "activada", contiene un punto de unión a Met distinto situado en una región que corresponde al punto de unión de sustrato/inhibidor de serina proteasas similares a quimotripsina.

Interacciones de unión de HGF a Met

Estudios de unión con cadenas β de HGF purificadas mostraron que la forma “activada” de HGF β (Val495-Ser728) se une a Met con una afinidad aproximadamente 14 veces más alta que su forma precursora, proHGF β (Asn479-Ser728), coherente con la observación de que la optimización del punto de unión a Met es contingente después de procesar HGF de cadena sencilla. Esto sugería que el punto de unión a Met incluye la región de HGF que sufre reordenaciones conformacionales después de la escisión de scHGF, es decir el “dominio de activación”. En efecto, el análisis funcional de variantes de HGF con sustituciones de aminoácidos en el “dominio de activación” condujo a la identificación del punto de unión a Met funcional. Sin embargo, los mutantes de HGF con las mayores pérdidas de actividades pro-migratorias (Q534A, D578A, Y673A, V692A, P693A, G694A, R695A, G696A y R702A) mostraron afinidades de unión esencialmente sin cambios por Met, excepto Y673A (pérdida de 4 veces), puesto que la afinidad de HGF está dominada por la cadena α de HGF (Lokker *et al.*, 1994; Okigaki *et al.*, 1992). Coherente con esto, las actividades reducidas permanecían sin cambios después del aumento de la concentración de mutantes de HGF en más de 50 veces (Fig. 8). Por lo tanto, las actividades reducidas de los mutantes de HGF se interpretaron como resultantes de interacciones moleculares perturbadas de la cadena β de HGF con su punto de unión específico, de baja afinidad, en Met. En apoyo de esto, descubrimos que las actividades biológicas reducidas de mutantes de HGF seleccionados (de 2 cadenas y longitud completa) estaban bien correlacionadas con la unión a Met reducida de los mutantes de HGF β correspondientes en un ensayo que eliminaba la aportación de unión de la cadena α de HGF. Por ejemplo, los mutantes de HGF β R695A [c217], G696A [c219] y Y673A [c195] no tenían unión a Met medible, lo que correlacionaba con funciones biológicas enormemente alteradas como mutantes de longitud completa.

De acuerdo con los datos para un punto de unión con afinidad relativamente baja para la unión de HGF β a Met, experimentos de resonancia del plasmón superficial con dominio extracelular de Met inmovilizado mostraron que HGF β se unía a Met con una K_d de aproximadamente 90 nM. Las evidentes diferencias de afinidad observadas entre valores de K_d y CI_{50} se deben a los diferentes ensayos usados, por ejemplo donde los valores más altos de CI_{50} reflejan las mayores concentraciones de HGF β necesarias para competir con HGF β biotinilado 250 nM, por la unión a Met.

El punto de unión a Met funcional está centrado en “restos de la triada catalítica” Gln534 [c57], Asp578 [c102], Tyr673 [c195] y el bucle [c220] (restos Val692, Gly694, Arg695 y Gly696). Todas nuestras sustituciones de Ala no requerirían grandes cambios de la conformación de la cadena principal excepto en Gly696. En este caso, ángulos ϕ/ψ de 50°/146° y la sustitución de un resto no de Gly provocarían cambios conformacionales en el bucle [c220], conduciendo a una actividad reducida del mutante G696A. Juntos, estos restos tienen un notable parecido con la región de procesamiento del sustrato de auténticas serina proteasas. Este descubrimiento coincide con un estudio anterior, que identificaba Y673 y V692 como restos importantes para la activación de Met (Lokker *et al.*, 1992). La actividad normal medida para la variante de HGF Q534H en ese estudio puede reflejar compensación funcional de Gln por His, un isómero relativamente cercano.

La importancia funcional del bucle [c220] tiene un precedente en la bien descrita familia de serina proteasas similares a quimotripsina (Perona y Craik, 1994; Hedstrom, 2002). La extendida conformación canónica de sustratos e inhibidores incluye restos que pueden formar interacciones en la cadena principal de [c214-c218]. Esta región también está reconocida como regulador alostérico de la actividad catalítica de trombina (Di Cera *et al.*, 1995) y como punto de interacción con su inhibidor hirudina (Stubbs y Bode, 1993). Además, los restos en el Factor VIIa y trombina que corresponden a HGF R695 [c217] son importantes para el procesamiento del sustrato catalizado por enzimas (Tsiang *et al.*, 1995; Dickinson *et al.*, 1996). Además, el resto correspondiente en MSP, R683 [c217], juega un papel crucial en la interacción de alta afinidad de la cadena β de MSP con su receptor Ron (Danilkovitch *et al.*, 1999). MSP R683 [c217] forma parte de un grupo de cinco restos de arginina expuestos en superficie de los que se ha propuesto la implicación en la unión de alta afinidad a Ron (Miller y Leonard, 1998). Aunque solamente R695 [c217] y posiblemente K649 [c173] se conservan en HGF, estos restos se sitúan todos en la región de unión a Met de la cadena β de HGF, lo que nos llevó a especular que el punto de unión a Ron en la cadena β de MSP es altamente homólogo.

Los resultados descritos en este documento con mutantes Ala de HGF concuerdan con un estudio previo donde Tyr673 [c195] y Val692 [c214] se sustituían cada uno por serina (Lokker *et al.*, 1991). La actividad biológica normal medida para la variante de HGF Q534H [c57] en dos informes previos (Lokker *et al.*, 1991; Matsumoto *et al.*, 1991) puede reflejar la compensación funcional de Gln por His, un isómero relativamente cercano. Sin embargo, nuestros resultados contrastan con estudios previos que demostraban que la propia cadena β de HGF no se une a ni inhibe la unión de HGF a Met (Hartmann *et al.*, 1992; Matsumoto *et al.*, 1998). En un caso, la cadena β de HGF era diferente de la nuestra, teniendo restos extra de la cadena α obtenidos de la escisión con elastasa de HGF, lo que podía afectar de forma adversa a la unión a Met. Sin embargo, es más probable que las concentraciones usadas, la sensibilidad de los ensayos o el grado de procesamiento de pro-HGF puedan haber sido insuficientes para observar la unión de este punto de baja afinidad (Matsumoto *et al.*, 1998). Se ha descrito que la cadena β de HGF se une a Met, aunque solamente en presencia del fragmento NK4 de la cadena α (Matsumoto *et al.*, 1998).

Mecanismos de Señalización

En principio, la existencia de dos puntos de unión a Met - uno de alta afinidad y otro de baja afinidad - en una molécula de HGF podría apoyar un modelo 2:1 de un complejo de señalización de Met:HGF, análogo al modelo 2:1 propuesto de Ron:MSP (Miller y Leonard, 1998). En el sistema MSP/Ron ligando/receptor relacionado, las cadenas α y β individuales de MSP, que están desprovistas de actividad de señalización, pueden unirse a Ron y competir con MSP

de longitud completa por la unión al receptor (Danilkovitch *et al.*, 1999). Lo mismo ocurre en el sistema HGF/Met. Sin embargo, estudios bioquímicos no han identificado ningún complejo 2:1 de Met:HGF (Gherardi *et al.*, 2003). Además, este modelo de activación del receptor requiere algún, hasta ahora desconocido, mecanismo molecular que impediría que una molécula de HGF se uniera simultáneamente a un receptor Met a través de sus cadenas α y β .

Como alternativa, la cadena β de HGF podría tener funciones críticas en la activación del receptor aparte de las implicadas en interacciones directas con Met que podrían favorecer un complejo 2:2 de HGF:Met. Descubrimos que proHGF β , la forma “inactivada” de cadena sencilla de la cadena β de HGF, se unía más fuertemente a Met que varios mutantes en la forma “activada” de HGF β , es decir Y673A, V692A y R695A (por ejemplo, Fig. 5). En gran medida, los tres mutantes de HGF de longitud completa correspondientes muestran actividades de fosforilación del receptor y/o pro-migratoria medibles, sin embargo proHGF no las muestra, ni siquiera a concentraciones 1000 veces mayores que la necesaria para la actividad por HGF. Esta significativa distinción nos lleva a considerar funciones adicionales de la cadena β de HGF en la activación del receptor.

Conclusión

En conclusión, los resultados presentados en este documento muestran que la cadena β de HGF contiene un, hasta la fecha desconocido, punto de interacción con Met, que es similar a la “región del punto activo” de serina proteasas. Por lo tanto HGF es bivalente, teniendo un punto de unión a Met de alta afinidad en la región NK1 de la cadena α . Otras importantes interacciones pueden producirse entre dos cadenas β de HGF, dos cadenas α de HGF (Donate *et al.*, 1994) y, como se descubrió con MSP/Ron (Angeloni *et al.*, 2004), entre dos dominios Sema de Met. Además, la heparina también juega un papel clave en la unión de HGF/receptor Met. La identificación de un punto de unión a Met distinto en la cadena β de HGF proporciona una base científica y empírica para el diseño de nuevas clases de inhibidores de Met con potencial terapéutico para enfermedades tales como cáncer.

Lista parcial de referencias

Angeloni, D., Danilkovitch-Miagkova, A., Miagkov, A., Leonard, E. J., y Lerman, M. I. (2004). The soluble sema domain of the RON receptor inhibits MSP-induced receptor activation. *J. Biol. Chem.*, 279, 3726-3732.

Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., y Vande Woude, G. F. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915-925.

Boose, J. A., Kuismanen, E., Gerard, R., Sambrook, J., y Gething, M. J. (1989). The single-chain form of tissue-type plasminogen activator has catalytic activity: Studies with a mutant enzyme that lacks the cleavage site. *BioEP chemistry* 28, 638-643.

Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Faletto, D. L., Chan, A. M., Kmiecik, T. E., Vande Woude, G. F., y Aaronson, S. A. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met protooncogene product. *Science* 251, 802-804.

Broze Jr., G. J. (2001). Protein Z-dependent regulation of coagulation. *Thromb. Haemost.* 86, 8-13.

CCP4 (1994). The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D* 50, 760-763.

Chirgadze *et al.*, *FEBS Letters* (1998), 430: 126-129.

Cohen, G. H. (1997). Align - a program to superimpose protein coordinates, accounting for insertions and deletions. *J Appl. Crystallogr.* 30, 1160-1161.

Cooper, C. S., Blair, D. G., Oskarsson, M. K., Tainsky, M. A., Eader, L. A., y Vande Woude, G. F. (1984a). Characterization of human transforming genes from chemically transformed, teratocarcinoma, and pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 44, 1-10.

Cooper, C. S., Park, M., Blair, D. G., Tainsky, M. A., Huebner, K., Croce, C. M., y Vande Woude, G. F. (1984b). Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 311, 29-33.

Danilkovitch, A., Miller, M., y Leonard, E. J. (1999). Interaction of macrophage-stimulating protein with its receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 29937-29943.

Danilkovitch-Miagkova, A., y Zbar, B. (2002). Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *J. Clin. Invest.* 109, 863-867.

Date *et al.*, *FEBS Lett.* (1997), 420: 1-6.

Dennis, M. S., Eigenbrot, C., Skelton, N. J., Ultsch, M. H., Santell, L., Dwyer, M. A., O'Connell, M. P., y Lazarus, R. A. (2000). Peptide exosite inhibitors of factor VIIa as anticoagulants. *Nature* 404, 465-470.

- Derksen, P. W., Keehnen, R. M. J., Evers, L. M., van Oers, M. H. J., Spaargaren, M., y Pals, S. T. (2002).** Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signalling in multiple myeloma. *Blood* 99, 1405-1410.
- 5 **Di Cera, E., Guinto, E. R., Vindigni, A., Dang, Q. D., Ayala, Y. M., Wuyi, M., y Tulinsky, A. (1995).** The Na⁺ binding site of thrombin. *J. Biol. Chem.* 270, 22089-22092.
- Dickinson, C. D., Kelly, C. R., y Ruf, W. (1996).** Identification of surface residues mediating tissue factor binding and catalytic function of the serine protease factor VIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14379-14384.
- 10 **Donate, L. E., Gherardi, E., Srinivasan, N., Sowdhamini, R., Aparicio, S., y Blundell, T. L. (1994).** Molecular evolution and domain structure of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGF1/MSP). *Protein Sci.* 3, 2378-2394.
- 15 **Drain, J., Bishop, J. R., y Hajduk, S. L. (2001).** Haptoglobin-related protein mediates trypanosome lytic factor binding to Trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 276, 30254-30260.
- Gherardi, E., Youles, M. E., Miguel, R. N., Blundell, T. L., Iamlele, L., Gough, J., Bandyopadhyay, A., Hartmann, G., y Butler, P. J. (2003).** Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 12039-12044.
- 20 **Hartmann, G., Naldini, L., Weidner, K. M., Sachs, M., Vigna, E., Comoglio, P. M., y Birchmeier, W. (1992).** A functional domain in the heavy chain of scatter factor/hepatocyte growth factor binds the c-Met receptor and induces cell dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11574-11578.
- 25 **Hartmann, G., Prospero, T., Brinkmann, V., Ozcelik, C., Winter, G., Hepple, J., Batley, S., Bladt, F., Sachs, M., Birchmeier, C., et al. (1998).** Engineered mutants of HGF/SF with reduced binding to heparan sulphate proteoglycans, decreased clearance and enhanced activity *in vivo*. *Curr. Biol.* 8, 125-134.
- 30 **Hedstrom, L. (2002).** Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* 102, 4501-4523.
- Huber, R., y Bode, W. (1978).** Structural basis of the activation and action of trypsin. *Acc Chem. Res.* 11, 114-122.
- 35 **Kunkel, T. A. (1985)** *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 82, 488-492.
- Kurosky, A., Barnett, D. R., Lee, T. H., Touchstone, B., Hay, R. E., Amott, M. S., Bowman, B. H., y Fitch, W. M. (1980).** Covalent structure of human haptoglobin: a serine protease homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3388-3392.
- 40 **Lijnen, H. R., Van Hoef, B., Nelles, L., y Collen, D. (1990).** Plasminogen activation with single-chain urokinase type plasminogen activator (scu-PA). Studies with active site mutagenized plasminogen (Ser740[®] Ala) and plasmin-resistant scu-PA (Lys158[®] Glu). *J. Biol. Chem.* 265, 5232-5236.
- 45 **Lin, C.-Y., Anders, J., Johnson, M., Sang, Q. A., y Dickson, R. B. (1999).** Molecular cloning of cDNA for matriptase, a matrix-degrading serine protease with trypsin-like activity. *J. Biol. Chem.* 274, 18231-18236.
- Lokker, N. A., Mark, M. R., Luis, E. A., Bennett, G. L., Robbins, K. A., Baker, J. B., y Godowski, P. J. (1992).** Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *EMBO J.* 11, 2503-2510.
- 50 **Lokker, N. A., Presta, L. G., y Godowski, P. J. (1994).** Mutational analysis and molecular modeling of the Nterminal kringle-containing domain of hepatocyte growth factor identifies amino acid side chains important for interaction with the c-Met receptor. *Protein Eng.* 7, 895-903.
- 55 **Ma, P. C., Maulik, G., Christensen, J., y Salgia, R. (2003).** c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev.* 22, 309-325.
- Malkowski, M. G., Martin, P. D., Guzik, J. C., y Edwards, B. F. P. (1997).** The co-crystal structure of unliganded bovine α -thrombin and prethrombin-2: movement of the Tyr-Pro-Pro-Trp segment and active site residues upon ligand binding. *Protein Sci.* 6, 1438-1448.
- 60 **Mark, M. R., Lokker, N. A., Zioncheck, T. F., Luis, E. A., y Godowski, P. J. (1992).** Expression and characterization of hepatocyte growth factor receptor-IgG fusion proteins. Effects of mutations in the potential proteolytic cleavage site on processing and ligand binding. *J. Biol. Chem.* 267, 26166-26171.
- 65 **Matsumoto, K., Takehara, T., Inoue, H., Hagiya, M., Shimizu, S., y Nakamura, T. (1991).** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 691-699.

Matsumoto, K., Kataoka, H., Date, K., y Nakamura, T. (1998). Cooperative interaction between α - and β -chains of hepatocyte growth factor on c-Met receptor confers ligand-induced receptor tyrosine phosphorylation and multiple biological responses. *J. Biol. Chem.* 273, 22913-22920.

Maulik, G., Shrikhande, A., Kijima, T., Ma, P. C., Morrison, P. T., y Salgia, R. (2002). Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 41-59.

Miller, M., y Leonard, E. J. (1998). Mode of receptor binding and activation by plasminogen-related growth factors. *FEBS Lett.* 429, 1-3.

Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y., y Kitamura, N. (1993). Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. *J. Biol. Chem.* 268, 10024-10028.

Naka, D., Ishii, T., Yoshiyama, Y., Miyazawa, K., Hara, H., Hishida, T., y Kitamura, N. (1992). Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of single chain form to a heterodimer. *J. Biol. Chem.* 267, 20114-20119.

Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., y Shimizu, S. (1989). Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342, 440-443.

Naldini, L., Tamagnone, L., Vigna, E., Sachs, M., Hartmann, G., Birchmeier, W., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Blasi, F., y Comoglio, P. M. (1992). Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J.* 11, 4825-4833.

Okigaki, M., Komada, M., Uehara, Y., Miyazawa, K., y Kitamura, N. (1992). Functional characterization of human hepatocyte growth factor mutants obtained by deletion of structural domains. *Biochemistry* 31, 9555-9561.

Parry, M. A., Fernandez-Catalan, C., Bergner, A., Huber, R., Hopfner, K. P., Schlott, B., Guhrs, K. H., y Bode, W. (1998). The ternary microplasmin-staphylokinase-microplasmin complex is a proteinase-cofactor-substrate complex in action. *Nat. Struct. Biol.* 5, 917-923.

Peek, M., Moran, P., Mendoza, N., Wickramasinghe, D., y Kirchhofer, D. (2002). Unusual proteolytic activation of pro-hepatocyte growth factor by plasma kallikrein and coagulation factor XIa. *J. Biol. Chem.* 277, 47804-47809.

Peisach, E., Wang, J., de los Santos, T., Reich, E., y Ringe, D. (1999). Crystal structure of the proenzyme domain of plasminogen. *Biochemistry* 38, 11180-11188.

Perona, J. J., y Craik, C. S. (1995). Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* 4, 337-360.

Rawlings, N. D., O'Brien, E., y Barrett, A. J. (2002). MEROPS: the protease database. *Nucl. Acid Res.* 30, 343-346.

Renatus, M., Engh, R. A., Stubbs, M. T., Huber, R., Fischer, S., Kohnert, U., y W., B. (1997). Lysine 156 promotes the anomalous proenzyme activity of tPA: X-ray crystal structure of single-chain human tPA. *EMBO J.* 16, 4797-4805.

Richardson, J. L., Kroger, B., Hoeffken, W., Sadler, J. E., Pereira, P., Huber, R., Bode, W., y Fuentes-Prior, P. (2000). Crystal structure of the human α -thrombin-haemadin complex: an exosite II-binding inhibitor. *EMBO J.* 19, 5650-5660.

Shimomura, T., Miyazawa, K., Komiyama, Y., Hiraoka, H., Naka, D., Morimoto, Y., y Kitamura, N. (1995). Activation of hepatocyte growth factor by two homologous proteases, blood-coagulation factor XIIa and hepatocyte growth factor activator. *Eur J Biochem* 229, 257-261.

Stubbs, M., y Bode, W. (1993). A player of many parts: The spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb. Res.* 69, 1-58.

Takeuchi, T., Shuman, M. A., y Craik, C. S. (1999). Reverse biochemistry: use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11054-11061.

Trusolino et al., FASEB J. (1998), 12:1267-1280.

Trusolino, L., y Comoglio, P. M. (2002). Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nature Rev. Cancer* 2, 289-300.

Tsiang, M., Jain, A. K., Dunn, K. E., Rojas, M. E., Leung, L. L. K., y Gibbs, C. S. (1995). Functional mapping of the surface residues of human thrombin. *J. Biol. Chem.* 270, 16854-16863.

Vijayalakshmi, J., Padmanabhan, K. P., Mann, K. G., y Tulinsky, A. (1994). The isomorphous structures of prethrombin2, hirugen-, and PPACK-thrombin: changes accompanying activation and exosite binding to thrombin. *Protein Sci.* 3, 2254-2271.

Wang, D., Bode, W., y Huber, R. (1985). Bovine chymotrypsinogen A: x-ray crystal structure analysis and refinement of a new crystal form at 1.8Å resolution. *J. Mol. Biol.* 185, 595-624.

Wang, D., Julian, F. M., Breathnach, R., Godowski, P. J., Takehara, T., Yoshikawa, W., Hagiya, M., y Leonard, E. J. (1997). Macrophage stimulating protein (MSP) binds to its receptor via the MSP β chain. *J. Biol. Chem.* 272, 16999-17004.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5879910 A [0004]
- US 4816567 A [0072] [0136] [0136] [0141]
- US 4657760 A [0113]
- US 5206344 A [0113]
- US 5225212 A [0113]
- WO 9703692 A [0114]
- WO 9640072 A [0114]
- WO 9607399 A [0114]
- US 5654010 A [0114]
- US 6121416 A, Clark [0126]
- US 5750373 A [0139]
- US 5780279 A [0139]
- US 5821047 A [0139]
- US 6040136 A [0139]
- US 5427908 A [0139]
- US 5580717 A [0139]
- US 5545807 A [0142]
- US 5545806 A [0142]
- US 5569825 A [0142]
- US 5625126 A [0142]

ES 2 323 425 T3

- US 5633425 A [0142]
- US 5661016 A [0142]
- 5 • WO 9308829 A [0145]
- WO 9627011 A [0147]
- US 4676980 A [0153] [0153]
- 10 • WO 9100360 A [0153]
- WO 92200373 A [0153]
- 15 • EP 03089 A [0153]
- WO 9411026 A [0156]
- US 4485045 A [0158]
- 20 • US 4544545 A [0158]
- US 5013556 A [0158]
- 25 • US 3773919 A [0164]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- 30 • **SAMBROOK** *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 1989 [0060]
- *Oligonucleotide Synthesis*. 1984 [0060]
- *Animal Cell Culture*. 1987 [0060]
- 35 • *Methods in Enzymology*. *Academic Press, Inc.*, [0060]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. 1987 [0060]
- 40 • PCR: The Polymerase Chain Reaction. 1994 [0060]
- **PERBAL BERNARD V.** *A Practical Guide to Molecular Cloning*, 1988 [0060]
- **MORRISON** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0072]
- 45 • **JONES** *et al.* *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0073] [0140] [0141]
- **RIECHMANN** *et al.* *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0073] [0140]
- 50 • **PRESTA**. *Curr Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0073]
- **VASWANI; HAMILTON**. *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.*, 1998, vol. 1, 105-115 [0073]
- **HARRIS**. *Biochem. Soc. Transactions*, 1995, vol. 23, 1035-1.038 [0073]
- 55 • **HURLE; GROSS**. *Curr. Op. Biotech.*, 1994, vol. 5, 428-433 [0073]
- **MARKS** *et al.* *Bio/technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0075]
- 60 • **BARBAS** *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci, USA*, 1994, vol. 91, 3809-3813 [0075]
- **SCHIER** *et al.* *Gene*, 1995, vol. 169, 147-155 [0075]
- **YELTON** *et al.* *J. Immunol.*, 1995, vol. 155, 1994-2004 [0075]
- 65 • **JACKSON** *et al.* *J. Immunol.*, 1995, vol. 154 (7), 3310-9 [0075]
- **HAWKINS** *et al.* *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 226, 889-896 [0075]

ES 2 323 425 T3

- **AGNEW**. *Chem Intl. Ed. Engl.*, 1994, vol. 33, 183-186 [0086]
- Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs. **MURAKAMI** *et al.* The Molecular Basis of Cancer. *WB Saunders*, 1995, 13 [0088]
- 5 • **SIEBENLIST** *et al.* *Cell*, 1980, vol. 20, 269 [0094]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. 1980 [0108]
- 10 • The use of interspecies scaling in toxicokinetics. **MORDENTI**, J.; **CHAPPELL**, W. *et al.* Toxicokinetics and New Drug Development. *Pergamon Press*, 1989, 42-96 [0112]
- **JOHNSON** *et al.* *Nat. Med.*, 1996, vol. 2, 795-799 [0114]
- 15 • **YASUDA**. *Biomed. Ther.*, 1993, vol. 27, 1221-1223 [0114]
- **HORA** *et al.* *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 755-758 [0114]
- 20 • Design and Production of Single Immunization Bacines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems. **CLELAND**. Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. *Plenum Press*, 1995, 439-462 [0114]
- Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer. **LEWIS**. Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems. *Marcel Dekker*, 1990, 1-41 [0115]
- 25 • **FIELDS; SONG**. *Nature* (London), 1989, vol. 340, 245-246 [0120]
- **CHIEN** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 9578-9582 [0120]
- **CHEVRAY; NATHANS**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 89, 5789-5793 [0120]
- 30 • **DATE** *et al.* *FEBS Let.*, 1997, vol. 420, 1-6 [0127]
- **KOHLER; MILSTEIN**. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0130]
- 35 • **GODING**. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. *Academic Press*, 1986, 59-103 [0131]
- **KOZBOR**. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0132]
- 40 • **BRODEUR** *et al.* Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. *Marcel Dekker, Inc*, 1987, 51-63 [0132]
- **MUNSON; POLLARD**. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0133]
- **PRESTA**. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0140]
- 45 • **RIECHMANN** *et al.* *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0141]
- **VERHOEYEN** *et al.* *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0141]
- 50 • **HOOGENBOOM; WINTER**. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0142]
- **MARKS** *et al.* *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0142]
- 55 • **COLE** *et al.* Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. *Alan R. Liss*, 1985, 77 [0142]
- **BOERNER** *et al.* *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0142]
- **MARKS** *et al.* *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0142]
- 60 • **LONBERG** *et al.* *Nature*, 1994, vol. 368, 856-859 [0142]
- **MORRISON**. *Nature*, 1994, vol. 368, 812-13 [0142]
- 65 • **FISHWILD** *et al.* *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-51 [0142]
- **NEUBERGER**. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 826 [0142]
- **LONBERG; HUSZAR**. *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0142]

- **MILSTEIN; CUELLO.** *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0145]
- **TRAUNECKER et al.** *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0145]
- 5 • **SURESH et al.** *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0146]
- **BRENNAN et al.** *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0148]
- **SHALABY et al.** *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 175, 217-225 [0149]
- 10 • **KOSTELNY et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0150]
- **HOLLINGER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0150]
- 15 • **GRUBER et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5368 [0150]
- **TUTT et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60 [0151]
- **CARON et al.** *J. Exp Med.*, 1992, vol. 176, 1191-1195 [0154]
- 20 • **SHOPES.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 2918-2922 [0154]
- **WOLFF et al.** *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 2560-2565 [0154]
- 25 • **STEVENSON et al.** *Anti-Cancer Drug Design*, 1989, vol. 3, 219-230 [0154]
- **VITETTA et al.** *Science*, 1987, vol. 238, 1098 [0156]
- **EPSTEIN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0158]
- 30 • **HWANG et al.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0158]
- **MARTIN et al.** *J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, 286-288 [0159]
- 35 • **GABIZON et al.** *J. National Cancer Inst.*, 1989, vol. 81 (19), 1484 [0159]
- **MARASCO et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 7889-7893 [0161]
- **ANGELONI, D.; DANILKOVITCH-MIAGKOVA, A.; MIAGKOV, A.; LEONARD, E. J.; LERMAN, M. I.** The soluble sema domain of the RON receptor inhibits MSP-induced receptor activation. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, 3726-3732 [0198]
- 40 • **BIRCHMEIER, C.; BIRCHMEIER, W.; GHERARDI, E.; VANDE WOUDE, G. F.** Met, metastasis, motility and more. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003, vol. 4, 915-925 [0198]
- 45 • **BOOSE, J. A.; KUISMANEN, E.; GERARD, R.; SAMBROOK, J.; GETHING, M. J.** The single-chain form of tissue-type plasminogen activator has catalytic activity: Studies with a mutant enzyme that lacks the cleavage site. *Biochemistry*, 1989, vol. 28, 638-643 [0198]
- **BOTTARO, D. P.; RUBIN, J. S.; FALETTA, D. L.; CHAN, A. M.; KMIECIK, T. E.; VANDE WOUDE, G. F.; AARONSON, S. A.** Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met protooncogene product. *Science*, 1991, vol. 251, 802-804 [0198]
- 50 • **BROZE JR., G. J.** Protein Z-dependent regulation of coagulation. *Thromb. Haemost.*, 2001, vol. 86, 8-13 [0198]
- 55 • The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr.*, 1994, vol. D50, 760-763 [0198]
- **CHIRGADZE et al.** *FEBS Letters*, 1998, vol. 430, 126-129 [0198]
- **COHEN, G. H.** Align - a program to superimpose protein coordinates, accounting for insertions and deletions. *J Appl. Crystallog.*, 1997, vol. 30, 1160-1161 [0198]
- 60 • **COOPER, C. S.; BLAIR, D. G.; OSKARSSON, M. K.; TAINSKY, M. A.; EADER, L. A.; VANDE WOUDE, G. F.** Characterization of human transforming genes from chemically transformed, teratocarcinoma, and pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, 1984, vol. 44, 1-10 [0198]
- 65 • **COOPER, C. S.; PARK, M.; BLAIR, D. G.; TAINSKY, M. A.; HUEBNER, K.; CROCE, C. M.; VANDE WOUDE, G. F.** Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature*, 1984, vol. 311, 29-33 [0198]

- **DANILKOVITCH, A.; MILLER, M.; LEONARD, E. J.** Interaction of macrophage-stimulating protein with its receptor. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 29937-29943 [0198]
- **DANILKOVITCH-MIAGKOVA, A.; ZBAR, B.** Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *J. Clin. Invest.*, 2002, vol. 109, 863-867 [0198]
- **DATE et al.** *FEBS Lett.*, 1997, vol. 420, 1-6 [0198]
- **DENNIS, M. S.; EIGENBROT, C.; SKELTON, N. J.; ULTSCH, M. H.; SANTELL, L.; DWYER, M. A.; O'CONNELL, M. P.; LAZARUS, R. A.** Peptide exosite inhibitors of factor VIIa as anticoagulants. *Nature*, 2000, vol. 404, 465-470 [0198]
- **DERKSEN, P. W.; KEEHNEN, R. M. J.; EVERS, L. M.; VAN OERS, M. H. J.; SPAARGAREN, M.; PALS, S. T.** Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signalling in multiple myeloma. *Blood*, 2002, vol. 99, 1405-1410 [0198]
- **DI CERA, E.; GUINTO, E. R.; VINDIGNI, A.; DANG, Q. D.; AYALA, Y. M.; WUYI, M.; TULINSKY, A.** The Na⁺ binding site of thrombin. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 22089-22092 [0198]
- **DICKINSON, C. D.; KELLY, C. R.; RUF, W.** Identification of surface residues mediating tissue factor binding and catalytic function of the serine protease factor VIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 14379-14384 [0198]
- **DONATE, L. E.; GHERARDI, E.; SRINIVASAN, N.; SOWDHAMINI, R.; APARICIO, S.; BLUNDELL, T. L.** Molecular evolution and domain structure of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGF1/MSP). *Protein Sci.*, 1994, vol. 3, 2378-2394 [0198]
- **DRAIN, J.; BISHOP, J. R.; HAJDUK, S. L.** Haptoglobin-related protein mediates trypanosome lytic factor binding to Trypanosomes. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 30254-30260 [0198]
- **GHERARDI, E.; YOUNES, M. E.; MIGUEL, R. N.; BLUNDELL, T. L.; LAMELE, L.; GOUGH, J.; BANDYOPADHYAY, A.; HARTMANN, G.; BUTLER, P. J.** Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, 12039-12044 [0198]
- **HARTMANN, G.; NALDINI, L.; WEIDNER, K. M.; SACHS, M.; VIGNA, E.; COMOGLIO, P. M.; BIRCHMEIER, W.** A functional domain in the heavy chain of scatter factor/hepatocyte growth factor binds the c-Met receptor and induces cell dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 11574-11578 [0198]
- **HARTMANN, G.; PROSPERO, T.; BRINKMANN, V.; OZCELIK, C.; WINTER, G.; HEPPLER, J.; BATTLE, S.; BLADT, F.; SACHS, M.; BIRCHMEIER, C. et al.** Engineered mutants of HGF/SF with reduced binding to heparan sulphate proteoglycans, decreased clearance and enhanced activity *in vivo*. *Curr. Biol.*, 1998, vol. 8, 125-134 [0198]
- **HEDSTROM, L.** Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.*, 2002, vol. 102, 4501-4523 [0198]
- **HUBER, R.; BODE, W.** Structural basis of the activation and action of trypsin. *Acc Chem. Res.*, 1978, vol. 11, 114-122 [0198]
- **KUNKEL, T. A.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 488-492 [0198]
- **KUROSUKI, A.; BARNETT, D. R.; LEE, T. H.; TOUCHSTONE, B.; HAY, R. E.; AMOTT, M. S.; BOWMAN, B. H.; FITCH, W. M.** Covalent structure of human haptoglobin: a serine protease homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 3388-3392 [0198]
- **LIJNEN, H. R.; VAN HOF, B.; NELLES, L.; COLLEN, D.** Plasminogen activation with single-chain urokinase-type plasminogen activator (scu-PA). Studies with active site mutagenized plasminogen (Ser740[®] Ala) and plasmin-resistant scu-PA (Lys158[®] Glu). *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 5232-5236 [0198]
- **LIN, C.-Y.; ANDERS, J.; JOHNSON, M.; SANG, Q. A.; DICKSON, R. B.** Molecular cloning of Cdna for matriptase, a matrix-degrading serine protease with trypsin-like activity. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 18231-18236
- **LOKKER, N. A.; MARK, M. R.; LUIS, E. A.; BENNETT, L.; ROBBINS, K. A.; BAKER, J. B.; GODOWSKI, J.** Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *EMBO J.*, 1992, vol. 11, 2503-2510 [0198]
- **LOKKER, N. A.; PRESTA, L. G.; GODOWSKI, P. J.** Mutational analysis and molecular modeling of the N-terminal kringle-containing domain of hepatocyte growth factor identifies amino acid side chains important for interaction with the c-Met receptor. *Protein Eng.*, 1994, vol. 7, 895-903 [0198]

• **MA, P. C.; MAULIK, G.; CHRISTENSEN, J.; SALGIA, R.** c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev.*, 2003, vol. 22, 309-325 [0198]

• **MALKOWSKI, M. G.; MARTIN, P. D.; GUZIK, J. C.; EDWARDS, B. F. P.** The co-crystal structure of unliganded bovine a-thrombin and prethrombin-2: movement of the Tyr-Pro-Pro-Trp segment and active site residues upon ligand binding. *Protein Sci.*, 1997, vol. 6, 1438-1448 [0198]

• **MARK, M. R.; LOKKER, N. A.; ZIONCHECK, T. F.; LUIS, E. A.; GODOWSKI, P. J.** Expression and characterization of hepatocyte growth factor receptor-IgG fusion proteins. Effects of mutations in the potential proteolytic cleavage site on processing and ligand binding. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 26166-26171 [0198]

• **MATSUMOTO, K.; TAKEHARA, T.; INOUE, H.; HAGIYA, M.; SHIMIZU, S.; NAKAMURA, T.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, vol. 181, 691-699 [0198]

• **MATSUMOTO, K.; KATAOKA, H.; DATE, K.; NAKAMURA, T.** Cooperative interaction between a- and b-chains of hepatocyte growth factor on c-Met receptor confers ligand-induced receptor tyrosine phosphorylation and multiple biological responses. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 22913-22920 [0198]

• **MAULIK, G.; SHRIKHANDE, A.; KIJIMA, T.; MA, P. C.; MORRISON, P. T.; SALGIA, R.** Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002, vol. 13, 41-59 [0198]

• **MILLER, M.; LEONARD, E. J.** Mode of receptor binding and activation by plasminogen-related growth factors. *FEBS Lett.*, 1998, vol. 429, 1-3 [0198]

• **MIYAZAWA, K.; SHIMOMURA, T.; KITAMURA, A.; KONDO, J.; MORIMOTO, Y.; KITAMURA, N.** Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 10024-10028 [0198]

• **NAKA, D.; ISHII, T.; YOSHIYAMA, Y.; MIYAZAWA, K.; HARA, H.; HISHIDA, T.; KITAMURA, N.** Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of single chain form to a heterodimer. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 20114-20119 [0198]

• **NAKAMURA, T.; NISHIZAWA, T.; HAGIYA, M.; SEKI, T.; SHIMONISHI, M.; SUGIMURA, A.; TASHIRO, K.; SHIMIZU, S.** Molecular cloning and expresión of human hepatocyte growth factor. *Nature*, 1989, vol. 342, 440-443 [0198]

• **NALDINI, L.; TAMAGNONE, L.; VIGNA, E.; SACHS, M.; HARTMANN, G.; BIRCHMEIER, W.; DAIKUHARA, Y.; TSUBOUCHI, H.; BLASI, F.; COMOGLIO, P. M.** Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J.*, 1992, vol. 11, 4825-4833 [0198]

• **OKIGAKI, M.; KOMADA, M.; UEHARA, Y.; MIYAZAWA, K.; KITAMURA, N.** Functional characterization of human hepatocyte growth factor mutants obtained by deletion of structural domains. *Biochemistry*, 1992, vol. 31, 9555-9561 [0198]

• **PARRY, M. A.; FERNANDEZ-CATALAN, C.; BERGNER, A.; HUBER, R.; HOPFNER, K. P.; SCHLOTT, B.; GUHRS, K. H.; BODE, W.** The ternary microplasmin-staphylokinase-microplasmin complex is a proteinase-cofactor-substrate complex in action. *Nat. Struct. Biol.*, 1998, vol. 5, 917-923 [0198]

• **PEEK, M.; MORAN, P.; MENDOZA, N.; WICKRAMASINGHE, D.; KIRCHHOFFER, D.** Unusual proteolytic activation of pro-hepatocyte growth factor by plasma kallikrein and coagulation factor XIa. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, 47804-47809 [0198]

• **PEISACH, E.; WANG, J.; DE LOS SANTOS, T.; REICH, E.; RINGE, D.** Crystal structure of the proenzyme domain of plasminogen. *Biochemistry*, 1999, vol. 38, 11180-11188 [0198]

• **PERONA, J. J.; CRAIK, C. S.** Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.*, 1995, vol. 4, 337-360 [0198]

• **RAWLINGS, N. D.; O'BRIEN, E.; BARRETT, A. J.** MEROPS: the protease database. *Nucl. Acid Res.*, 2002, vol. 30, 343-346 [0198]

• **RENATUS, M.; ENGH, R. A.; STUBBS, M. T.; HUBER, R.; FISCHER, S.; KOHNERT, U.** Lysine 156 promotes the anomalous proenzyme activity of tPA: X-ray crystal structure of single-chain human tPA. *EMBO J.*, 1997, vol. 16, 4797-4805 [0198]

• **RICHARDSON, J. L.; KROGER, B.; HOEFFKEN, W.; SADLER, J. E.; PEREIRA, P.; HUBER, R.; BODE, W.; FUENTES-PRIOR, P.** Crystal structure of the human a-thrombin-haemadin complex: an exosite II-binding inhibitor. *EMBO J.*, 2000, vol. 19, 5650-5660 [0198]

• **SHIMOMURA, T.; MIYAZAWA, K.; KOMIYAMA, Y.; HIRAOKA, H.; NAKA, D.; MORIMOTO, Y.; KITAMURA, N.** Activation of hepatocyte growth factor by two homologous proteases, blood-coagulation factor XIIIa and hepatocyte growth factor activator. *Eur J Biochem*, 1995, vol. 229, 257-261 [0198]

5 • **STUBBS, M.; BODE, W.** A player of many parts: The spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb. Res.*, 1993, vol. 69, 1-58 [0198]

10 • **TAKEUCHI, T.; SHUMAN, A.; CRAIK, C. S.** Reverse biochemistry: use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, vol. 96, 11054-11061 [0198]

• **TRUSOLINO et al.** *FASEB J.*, 1998, vol. 12, 1267-1280 [0198]

15 • **TRUSOLINO, L.; COMOGLIO, P. M.** Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nature Rev. Cancer*, 2002, vol. 2, 289-300 [0198]

• **TSIANG, M.; JAIN, A. K.; DUNN, K. E.; ROJAS, M. E.; LEUNG, L. L. K.; GIBBS, C. S.** Functional mapping of the surface residues of human thrombin. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 16854-16863 [0198]

20 • **VIJAYALAKSHMI, J.; PADMANABHAN, K. P.; MANN, K. G.; TULINSKY, A.** The isomorphous structures of prethrombin2, hirugen-, and PPACK-thrombin: changes accompanying activation and exosite binding to thrombin. *Protein Sci.*, 1994, vol. 3, 2254-2271 [0198]

25 • **WANG, D.; BODE, W.; HUBER, R.** Bovine chymotrypsinogen A: x-ray crystal structure analysis and refinement of a new crystal form at 1.8Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 1985, vol. 185, 595-624 [0198]

30 • **WANG, D.; JULIAN, F. M.; BREATHNACH, R.; GODOWSKI, P. J.; TAKEHARA, T.; YOSHIKAWA, W.; HAGIYA, M.; LEONARD, E. J.** Macrophage stimulating protein (MSP) binds to its receptor via the MSP b chain. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 16999-17004 [0198]

REIVINDICACIONES

1. Método de cribado o identificación de una sustancia que se une selectivamente a la cadena β activada del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), comprendiendo dicho método:

comparar (i) la unión de una sustancia candidata a una cadena β de HGF activada, con (ii) la unión de la sustancia candidata a una cadena β de HGF de referencia, donde dicha cadena β de referencia tiene una unión a c-met reducida en comparación con la cadena β de HGF activada,

con lo que una sustancia candidata que muestra mayor afinidad de unión por la cadena β de HGF activada que por la cadena β de HGF de referencia se selecciona como una sustancia que se une selectivamente a la cadena β de HGF activada.

2. Método según la reivindicación 1, donde la cadena β de referencia está contenida en un polipéptido HGF de cadena sencilla.

3. Método según la reivindicación 1, donde la cadena β de referencia está fusionada en su extremo N a una parte de la región C-terminal de la cadena β de HGF, donde la posición 494 (correspondiente a HGF humano de tipo salvaje) de la región C-terminal es un aminoácido diferente de arginina.

4. Método según la reivindicación 3, donde el aminoácido en la posición 494 es ácido glutámico.

5. Método según la reivindicación 3 ó 4, donde la parte de la región C-terminal de HGF comprende la secuencia de aminoácidos del resto 479 a 494 de HGF humano.

6. Método de cribado de una sustancia que bloquea la activación de c-met, comprendiendo dicho método cribar una sustancia que se une a c-met y que bloquea la unión específica de la cadena β de HGF a c-met.

7. Método según la reivindicación 6, donde la sustancia compite con la cadena β de HGF por la unión a c-met.

8. Uso de una sustancia que inhibe la unión específica de la cadena β de HGF a c-met, en la preparación de un medicamento para tratar una afección patológica asociada con la activación de c-met en un sujeto, donde la sustancia es:

- a) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 60% de identidad en la secuencia con la secuencia VDWVCFRDLGCDWEL;
- b) un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a dicha cadena β de HGF activada; o
- c) una combinación de los mismos,

donde la sustancia se une a la cadena β de HGF activada e inhibe la unión específica de dicha cadena β de HGF activada a c-met, y

donde la afección patológica es un cáncer, tumor, trastorno de proliferación celular, trastorno inmune o trastorno relacionado con la angiogénesis.

9. Sustancia que inhibe la unión específica de la cadena β de HGF a c-met, donde la sustancia es:

- a) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 60% de identidad en la secuencia con la secuencia VDWVCFRDLGCDWEL;
- b) un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a dicha cadena β de HGF activada; o
- c) una combinación de los mismos,

donde la sustancia se une a la cadena β de HGF activada e inhibe la unión específica de dicha cadena β de HGF activada a c-met, para tratar una afección patológica asociada con la activación de c-met en un sujeto, donde la afección patológica es un cáncer, tumor, trastorno de proliferación celular, trastorno inmune o trastorno relacionado con la angiogénesis.

10. Uso según la reivindicación 8 o sustancia según la reivindicación 9, donde la identidad en la secuencia de aminoácidos es de al menos el 70%, 80%, 90%, 95% o 98%.

ES 2 323 425 T3

11. Uso según la reivindicación 8 o sustancia según la reivindicación 9, donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos VDWVCFRDLGCDWEL o una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que se muestra en la Tabla 1 que consiste en:

5	V	D	W	I	C	F	R	D	I	G	C	D	W	V	V
	V	D	W	I	C	L	R	D	V	G	C	D	W	V	Q
	V	D	W	V	C	F	R	D	F	G	C	D	W	V	V
10	V	D	W	V	C	F	R	D	F	G	C	D	W	V	L
	V	D	W	V	C	F	R	D	F	G	C	D	W	V	H
	V	D	W	V	C	F	R	D	F	G	C	Y	W	E	Q
15	V	D	W	V	C	F	R	D	F	G	C	W	F	E	S
	V	D	W	V	C	F	R	D	H	G	C	E	Y	V	E
	V	D	W	V	C	F	R	D	I	G	C	D	W	V	L
20	V	D	W	V	C	F	R	E	F	G		D	W	V	L
	V	D	W	V	C	F	R	E	I	G	C	D	W	V	L
	V	D	W	V	C	F	R	G	I	G	C	D	W	V	L
25	V	D	W	V	C	L	R	D	I	G	C	D	W	V	P
	V	D	W	V	C	F	R	D	L	G	C	D	Y	E	H
	V	D	W	V	C	F	R	D	L	G	C	D	Y	V	L
30	V	D	W	V	C	F	R	E	L	G	C	D	W	V	V
	V	D	W	V	C	F	R	E	L	G	C	D	W	V	F
	V	D	W	V	C	F	R	D	M	G	C	Y	Y	E	L
35	V	D	W	V	C	F	R	D	M	G	C	D	W	V	L
	V	D	W	V	C	F	R	D	S	G	C	Y	Y	A	T
	V	D	W	V	C	F	R	D	T	G	C	D	W	V	L
40	V	D	W	V	C	F	R	D	V	G	C	D	W	V	Q
	V	D	W	V	C	F	R	D	V	G	C	D	W	V	L
	V	D	W	V	C	F	R	E	V	G	C	D	W	V	L
	V	D	W	V	C	F	R	D	V	G	C	D	W	V	M
45	V	D	W	V	C	F	R	D	Y	G	C	D	M	V	P
	V	D	W	V	C	F	R	D	V	G	C	D	W	V	Q
	V	D	W	V	C	F	R	D	Y	G	C	E	W	V	A
50	V	D	W	V	C	F	R	D	V	G	C	E	W	V	V
	V	N	W	V	C	F	R	D	I	G	C	D	W	V	L
	V	N	W	V	C	F	R	D	L	G	C	D	W	V	A
55	V	N	W	V	C	F	R	D	L	G	C	D	W	V	L
	V	N	W	V	C	F	R	D	L	G	C	D	W	V	P
	V	N	W	V	C	F	R	D	L	G	C	D	W	V	V
60	V	N	W	V	C	F	R	D	Q	G	C	D	W	V	L
	V	N	W	V	C	F	R	D	V	G	C	D	W	V	L
	V	N	W	V	C	F	R	E	L	G	C	D	W	V	L
65	V	N	W	V	C	L	R	D	V	G	C	D	W	V	L

ES 2 323 425 T3

12. Uso según la reivindicación 8 o sustancia según la reivindicación 9, donde el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos que se muestra en la reivindicación 11.

13. Uso según la reivindicación 8 o sustancia según la reivindicación 9, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, de cadena sencilla, quimérico, humanizado o humano.

14. Uso o sustancia según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer pancreático o glioblastoma.

15. Uso o sustancia según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, donde la sustancia se obtiene mediante cualquiera de los métodos según las reivindicaciones 1-5.

16. Método de cribado de un antagonista del receptor de HGF que bloquea la unión de HGF a su receptor, comprendiendo dicho método seleccionar una sustancia que se une a al menos uno de los restos 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 y/o 702 de la cadena β de HGF.

17. Método según la reivindicación 16, donde la sustancia se une a al menos los restos 673 a 695.

18. Método según la reivindicación 17, donde la sustancia también se une a al menos uno de los restos 534, 578 y 692.

19. Molécula que se une a la cadena β activada del factor de crecimiento de hepatocitos e inhibe la unión específica de dicha cadena β de HGF activada a c-met, donde dicha molécula es:

- a) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 60% de identidad en la secuencia con la secuencia VDWVCFRDLGCDWEL;
- b) un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a dicha cadena β de HGF activada; o
- c) una combinación de los mismos.

20. Molécula según la reivindicación 19, donde la identidad en la secuencia de aminoácidos es de al menos el 70%, 80%, 90%, 95% o 98%.

21. Molécula según la reivindicación 19, donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos VDWVCFRDLGCDWEL o una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que se muestra en la Tabla 1 que consiste en:

40	V	D	W	I	C	F	R	D	I	G	C	D	W	V	V
	V	D	W	I	C	L	R	D	V	G	C	D	W	V	Q
	V	D	W	V	C	F	R	D	F	G	C	D	W	V	V
45	V	D	W	V	C	F	R	D	F	G	C	D	W	V	L
	V	D	W	V	C	F	R	D	F	G	C	D	W	V	H
	V	D	W	V	C	F	R	D	F	G	C	Y	W	E	Q
50	V	D	W	V	C	F	R	D	F	G	C	W	F	E	S
	V	D	W	V	C	F	R	D	H	G	C	E	Y	V	E
	V	D	W	V	C	F	R	D	I	G	C	D	W	V	L
55	V	D	W	V	C	F	R	E	F	G	C	D	W	V	L
	V	D	W	V	C	F	R	E	I	G	C	D	W	V	L
60	V	D	W	V	C	F	R	G	I	G	C	D	W	V	L
	V	D	W	V	C	L	R	D	I	G	C	D	W	V	P
	V	D	W	V	C	F	R	D	L	G	C	D	Y	E	H
65	V	D	W	V	C	F	R	D	L	G	C	D	Y	V	L
	V	D	W	V	C	F	R	E	L	G	C	D	W	V	V

ES 2 323 425 T3

5 V D W V C F R E L G C D W V F
 V D W V C F R D M G C Y Y E L
 V D W V C F R D M G C D W V L
 V D W V C F R D S G C Y Y A T
 V D W V C F R D T G C D W V L
 10 V D W V C F R D V G C D W V Q
 V D W V C F R D V G C D W V L
 V D W V C F R E V G C D W V L
 15 V D W V C F R D V G C D W V M
 V D W V C F R D Y G C D M V P
 V D W V C F R D V G C D W V Q
 20 V D W V C F R D Y G C E W V A
 V D W V C F R D V G C E W V V
 V N W V C F R D I G C D W V L
 25 V N W V C F R D L G C D W V A
 V N W V C F R D L G C D W V L
 V N W V C F R D L G C D W V P
 30 V N W V C F R D L G C D W V V
 V N W V C F R D Q G C D W V L
 V N W V C F R D V G C D W V L
 35 V N W V C F R E L G C D W V L
 V N W V C L R D V G C D W V L

40 22. Molécula según la reivindicación 19, donde el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos que se muestra en la reivindicación 21.

45 23. Molécula según la reivindicación 19, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, de cadena sencilla, quimérico, humanizado o humano.

24. Molécula según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, donde la afinidad de unión de la molécula por la forma activada de la cadena es mayor que la afinidad de unión de la molécula por la cadena en forma de zimógeno.

50 25. Molécula según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, que se une al punto activo de la cadena β .

26. Molécula según la reivindicación 25, donde dicho punto activo comprende al menos uno de los restos 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 y/o 702 de la cadena β .

55 27. Molécula según la reivindicación 25, donde la cadena β activada tiene una conformación de cadena β obtenida mediante escisión de HGF de cadena sencilla.

28. Molécula según la reivindicación 27, donde dicha escisión es en o adyacente a los restos 494 y 495 del HGF de cadena sencilla.

60 29. Molécula según la reivindicación 28, donde dicha escisión se produce entre los restos 494 y 495 del HGF de cadena sencilla.

30. Moléculas según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, donde la unión de dicha molécula a la cadena β activada inhibe la activación de c-met por HGF.

65 31. Molécula según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, donde la unión de dicha molécula a la cadena β activada inhibe la proliferación celular inducida por HGF.

ES 2 323 425 T3

32. Molécula según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, donde la unión de dicha molécula a la cadena β activada inhibe la dimerización del receptor c-met.

33. Molécula según cualquiera de las reivindicaciones 19-32, que se obtiene mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y 16-18.

34. Molécula según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 33, para uso en un método de tratamiento de una afección patológica asociada con la activación de c-met en un sujeto.

35. Molécula según la reivindicación 34, donde la afección patológica es un cáncer, tumor, trastorno de proliferación celular, trastorno inmune o trastorno relacionado con la angiogénesis.

36. Moléculas según la reivindicación 35, donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer pancreático o glioblastoma.

37. Composición que comprende una molécula según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 36, en combinación con un portador.

38. Composición según la reivindicación 37, donde el portador es un portador farmacéuticamente aceptable.

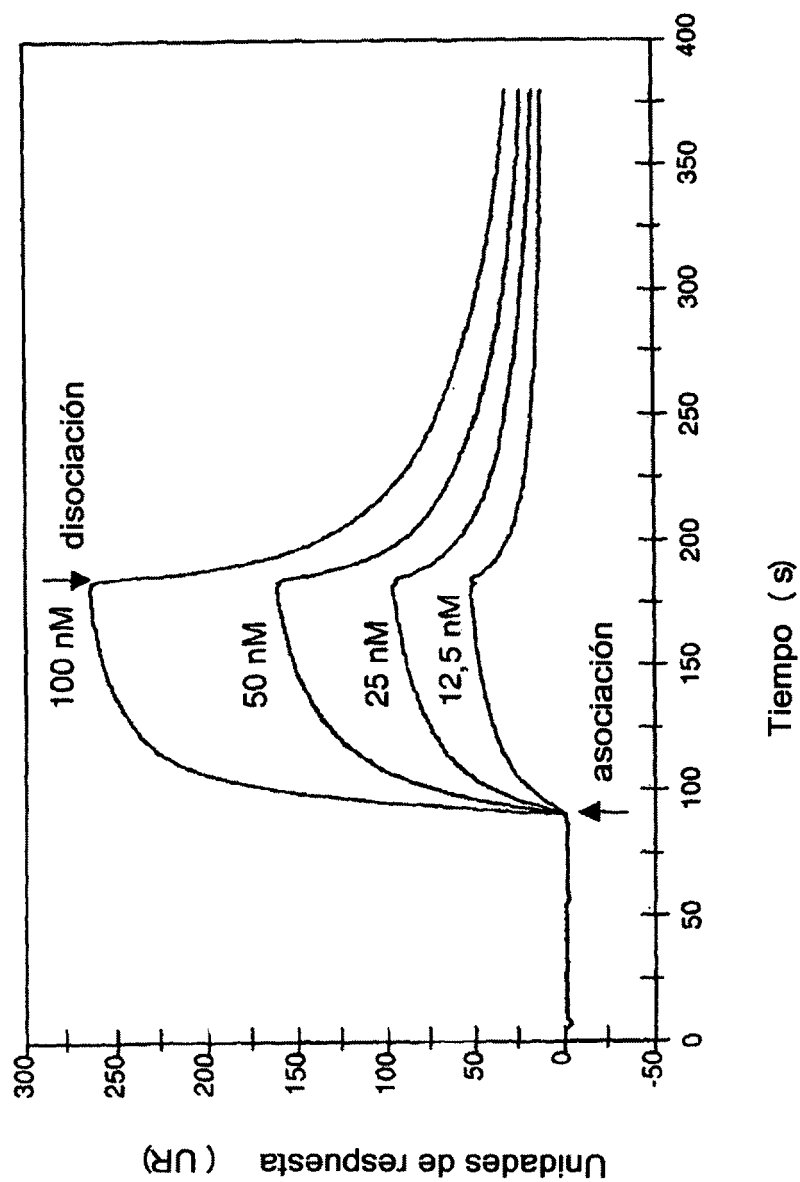


FIG._1A

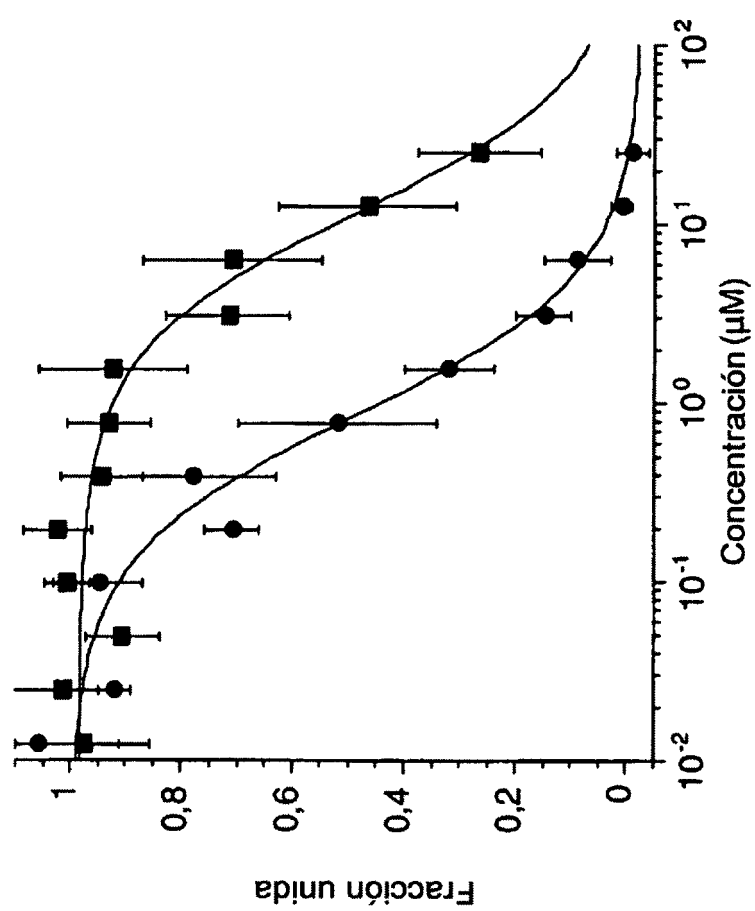


FIG._1B

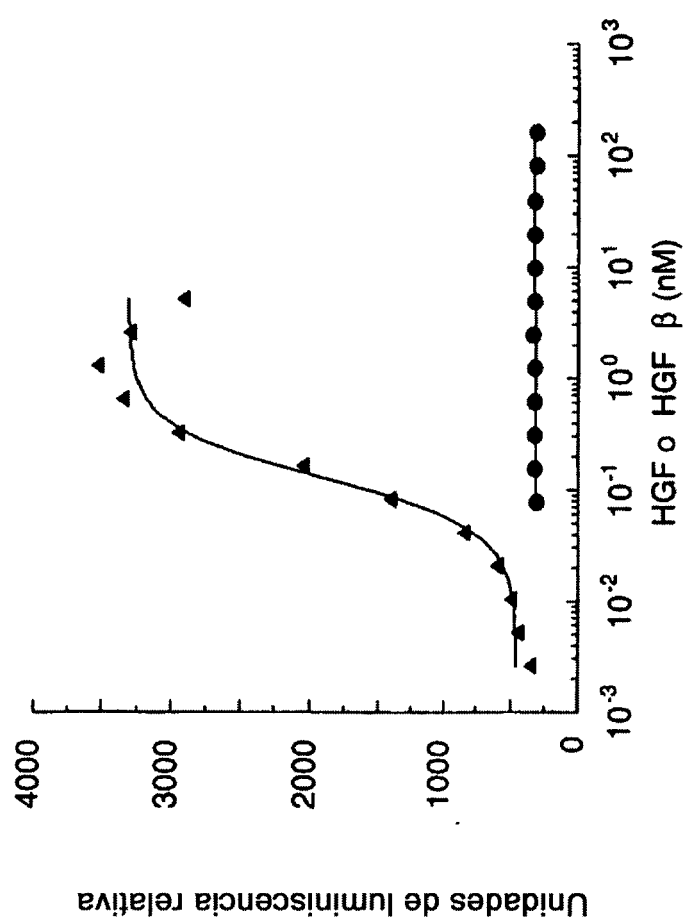


FIG._1C

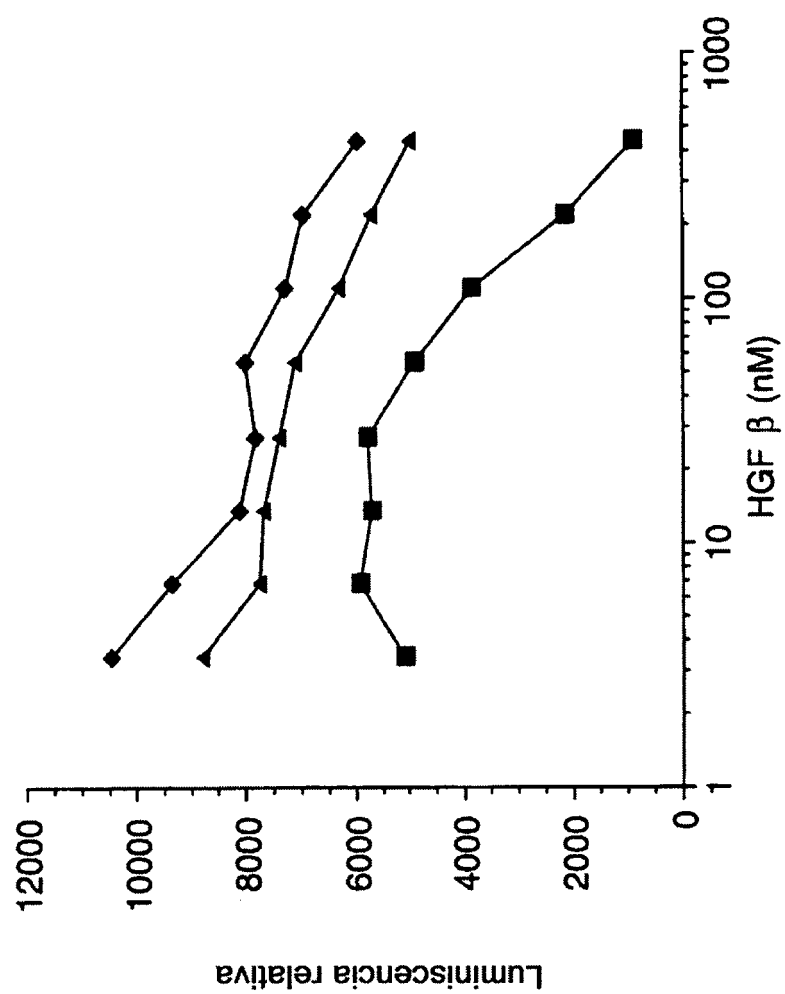


FIG._1D

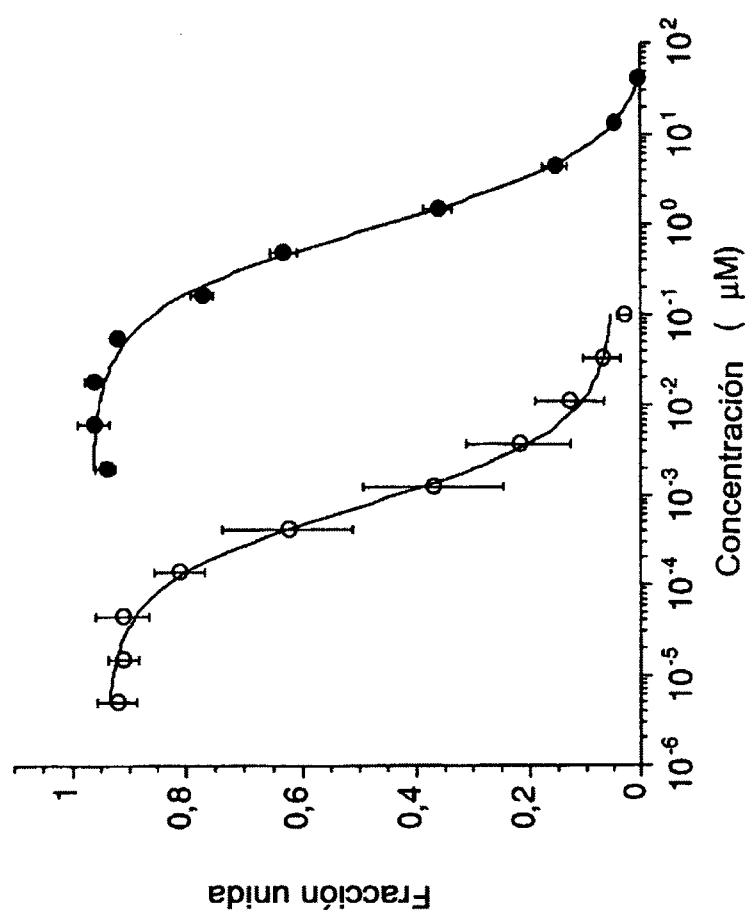
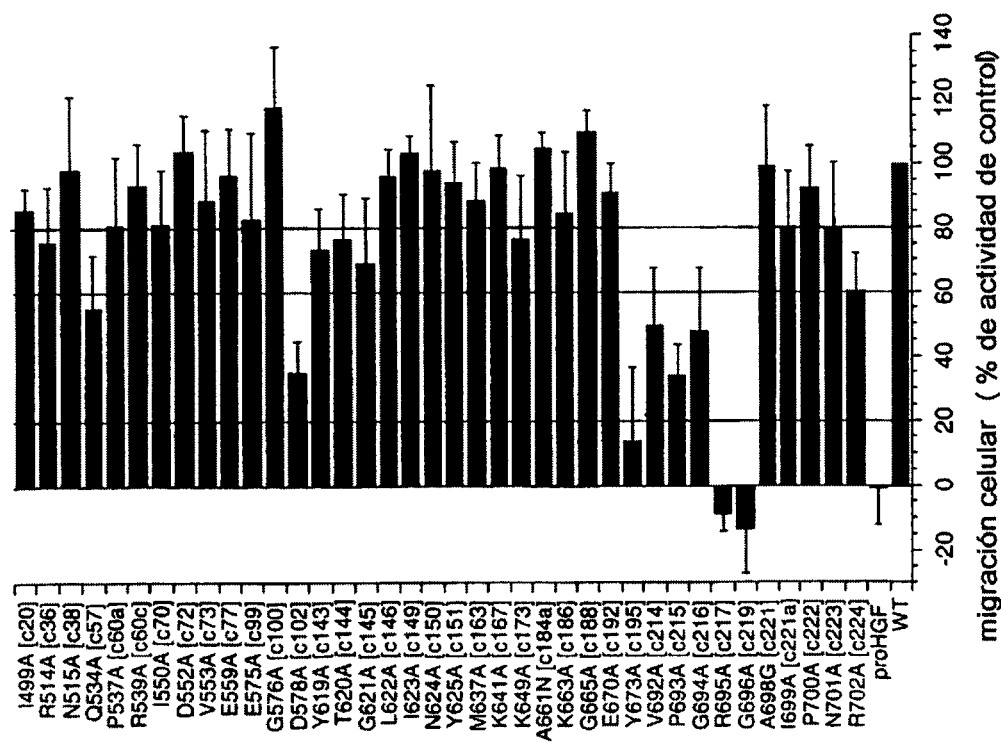


FIG._1E



FIG._2A

FIG. 2B



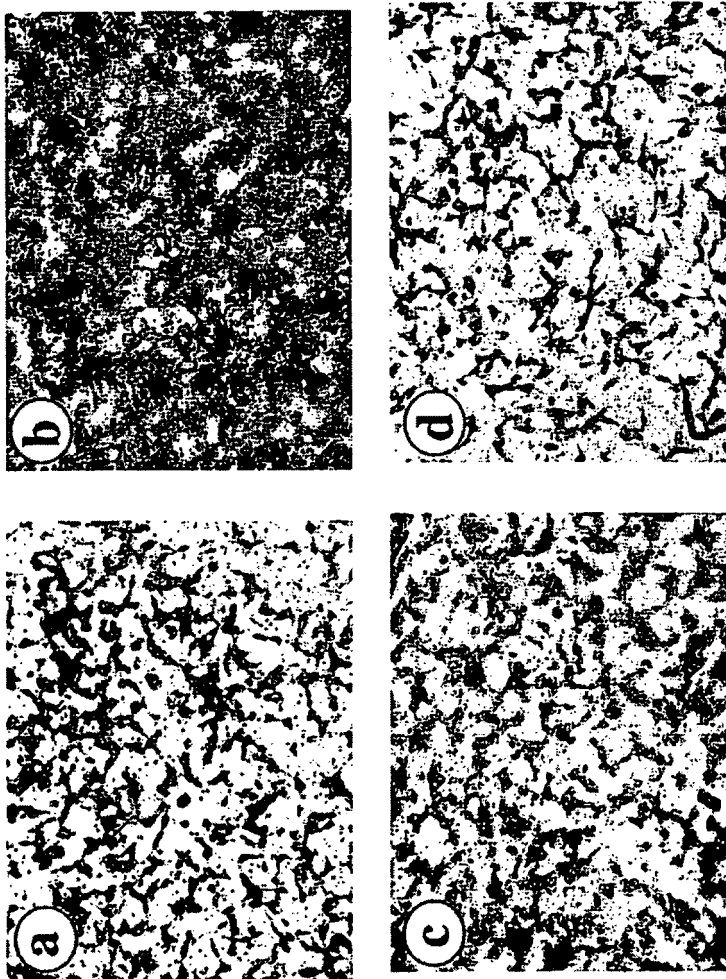


FIG._2C

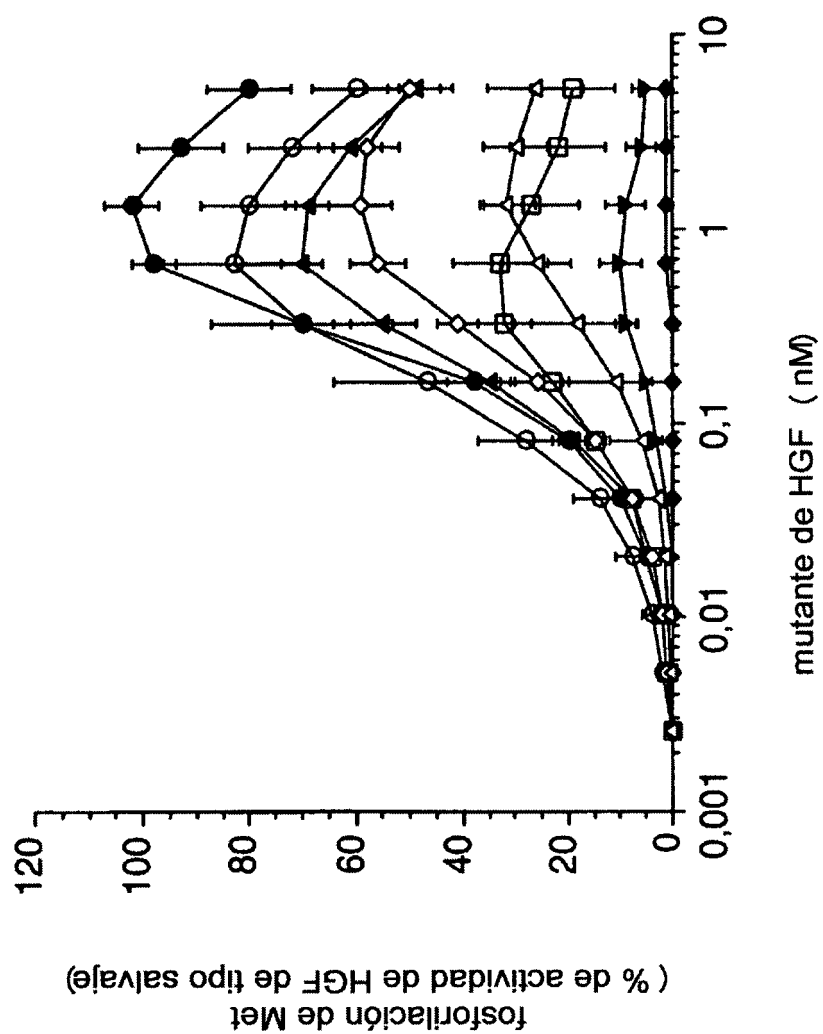


FIG._3

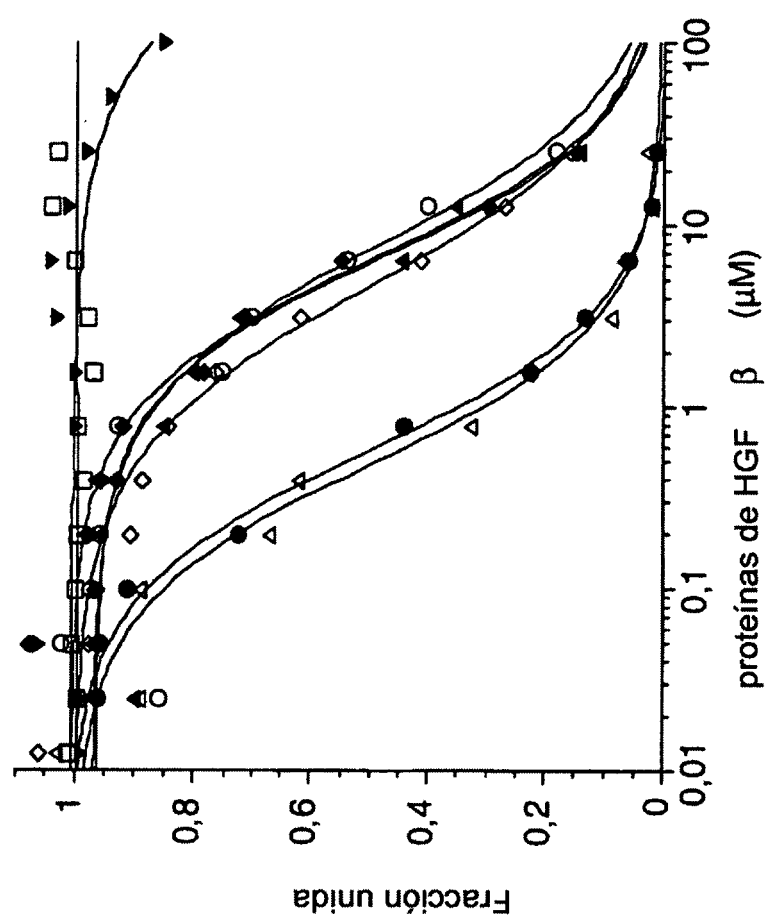


FIG._4

FIG._5

mutante	mutante de HGF β Afinidad de unión relativa ^a (Cl_{50} mutante/ Cl_{50} HGF β) $\pm$ SD	mutante de HGF de 2 cadenas de longitud completa. Porcentaje de reducción $\pm$ SD de actividad pro-migratoria ^b
Y513A [c36]	2,04 $\pm$ 0,48	n.d. ^c
R516A [c39]	3,03 $\pm$ 0,48	2 $\pm$ 15
Q534A [c57]	12,5 $\pm$ 3,6	45 $\pm$ 16
D578A [c102]	16,6 $\pm$ 8,2	65 $\pm$ 9
Y619A [c143]	5,1 $\pm$ 0,2	27 $\pm$ 13
Y673A [c195]	>100	86 $\pm$ 9
V692A [c214]	>50	51 $\pm$ 18
P693A [c215]	n.d. ^c	66 $\pm$ 9
P693D [c215]	>100	n.d. ^c
G694A [c216]	n.d. ^c	52 $\pm$ 20
G694E [c216]	>100	n.d. ^c
R695A [c217]	>100	109 $\pm$ 14
G696A [c219]	>100	114 $\pm$ 14
I699A [c221a]	8,05 $\pm$ 1,5	20 $\pm$ 17
R702A [c224]	>25	40 $\pm$ 12
HGF β WT ^d	0,79 $\pm$ 0,16	0
proHGF ^e	23,5 $\pm$ 10,0	101 $\pm$ 12
C561S ^f	0,85 $\pm$ 0,17	n.d. ^c

^a determinada usando el ELISA de unión competitiva de HGF β /Met.

^b con respecto a la actividad de HGF de 2 cadenas de tipo salvaje (=100%) en ensayo de migración celular.

^c no determinado.

^d se refiere a WT C604 para HGF β y WT de dos cadenas para HGF de longitud completa.

^e se refiere a R494E para HGF β y R424:R494E para HGF de longitud completa.

^f se refiere al mutante C561S:C604S para HGF β

. FIG._6A

Proteínas de HGF de 2 cadenas	100 ng/ml de proteína			25 ng/ml de proteína		
	% de actividad	SD	n	% de actividad	SD	n
HGF WT	100.0	0.0	9	100.0	13.0	12
Q534A	87.8	10.1	4	109.6	13.8	4
D578A	72.5	18.0	5	96.9	11.5	4
Y673A	49.1	12.0	8	76.6	12.1	7
V692A	84.0	8.9	4	106.2	9.7	5
R695A	28.9	21.0	7	38.6	30.2	7
G696A	10.6	9.8	8	21.8	15.9	6
R424A:494E	-16.7	3.4	3	-5.5	18.8	3

FIG._6B

Proteínas de HGF	Actividad relativa	% de actividad I	% de actividad II	n
Sin HGF	1.0	0		2
HGF WT	1.95	100	100	2
R695A	0.85	-16	0	2
R695A + HGF WT	1.2	21	32	2
R424A:494E	1.15	16	0	2
R424A:494E + HGF WT	1.35	37	25	2

FIG._7

mutante de HGF	Cl ₅₀ mut/Cl ₅₀ WT ± SD	mutante de HGF	Cl ₅₀ mut/Cl ₅₀ WT ± SD
I499A [c20]	0.52	M637A [c163]	1.38
R514A [c36]	1.41 ± 0.23	K641A [c167]	1.04
N515A [c38]	1.16	K649A [c173]	3.66
Q534A [c57]	2.04 ± 0.86	A661N [c184a]	1.04 ± 0.34
P537A [c60a]	1.67	K663A [c186]	0.73 ± 0.20
R539A [c60c]	0.94	G665A [c188]	0.36 ± 0.03
I550A [c70]	1.39	E670A [c192]	1.77
D552A [c72]	1.23	Y673A [c195]	4.41 ± 1.03
V553A [c73]	0.99 ± 0.26	V692A [c214]	1.74 ± 0.16
E559A [c77]	1.34 ± 0.07	P693A [c215]	1.37 ± 0.46
E575A [c99]	1.19 ± 0.05	G694A [c216]	1.76 ± 0.72
G576A [c100]	0.78	R695A [c217]	1.48 ± 0.52
D578A [c102]	1.86 ± 0.82	G696A [c219]	2.03 ± 1.04
Y619A [c143]	1.52 ± 0.28	A698G [c221]	0.73 ± 0.35
T620A [c144]	1.89 ± 0.32	I699A [c221a]	1.79 ± 0.70
G621A [c145]	1.08 ± 0.30	P700A [c222]	1.30 ± 0.46
L622A [c146]	1.04 ± 0.22	N701A [c223]	1.48 ± 0.59
I623A [c149]	0.49 ± 0.10	R702A [c224]	2.25
N624A [c150]	0.71 ± 0.18	proHGF	4.03 ± 1.05
Y625A [c151]	0.65 ± 0.26	wildtype HGF ^a	1

^aHGF de 2 cadenas de tipo salvaje tenía una Cl₅₀ = 0.83 ± 0.32 nM (n=30) en el ELISA de unión competitiva de HGF/Met.

Mutante	actividad pro-migratoria a 1 nM	actividad pro-migratoria a 10 nM	actividad pro-migratoria a 50 nM
	(% de control)	(% de control)	(% de control)
Y673A	13,9 ± 8,9	9,8 ± 8,3	9,1 ± 8,6
V692A	49,5 ± 17,7	20,9 ± 6,9	29,8 ± 6,3
G694A	47,6 ± 19,7	23,2 ± 11,4	21,2 ± 5,9
R695A	-8,9 ± 5,4	-4,4 ± 11,6	5,3 ± 10,2
G696A	-13,6 ± 13,7	4,0 ± 19,8	2,8 ± 7,1

FIG._8

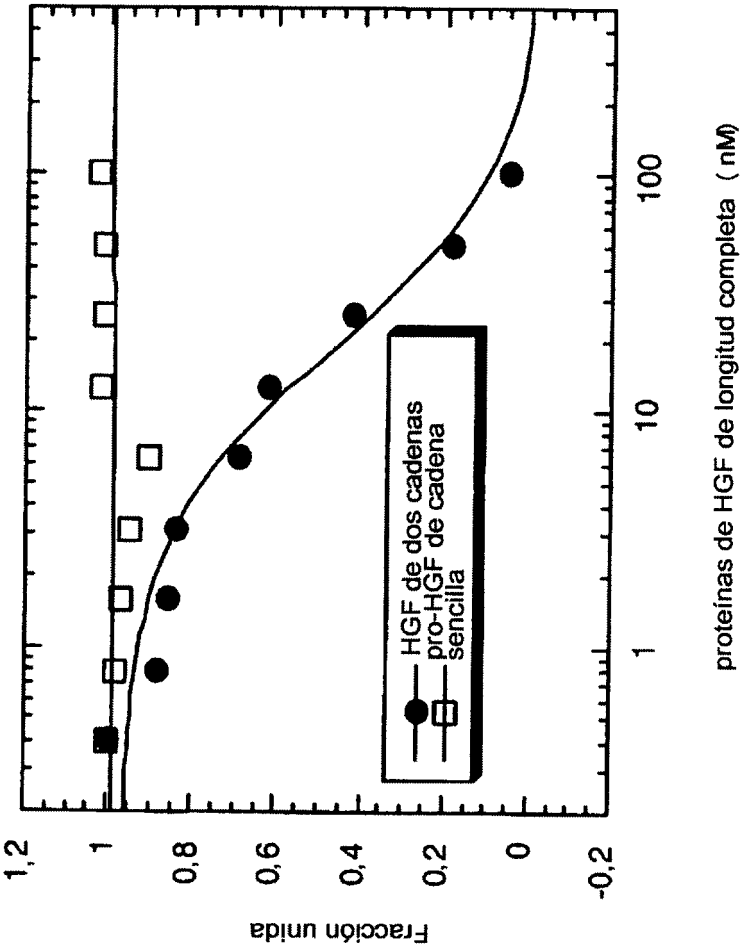


FIG._9