

(11) Número de Publicação: **PT 1636593 E**

(51) Classificação Internacional:

G01N 33/74 (2007.10) **G01N 33/68** (2007.10)
C07K 7/08 (2007.10) **A61K 38/00** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2004.06.04	(73) Titular(es): GENENTECH, INC. 1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990 US
(30) Prioridade(s): 2003.06.06 US 476778 P 2003.12.23 US 532117 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2006.03.22	(72) Inventor(es): ROBERT A. LAZARUS US DANIEL K. KIRCHHOFER US XIAOYI YAO US
(45) Data e BPI da concessão: 2009.03.24 107/2009	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MODULAÇÃO DA INTERACÇÃO ENTRE A CADEIA BETA DE HGF E C-MET**

(57) Resumo:

RESUMO**"Modulação da interacção entre a cadeia beta de HGF e C-MET"**

Actividades pró-migratórias de mutantes de HGF a diferentes concentrações

Mutante	Actividade pró-migratória a 1 nM (% do controlo)	Actividade pró-migratória a 10 nM (% do controlo)	Actividade pró-migratória a 50 nM (% do controlo)
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

O invento proporciona métodos e composições para modular a via de sinalização HGF/c-met, em particular por regulação da ligação da cadeia β de HGF a c-met.

DESCRIÇÃO

"Modulação da interacção entre a cadeia beta de HGF e C-MET"

CAMPO TÉCNICO

O presente invento refere-se na generalidade aos campos da biologia molecular e da regulação de factores de crescimento. Mais especificamente, o invento refere-se a moduladores da via de sinalização HGF/c-met e utilizações dos referidos moduladores.

ANTECEDENTES

O factor de crescimento de hepatócitos (HGF), também conhecido como factor de dispersão (SF), é o ligando para Met (Bottaro *et al.*, 1991), uma tirosina-quinase receptora codificada pelo proto-oncogene *c-met* (Cooper *et al.*, 1984a e b). A ligação de HGF a Met induz fosforilação do domínio intracelular da quinase resultando na activação de um conjunto complexo de vias intracelulares que levam ao crescimento, diferenciação e migração celulares numa variedade de tipos de células; várias revisões publicadas recentemente proporcionam uma apreciação abrangente (Birchmeier *et al.*, 2003; Trusolino e Comoglio, 2002; Maulik *et al.*, 2002). Além da sua importância fundamental no desenvolvimento embrionário e regeneração de tecidos, a via de sinalização HGF/Met foi também implicada no crescimento tumoral invasivo e metástases e como tal representa um alvo terapêutico interessante (Birchmeier *et al.*, 2003; Trusolino e Comoglio, 2002; Danilkovitch-Miagkova e Zbar, 2002; Ma *et al.*, 2003).

O HGF pertence à família de factores de crescimento relacionados com plasminogénio e inclui uma cadeia α de 69 kDa contendo o domínio de *dedo* no terminal N (N) e quatro domínios *Kringle* (K1-K4) e uma cadeia β de 34 kDa que tem forte similaridade com os domínios de protease de serina-proteases semelhantes à quimiotripsina do clã PA(S)/família S1 (Nakamura *et al.*, 1989; Donate *et al.*, 1994; Rawlings *et al.*, 2002). Tal como o plasminogénio e outros zimogénios de serina-protease, o HGF é excretado sob a forma de um precursor de cadeia única (schGF). O schGF liga-se a proteoglicanos de sulfato de

heparano, tal como sindecano-1 (Derksen *et al.*, 2002) nas superfícies celulares ou na matriz extracelular. Os proteoglicanos de sulfato de heparano ligam-se ao domínio N (Hartmann *et al.*, 1998), que também contribui para a elevada afinidade de ligação a Met conjuntamente com aminoácidos localizados em K1 (Lokker *et al.*, 1994). Embora scHGF seja capaz de se ligar a Met com elevada afinidade, não consegue activar o receptor (Lokker *et al.*, 1992; Hartmann *et al.*, 1992). A aquisição de actividade de sinalização de HGF ocorre por clivagem proteolítica (activação) de scHGF em Arg494-Val495 resultando na formação de HGF maduro, um heterodímero α/β ligado por dissulfureto (Lokker *et al.*, 1992; Hartmann *et al.*, 1992; Naldini *et al.*, 1992).

US-A-5 879 910 descreve variantes de factor de crescimento de hepatócitos (HGF) que incluem uma alteração de aminoácido num local no interior do domínio de protease de HGF e que mantêm substancialmente a afinidade de ligação para com o receptor completo do HGF de tipo selvagem correspondente.

Lokker *et al.* (1992), aqui mencionado, descreve que determinadas mutações no domínio do tipo protease de HGF (nas posições Y673 e V692) resultam em variantes que são deficientes em actividade mitogénica, mas apresentam afinidades de ligação ao receptor aparentes semelhantes ao HGF de tipo selvagem.

Matsumoto *et al.* (1991), também aqui mencionado, também descreve HGF mutantes, nos quais se substituiu Q534 e/ou Y673 respectivamente por His e Ser.

O domínio do tipo protease de HGF (cadeia β de HGF) é isento de actividade catalítica dado que não contém a necessária tríade catalítica Asp [c102]-His [c57]-Ser [c195] (numeração padrão de quimiotripsinogénio, sempre entre parêntesis rectos) encontrada em todas as serina-proteases (Perona e Craik, 1995; Hedstrom, 2002), com um Gln534 [c57] e Tyr673 [c195].

Dada a importância da regulação da actividade de HGF, este processo deve ser controlado com rigor por enzimas de conversão de HGF e pelos seus correspondentes inibidores

fisiológicos. A activação de scHGF é mediada *in vitro* por serina-proteases do tipo quimiotripsina incluindo activador de factor de crescimento de hepatócitos (HGFA) (Miyazawa *et al.*, 1993), matriptase/MT-SP1 (Takeuchi *et al.* 1999; Lin *et al.*, 1999), activador de plasminogénio do tipo uroquinase (Naldini *et al.*, 1992), factor XIIa (Shimomura *et al.*, 1995), factor XIa (Peek *et al.*, 2002) e calicreína plasmática (Peek *et al.*, 2002). De forma semelhante a scHGF, estas proteases são produzidas como precursores inactivos; as suas actividades enzimáticas são também reguladas rigorosamente por outras proteases de activação e inibidores de tipo Kunitz e de tipo serpina.

Foram descritas serina-proteases e seus processos de activação (Donate *et al.*, 1994). Em serina-proteases, a clivagem de activação do zimogénio efectua um rearranjo conformacional do denominado domínio de activação, dando origem a um local activo formado correctamente e a região de interacção substrato/inibidor. O domínio de activação é constituído por três ansas expostas à superfície denominadas ansas [c140], [c180] e [c220] e inserção do terminal N formado de novo numa bolsa hidrófoba (Huber e Bode, 1978). Na proteína estimuladora de macrófagos de par ligando/receptor homóloga (MSP)/Ron, a cadeia β de MSP do tipo serina-protease proporciona a energia principal para a ligação a receptor (Wang *et al.*, 1997; Miller e Leonard, 1998). Tal é inverso do sistema HGF/Met em que o local de ligação ao receptor de elevada afinidade para com Met está localizado na cadeia α de HGF (Lokker, *et al.*, 1994; Okigaki *et al.*, 1992).

DIVULGAÇÃO DO INVENTO

O factor de crescimento de hepatócitos (HGF), um factor de crescimento relacionado com plasminogénio, liga-se ao seu receptor tirosina-quinase Met (também aqui denominado c-met ou c-met), que está implicado no desenvolvimento, regeneração de tecidos e crescimento de tumores invasivos. A expressão e purificação bem sucedidas da cadeia β do tipo protease de HGF, que é aqui descrita, permitiram uma determinação definitiva da natureza da interacção de HGF, especificamente da cadeia β de HGF, com c-met, que levou a uma compreensão mais clara do mecanismo para activação de c-met. Demonstra-se aqui

empiricamente que a cadeia β de HGF do tipo serina-protease se liga a Met. Comparativamente, a forma do tipo zimogénio de HGF β tem uma ligação a Met muito mais fraca, o que sugere que as interacções óptimas resultam de alterações conformacionais após processamento. Um painel de mutantes da cadeia β ensaiados em migração celular, fosforilação de Met, proliferação celular dependente de HGF e ensaios de ligação de Met demonstrou que a actividade biológica reduzida dos mutantes de HGF completo é devida pelo menos em parte a ligação reduzida da cadeia β de HGF a Met. O local de ligação funcional inclui o "domínio de activação" e "região de local activo", semelhante ao local de processamento de substrato de serina-proteases. Os dados indicam que a cadeia β activada (mas não a forma tipo zimogénio) pode incluir uma interface necessária para interacção óptima com outra molécula, tal como outra cadeia β de HGF, de modo a efectuar activação máxima/óptima de c-met. As análises de mutação aqui descritas proporcionam uma base para concepção de mutantes de HGF capazes de inibir a interacção de HGF de tipo selvagem/c-met em toda uma gama de potências. São aqui descritos exemplos de tais mutantes. Estes mutantes são capazes de competir com HGF de tipo selvagem para ligação a c-met, apresentando porém capacidade reduzida para efectuar funções biológicas associadas a c-met. Tal é particularmente vantajoso quando é indesejável inibição completa ou substancial do eixo HGF/c-met; tal é especialmente importante porque HGF e c-met são expressas de forma ubíqua em células e tecidos normais. Estes mutantes podem também ser utilizados como agentes terapêuticos vantajosos para tratar condições patológicas em que é desejável actividade biológica reduzida de HGF/c-met, mas não a sua ausência completa. O método e composições do invento baseiam-se na generalidade nestas revelações, que são descritas mais detalhadamente em seguida. Demonstra-se que a cadeia β de HGF e a sua interacção com c-met pode ser um alvo único e vantajoso para maior precisão na concepção de abordagens profiláticas e/ou terapêuticas contra condições patológicas associadas a sinalização anómala ou indesejável da via HGF/c-met. Assim, o invento proporciona métodos, composições, kits e artigos de fabrico para identificar e utilizar substâncias que são capazes de modular a via HGF/c-met através de modulação da ligação da cadeia β de HGF a

c-met e para modulação de actividades biológicas/fisiológicas associadas a sinalização HGF/c-met.

Assim, num aspecto, o invento proporciona um método de rastreio (ou de identificação) de uma substância que liga selectivamente a cadeia β de factor de crescimento de hepatócitos activada, em que o referido método inclui: (a) comparação (i) de ligação de uma substância candidata a uma cadeia β de HGF activada (tal como descrito mais detalhadamente em seguida), com (ii) ligação da substância candidata com uma cadeia β de HGF de referência, em que a referida cadeia β de referência não é capaz de ligação específica e/ou ligação substancial a c-met; pelo qual uma substância candidata que apresenta afinidade de ligação maior à cadeia β de HGF activada do que à cadeia β de HGF de referência é seleccionada (ou identificada) como uma substância que se liga selectivamente à cadeia β de HGF activada, tal como definido nas reivindicações. Em algumas concretizações, a cadeia β de referência está contida em polipéptidos de HGF de cadeia única. Em algumas concretizações, a cadeia β de referência está fundida no seu terminal N a uma parte da região do terminal C de uma cadeia α de HGF, em que a posição 494 (correspondente a HGF humano de tipo selvagem) da região do terminal C é um aminoácido diferente de arginina (e.g., ácido glutâmico). Em algumas concretizações, a parte da região do terminal C da cadeia α de HGF inclui, consiste ou consiste essencialmente da sequência de aminoácidos do resíduo 479 ao 494 do HGF humano.

Noutro aspecto, o invento proporciona um método de rastreio para uma substância que bloqueia activação de c-met, em que o referido método inclui rastreio para uma substância que se liga (de preferência, mas não necessariamente, especificamente) a c-met e bloqueia ligação específica da cadeia β de HGF a c-met. Em algumas concretizações, a substância compete com a cadeia β de HGF para ligação a c-met. Numa concretização, a substância inclui, consiste ou consiste essencialmente de uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% de similaridade ou identidade de sequência relativamente à cadeia β de HGF de tipo selvagem (e.g., humana), e.g., cadeia β humana incluindo os resíduos de aminoácidos 495(Val) a 728(Ser) (e.g., a

cadeia β de HGF de tipo selvagem tal como aqui descrita). Em algumas concretizações em que a substância inclui, consiste ou consiste essencialmente de tal sequência de aminoácidos, a posição 604 e/ou 561 é um aminoácido diferente de cisteína. Em algumas destas concretizações, a substância não é substancialmente capaz de formar uma ligação (covalente ou não covalente) com a cadeia α de HGF ou uma sua parte.

Em algumas concretizações de métodos de rastreio (identificação) do invento, os métodos incluem determinar a afinidade de ligação de uma substância candidata relativamente a um antigénio alvo que inclui, consiste ou consiste essencialmente de uma parte ou de toda a cadeia β de HGF numa forma de ocorrência natural ou numa forma variante. Tais antigénios alvo podem incluir qualquer polipéptido que inclui, consiste ou consiste essencialmente de uma sequência de aminoácidos da cadeia β de HGF, incluindo pelo menos uma mutação (em particular quando a referida pelo menos uma mutação resulta numa alteração da capacidade da cadeia β de HGF se ligar a c-met). Em algumas concretizações, os polipéptidos incluem, consistem ou consistem essencialmente de uma sequência de aminoácidos da cadeia β de HGF (quer de tipo selvagem, quer incluindo pelo menos uma mutação) fundida a uma sequência polipeptídica heteróloga (tal como uma parte ou toda a cadeia α de HGF). Os exemplos de tais cadeias β de HGF incluem as aqui descritas, e.g., cadeia β de HGF do tipo zimogénio (e.g., mutação na posição 494), mutantes de cadeia β de HGF (Cys⁶⁰⁴Ser) e da "região de local activo". São aqui descritos mutantes de HGF com uma mutação em uma ou mais posições na cadeia β (incluindo mutações na região de local activo), tais como as posições 534, 578, b19, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 e/ou 702. Outros mutantes que são descritos incluem os que têm mutações dentro de HGF que os tornam incapazes de ser activados (e.g., clivados) *in vitro* ou *in vivo*; um exemplo de tal mutante inclui uma mutação nas posições 424 e/ou 494.

Num outro aspecto, o invento proporciona um método de rastreio para um antagonista do receptor de HGF que bloqueia a ligação de HGF ao seu receptor (e.g., a ligação de HGF a uma primeira molécula de receptor e/ou a ligação de HGF, e.g. através de uma ou ambas as cadeias α e β , a uma segunda

molécula de receptor para dimerização do receptor), em que o referido método inclui selecção de uma substância que se liga pelo menos a um, dois, três, quatro ou qualquer número até todos os resíduos 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 e/ou 702 da cadeia β de HGF. As combinações de dois ou mais resíduos podem incluir qualquer dos resíduos 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 e/ou 702 da cadeia β de HGF. Numa concretização, a substância liga-se a pelo menos um ou ambos os resíduos 673 e 695. Noutra concretização, a substância liga-se a (i) pelo menos um ou ambos os resíduos 673 e 695 e (ii) resíduo 692. Noutra concretização, a substância liga-se a (i) pelo menos um ou ambos os resíduos 673 e 695 e (ii) resíduo 692 e (iii) pelo menos um ou ambos os resíduos 534 e 578. Noutra concretização, a substância liga-se a (i) pelo menos um ou ambos resíduos 673 e 695 e (ii) pelo menos um, dois ou todos os resíduos 534, 578 e 692. Noutra concretização, a substância liga-se a (i) pelo menos um, ambos ou todos os resíduos 673, 695 e 696 e (ii) pelo menos um, ambos ou qualquer número até todos os resíduos 534, 578, 692 e 694. Numa concretização, a substância liga-se a cadeia β de HGF em que se ocorrer uma mutação na posição 534, 673 e/ou 692, a referida cadeia β também inclui uma mutação em pelo menos uma, ambas ou qualquer número até todas as posições 578, 694, 695 e 696. Em algumas concretizações destas moléculas, a cadeia β activada tem uma conformação de cadeia β obtida por clivagem de HGF de cadeia única; e em algumas destas concretizações, a referida clivagem é nos resíduos 494 e 495 ou em locais adjacentes em HGF de cadeia única, e.g., a referida clivagem pode ocorrer entre os resíduos 494 e 495 de HGF de cadeia única. Numa concretização, a substância liga-se a pelo menos um dos resíduos 673, 693, 694, 695 e 696. Numa concretização, a substância liga-se a pelo menos um dos resíduos 692 e 702. Numa concretização, a substância liga-se a pelo menos um dos resíduos 534 e 578. Numa concretização, a substância liga-se a pelo menos um dos resíduos 513, 516, 619 e 699. Numa concretização, a substância liga-se a dois ou mais resíduos seleccionados do grupo que consiste num primeiro grupo que consiste dos resíduos 673, 693, 694, 695 e 696, um segundo grupo que consiste dos resíduos 692 e 702, um terceiro grupo que consiste dos resíduos 534 e 578 e um quarto grupo que consiste dos resíduos 513, 516, 619 e 699. Os referidos dois ou mais resíduos podem ser seleccionados do mesmo grupo

ou de uma combinação de qualquer dos 4 grupos. Em algumas concretizações, a substância liga-se adicionalmente ao resíduo 423, 424, 494 e/ou 495.

Tal como seria evidente para um perito na arte, os ensaios de rastreio consistentes com os descritos anteriormente podem também incluir uma primeira etapa de rastreio baseada numa leitura funcional, para obter um primeiro conjunto de substâncias moduladoras candidatas, seguida por uma segunda etapa de rastreio baseada na capacidade do primeiro conjunto de substâncias moduladoras candidatas para modular a ligação de HGF β a c-met. Uma leitura funcional pode ser qualquer que seja evidente para um perito na arte, com base num conhecimento das actividades biológicas associadas à via de sinalização HGF/c-met. Estas actividades biológicas incluem, entre outras, fosforilação de C-met, fosforilação de moléculas celulares que são substratos de quinases C-met, crescimento celular (proliferação, sobrevivência, etc.), angiogénese, migração celular, morfogénese celular, etc.

Num aspecto, o invento proporciona antagonistas de HGF/c-met que interrompem a via de sinalização HGF/c-met. Por exemplo, o invento proporciona uma molécula que se liga a cadeia β de factor de crescimento de hepatócitos activada e inibe ligação específica da referida cadeia β de HGF activada a c-met tal como definido nas reivindicações. Numa concretização, a afinidade de ligação da molécula para com a forma activada da cadeia β é maior do que a afinidade de ligação da molécula para com a cadeia β da forma de zimogénio. Em algumas concretizações, a molécula liga-se ao local/domínio activo da cadeia β . Em algumas concretizações, o referido local activo inclui pelo menos um, dois, três, quatro, cinco, seis ou todos os resíduos 534, 578, 673, 692, 694, 695 e/ou 696 da cadeia β . As combinações de dois ou mais resíduos podem incluir qualquer dos resíduos 534, 578, 673, 692, 694, 695 e/ou 696 de cadeia β de HGF. Em algumas concretizações, a molécula liga-se a pelo menos um, dois, três, quatro ou qualquer número até todos os resíduos 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 e/ou 702 da cadeia β de HGF. As combinações de dois ou mais resíduos podem incluir qualquer dos resíduos 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 e/ou 702 da cadeia β de HGF. Numa concretização, a substância

liga-se pelo menos a um ou ambos os resíduos 673 e 695. Noutra concretização, a substância liga-se a (i) pelo menos um ou ambos os resíduos 673 e 695 e (ii) resíduo 692. Noutra concretização, a substância liga-se a (i) pelo menos um ou ambos os resíduos 673 e 695 e (ii) resíduo 692 e (iii) pelo menos um ou ambos os resíduos 534 e 578. Noutra concretização, a substância liga-se (i) a pelo menos um ou ambos os resíduos 673 e 695 e (ii) a pelo menos um, dois ou todos os resíduos 534, 578 e 692. Noutra concretização, a substância liga-se a (i) pelo menos um, ambos ou todos os resíduos 673, 695 e 696 e (ii) pelo menos um, ambos ou qualquer número até todos os resíduos 534, 578, 692 e 694. Numa concretização, a substância liga-se à cadeia β de HGF em que, se houver uma mutação na posição 534, 673 e/ou 692, a referida cadeia β também inclui uma mutação pelo menos numa, em ambas ou em qualquer número até todas as posições 578, 694, 695 e 696. Numa concretização, a substância liga-se a pelo menos um dos resíduos 673, 693, 694, 695 e 696. Numa concretização, a substância liga-se a pelo menos um dos resíduos 692 e 702. Numa concretização, a substância liga-se a pelo menos um dos resíduos 534 e 578. Numa concretização, a substância liga-se a pelo menos um dos resíduos 513, 516, 619 e 699. Numa concretização, a substância liga-se a dois ou mais resíduos seleccionados do grupo que consiste num primeiro grupo que consiste dos resíduos 673, 693, 694, 695 e 696, um segundo grupo que consiste dos resíduos 692 e 702, um terceiro grupo que consiste dos resíduos 534 e 578 e um quarto grupo que consiste dos resíduos 513, 516, 619 e 699. Os referidos dois ou mais resíduos podem ser seleccionados do mesmo grupo ou de uma combinação de qualquer dos 4 grupos. Em algumas concretizações, a substância liga-se adicionalmente ao resíduo 423, 424, 494 e/ou 495. Em algumas concretizações destas moléculas, a cadeia β activada tem uma conformação de cadeia β obtida por clivagem de HGF de cadeia única; e em algumas destas concretizações, a referida clivagem é nos resíduos 494 e 495 ou adjacentes em HGF de cadeia única, e.g. a referida clivagem pode ocorrer entre os resíduos 494 e 495 de HGF de cadeia única.

Tal como definido nas reivindicações, a substância ou molécula é ou inclui um péptido, anticorpo, fragmento de anticorpo ou uma sua combinação.

Também se descreve aqui um mutante de HGF que tem actividade moduladora de HGF/c-met, e.g. um antagonista da actividade de HGF/c-met ou uma variante HGF que apresenta uma redução, mas não ausência, de actividade biológica de HGF (e.g., actividade de estimulação de crescimento celular). Numa concretização, um antagonista do invento é capaz de inibir a actividade biológica de HGF de tipo selvagem (*in vivo*) (tal actividade biológica inclui, entre outras, estimulação de proliferação celular, melhoramento da sobrevivência celular, promoção de angiogénese, indução/promoção de migração celular). Uma variante HGF pode proporcionar actividade de promoção de crescimento celular reduzida (incluindo entre outros proliferação celular, sobrevivência celular, angiogénica, migração celular). O mutante de HGF pode ser uma cadeia β de HGF do tipo zimogénio (e.g., mutação na posição 494). Por exemplo, estes mutantes incluem os que têm mutações em posições dentro de HGF que o tornam incapaz de ser activado (e.g., clivado) *in vitro* ou *in vivo*; um exemplo de tal mutante inclui uma mutação nas posições 424 e 494. O mutante de HGF pode ser um HGF de cadeia única, por exemplo HGF incluindo uma mutação na posição 424 e/ou 494, e/ou uma posição adjacente ao resíduo 424 e/ou 494. Um mutante de HGF pode incluir adicionalmente uma mutação na posição 604 (e.g. cadeia β de HGF Cys⁶⁰⁴Ser). Um mutante de HGF pode ser um mutante de "região de local activo" tal como descrito anteriormente. Os mutantes de HGF podem ter uma mutação em uma ou mais posições na cadeia β (incluindo mutações na região de local activo), tais como posições 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 e/ou 702.

Em algumas concretizações, a ligação de uma substância ou molécula do invento a cadeias β activadas inibe a activação de c-met por HGF. Em algumas concretizações, a ligação da referida substância ou moléculas a cadeia β activada inibe o crescimento celular (tal como proliferação celular, sobrevivência, angiogénese, morfogénese, migração) induzida por HGF. Em algumas concretizações, a ligação da referida substância ou molécula a cadeia P activada inibe dimerização do receptor c-met.

Em algumas concretizações, uma substância ou molécula do invento é obtida por um método de rastreio ou identificação do invento tal como aqui descrito.

Em algumas concretizações, uma substância ou molécula do invento inclui um péptido. Em algumas concretizações, o referido péptido inclui a sequência VDWVCFRDLGCDWEL. Em algumas concretizações, o péptido inclui uma sequência de aminoácidos com pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% de identidade ou similaridade de sequência com a sequência VDWVCFRDLGCDWEL. Podem ser obtidas variantes desta sequência por métodos conhecidos na arte, por exemplo por mutagénesse combinatória (e.g., por disposição de fago). Os exemplos específicos de tais variantes incluem, entre outros, os apresentados seguidamente na tabela 1. Em algumas concretizações, estes péptidos incluem modificações que aumentam o seu efeito inibidor e/ou terapêutico (incluindo, e.g., afinidade aumentada, propriedades farmacocinéticas melhoradas (tais como semivida, estabilidade, taxa de depuração), toxicidade reduzida para o indivíduo). Tais modificações incluem, e.g., modificações envolvendo glicosilação, PEGuilação, substituição por aminoácidos de ocorrência não natural mas equivalentes funcionalmente, grupos de ligação, etc. As modificações adequadas são bem conhecidas na arte e além disso podem ser determinadas empiricamente como necessário.

Tabela 1

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
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
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
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

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
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
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
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 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
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
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
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
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

Descreve-se aqui um antagonista de HGF/c-met que é uma substância ou molécula que compete com a cadeia β de factor de crescimento de hepatócitos para ligação a c-met, em que a referida molécula pode inibir a multimerização do receptor c-met (e.g., dimerização). A referida molécula pode incluir uma cadeia β variante (mutante) com capacidade reduzida para

interagir (e.g., multimerizar/dimerizar) com outra molécula de cadeia β ou pode inibir multimerização de cadeia β de HGF (e.g., dimerização). A referida molécula pode ligar-se a c-met mas apresentar capacidade reduzida para efectuar activação de c-met (e.g., tal como indicado por fosforilação de c-met, fosforilação de proteína-quinase activada por mitogénio (MAPK) reduzida e/ou migração celular dependente de HGF/c-met, proliferação celular, sobrevivência celular, morfogénese celular reduzidas etc.). A molécula pode incluir, consistir ou consistir essencialmente de um polipéptido incluindo pelo menos uma parte de uma cadeia β de HGF, em que a referida cadeia β inclui uma mutação numa ou mais das posições 695, 696 e 673 ou numa ou mais das posições 695, 696 e 673 e numa ou mais das posições 534, 578, 692 e 694. As combinações de dois ou mais resíduos podem incluir quaisquer dos resíduos 534, 578, 673, 692, 694, 695 e 696 da cadeia β de HGF. A molécula pode incluir, consistir ou consistir essencialmente de um polipéptido incluindo pelo menos uma parte de uma cadeia β de HGF, em que a referida cadeia β inclui uma mutação em pelo menos um ou ambos os resíduos 673 e 695 ou inclui uma mutação em pelo menos um ou ambos os resíduos 673 e 695 e (ii) resíduo 692 ou inclui uma mutação em pelo menos um ou ambos os resíduos 673 e 695 e (ii) resíduo 692 e (iii) pelo menos um ou ambos os resíduos 534 e 578 ou inclui uma mutação em pelo menos um ou ambos os resíduos 673 e 695 e (ii) pelo menos um, dois ou todos os resíduos 534, 578 e 692 ou inclui uma mutação em pelo menos um, ambos ou todos os resíduos 673, 695 e 696 e (ii) pelo menos um, ambos ou qualquer número até todos os resíduos 534, 578, 692 e 694 ou inclui uma mutação e em que se há uma mutação na posição 534, 673 e/ou 692, a referida cadeia β também inclui uma mutação em pelo menos um, ambos ou qualquer número até todas as posições 578, 694, 695 e 696 ou inclui uma mutação em uma ou mais posições na cadeia β (incluindo mutações na região do local activo), tal como posições 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 e/ou 702. A molécula pode incluir, consistir ou consistir essencialmente de pelo menos uma parte de HGF, em que a referida parte inclui uma mutação numa ou mais posições dentro de HGF que a torna incapaz de ser activada (e.g., clivada) *in vitro* ou *in vivo*; um exemplo de tal mutante inclui uma mutação nas posições 424 e/ou 494. Em alguns casos, a cadeia β está ligada (e.g., através de uma ligação dissulfureto) a pelo

menos uma parte da cadeia alfa de HGF (ou seus equivalentes funcionais) ou a cadeia β está ligada (e.g., através de uma ligação dissulfureto) a substancialmente toda a cadeia alfa de HGF (ou seus equivalentes funcionais). Em alguns casos, a cadeia β não está ligada a uma sequência de cadeia alfa de HGF (ou seus equivalentes funcionais). Podem ser obtidas outras substâncias ou moléculas por métodos de rastreio ou identificação do invento. Em alguns casos, a substância ou molécula pode ser o produto de iterações de modificação de uma substância ou molécula de partida concebida com a informação aqui proporcionada, e.g., com base em esqueletos de moléculas pequenas ou sequência de péptido que se prevê interactuar com um resíduo funcionalmente significativo, incluindo entre outros resíduos no domínio de activação, região activa e/ou resíduos específicos (tais como um ou mais resíduos 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 e/ou 702) da cadeia β de HGF (e.g., resíduos no domínio do tipo protease).

Em qualquer molécula do invento em que uma ou mais posições é mutada relativamente à sequência respectiva de tipo selvagem, a mutação pode ser de qualquer forma que reduza ou elimine (ou em alguns casos aumente) o efeito funcional do resíduo de tipo selvagem correspondente. Pode ser obtida uma mutação em qualquer forma adequada conhecida na arte (e/ou determinada empiricamente), e.g. por substituição, inserção, adição e/ou deleção. Em alguma concretização, uma mutação inclui uma substituição não conservativa. As substituições adequadas incluem, entre outras, as aqui descritas (em particular nos exemplos), e.g. com aminoácidos tal como alanina e serina.

Num aspecto, uma molécula/substância (e.g., moduladores HGF/c-met tal como aqui descrito) está ligada a uma toxina tal como um agente citotóxico. Estas moléculas/substâncias podem ser formuladas ou administradas em combinação com um agente aditivo/melhorador, tal como radiação e/ou um agente quimioterapêutico.

O invento também proporciona utilizações e composições médicas úteis para modular estados de doença associados a desregulação do eixo de sinalização HGF/c-met. Assim, num aspecto, o invento proporciona utilizações médicas para

modular activação de c-met num indivíduo, utilizando uma molécula moduladora de HGF/c-met do invento (e.g., uma substância que inibe ligação específica da cadeia β de HGF de tipo selvagem (nativa) a c-met), pela qual a activação de c-met é modulada tal como definido nas reivindicações. A referida molécula é um antagonista de HGF/c-met que inibe a actividade de HaF/c-met. Numa concretização, o referido antagonista inibe ligação específica de β de HGF a c-met. Num aspecto, o invento proporciona utilizações médicas para tratar uma condição patológica associada a activação de c-met num indivíduo, utilizando um antagonista de c-met do invento (e.g., uma substância que inibe ligação específica da cadeia β de HGF de tipo selvagem (nativa) a c-met), pela qual a activação de c-met é inibida tal como definido nas reivindicações.

A via de sinalização HGF/c-met está envolvida em múltiplas funções biológicas e fisiológicas, incluindo, e.g., estimulação de crescimento celular (e.g. proliferação celular, sobrevivência celular, migração celular, morfogénese celular) e angiogénese. Assim, num outro aspecto, o invento proporciona utilizações médicas para inibir crescimento celular activado por c-met (e.g. proliferação e/ou sobrevivência), utilizando um antagonista de c-met do invento (e.g., uma substância que inibe ligação específica da cadeia β de HGF de tipo selvagem (nativa) a c-met), pela qual a proliferação celular associada a activação de c-met é inibida tal como definido nas reivindicações. Ainda num outro aspecto, o invento proporciona métodos médicos para modular angiogénese, num indivíduo com uma condição associada a angiogénese anómala, utilizando um antagonista de c-met do invento (e.g., uma substância que inibe a ligação específica da cadeia β de HGF de tipo selvagem (nativa) a c-met), pela qual se modula a angiogénese.

Num aspecto, o invento proporciona utilização de um antagonista de c-met do invento na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de uma doença, tal como um cancro, um tumor, uma doença de proliferação celular, uma doença imunitária (tal como auto-imune) e/ou uma doença relacionada com angiogénese. O antagonista de c-met pode ser de qualquer forma aqui descrita, incluindo anticorpo, fragmento de anticorpo, polipéptido

(e.g., um oligopéptido), ácido nucleico (e.g., um oligonucleótido, tal como um oligonucleótido anti-sentido) ou suas combinações.

Num aspecto, o invento proporciona utilização de um ácido nucleico do invento na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de uma doença, tal como um cancro, um tumor, uma doença de proliferação celular, uma doença imunitária (tal como auto-imune) e/ou uma doença relacionada com angiogénese.

Num aspecto, o invento proporciona utilização de um vector de expressão do invento na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de uma doença, tal como um cancro, um tumor, uma doença de proliferação celular, uma doença imunitária (tal como auto-imune) e/ou uma doença relacionada com angiogénese.

Num aspecto, o invento proporciona utilização de uma célula hospedeira do invento na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de uma doença, tal como um cancro, um tumor, uma doença de proliferação celular, uma doença imunitária (tal como auto-imune) e/ou uma doença relacionada com angiogénese.

Num aspecto, o invento proporciona utilização de um artigo de fabrico do invento na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de uma doença, tal como um cancro, um tumor, uma doença de proliferação celular, uma doença imunitária (tal como auto-imune) e/ou uma doença relacionada com angiogénese.

Num aspecto, o invento proporciona utilização de um kit do invento na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de uma doença, tal como um cancro, um tumor, uma doença de proliferação celular, uma doença imunitária (tal como auto-imune) e/ou uma doença relacionada com angiogénese.

Num aspecto, o invento refere-se a utilizações médicas para inibir proliferação celular activada por c-met, utilizando uma quantidade eficaz de um antagonista de c-met do

invento, pela qual é inibida a proliferação celular associada a c-met.

Num aspecto, o invento refere-se a utilizações médicas para tratar uma condição patológica associada a desregulação de activação c-met num indivíduo, utilizando uma quantidade eficaz de um antagonista de c-met do invento, pela qual é tratada a referida condição.

Num aspecto, o invento refere-se a utilizações médicas para inibir o crescimento de uma célula que expressa c-met ou factor de crescimento de hepatócitos, ou ambos, utilizando um antagonista de c-met do invento, causando assim inibição de crescimento da referida célula.

Num aspecto, o invento proporciona utilizações médicas para tratar terapêuticamente um mamífero com um tumor canceroso incluindo uma célula que expressa c-met ou factor de crescimento de hepatócitos, ou ambos, utilizando uma quantidade eficaz de um antagonista de c-met do invento, tratando assim eficazmente o referido mamífero.

Num aspecto, o invento proporciona utilizações médicas para tratar ou evitar uma doença de proliferação celular associada com a expressão ou actividade aumentada de c-met ou factor de crescimento de hepatócitos, ou ambos, utilizando uma quantidade eficaz de um antagonista de c-met do invento, tratando ou evitando assim eficazmente a referida doença de proliferação celular. Numa concretização, a referida doença de proliferação é cancro.

Num aspecto, o invento refere-se a utilizações médicas para inibir o crescimento de uma célula, em que o crescimento da referida célula é pelo menos em parte dependente de um efeito de potenciação de crescimento de c-met ou factor de crescimento de hepatócitos, ou ambos, utilizando uma quantidade eficaz de um antagonista de c-met do invento, inibindo assim o crescimento da referida célula. Numa concretização, a célula é posta em contacto com uma célula diferente que expressa HGF (e.g., através de um efeito parácrino).

Num aspecto, o invento proporciona utilizações médicas para tratar terapêuticamente um tumor num mamífero, em que o crescimento do referido tumor é pelo menos em parte dependente do efeito de potenciação de crescimento de c-met ou factor de crescimento de hepatócitos, ou ambos, utilizando uma quantidade eficaz de um antagonista de c-met do invento, tratando assim eficazmente o referido tumor. Numa concretização, a célula é posta em contacto com HGF expressa por uma célula diferente (e.g., através de um efeito parácrino).

Os medicamentos do invento podem ser utilizados em métodos que afectam qualquer estado patológico adequado, por exemplo, células e/ou tecidos associados a desregulação da via de sinalização HGF/c-met. Numa concretização, uma célula que é tomada como alvo num método do invento é uma célula de cancro. Por exemplo, uma célula de cancro pode ser uma seleccionada do grupo que consiste numa célula de cancro da mama, uma célula de cancro colorrectal, uma célula de cancro do pulmão, uma célula de carcinoma papilar (e.g., da glândula tiróide), uma célula de cancro de cólon, uma célula de cancro pancreático, uma célula de cancro dos ovários, uma célula de cancro cervical, uma célula de cancro do sistema nervoso central, uma célula de sarcoma osteogénico, uma célula de carcinoma renal, uma célula de carcinoma hepatocelular, uma célula de cancro da bexiga, uma célula de carcinoma gástrico, uma célula de carcinoma escamoso da cabeça e pescoço, uma célula de melanoma e uma célula de leucemia. Numa concretização, a célula que é alvo num método do invento é uma célula hiperproliferativa e/ou hiperplásica. Numa concretização, uma célula que é alvo num método do invento é uma célula displásica. Ainda numa outra concretização, uma célula que é alvo num método do invento é uma célula metastática.

Os métodos indicados nas utilizações médicas do invento podem incluir ainda etapas de tratamento adicionais. Por exemplo, numa concretização, um método inclui adicionalmente uma etapa em que se expõe uma célula e/ou tecido alvo (e.g., uma célula de cancro) a tratamento com radiação ou um agente quimioterapêutico.

Tal como aqui descrito, a activação de c-met é um processo biológico importante cuja desregulação leva a numerosas condições patológicas. Assim, numa concretização do invento, uma célula que é alvo (e.g., uma célula de cancro) é uma célula na qual a activação de c-met é aumentada comparativamente a uma célula normal do mesmo tecido de origem. Numa concretização, um método indicado nas utilizações médicas do invento causa a morte de uma célula alvo. Por exemplo, o contacto com um antagonista do invento pode resultar numa incapacidade da célula para sinalizar através da via c-met, que resulta em morte celular.

A desregulação da activação de c-met (e assim da sinalização) pode resultar de várias alterações celulares incluindo, por exemplo, sobre-expressão de HGF (ligando correspondente de c-met) e/ou da própria c-met. Assim, em algumas concretizações, um método indicado nas utilizações médicas do invento inclui ter como alvo uma célula em que c-met ou o factor de crescimento de hepatócitos ou ambos são expressos mais abundantemente pela referida célula (e.g., uma célula de cancro) comparativamente a uma célula normal do mesmo tecido de origem. Uma célula que expressa c-met pode ser regulada por HGF de várias fontes, i.e. numa forma autócrina ou parácrina. Por exemplo, numa concretização de métodos indicados nas utilizações médicas do invento, põe-se em contacto/liga-se uma célula alvo com factor de crescimento de hepatócitos expresso numa célula diferente (e.g., através de uma efeito parácrino). A referida célula diferente pode ser do mesmo tipo de tecido de origem ou diferente. Numa concretização, põe-se em contacto/liga-se uma célula alvo com HGF expresso pela própria célula alvo (e.g., através de um efeito/ciclo autócrino).

É aqui descrito um método incluindo administração a um indivíduo de uma variante de HGF capaz de efectuar actividade biológica de HGF a um nível supra-normal (e.g., inferior ao nível de actividade obtido com uma quantidade semelhante de HGF de tipo selvagem em condições terapêuticas semelhantes), em que se pretende que a actividade HGF seja a níveis sub-óptimos (i.e., inferior à do tipo selvagem), através do qual se atinge a quantidade pretendida de actividade biológica de HGF. A referida variante HGF pode incluir uma mutação em uma

ou mais das posições 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 e/ou 702 ou inclui uma mutação no interior de HGF que o torna incapaz de ser activado (e.g., clivado) *in vitro* ou *in vivo*; um exemplo de tal mutante inclui uma mutação nas posições 424 e/ou 494. As condições adequadas a serem tratadas por este método incluem quaisquer condições patológicas que estão associadas com um nível fisiológico de actividade HGF/c-met anormalmente/indesejavelmente baixo num indivíduo e em que há necessidade de regular rigorosamente a quantidade de actividade HGF/c-met induzida por um agente terapêutico. Os exemplos de tais condições incluem, entre outras, cicatrização de ferimentos, hipertrofia cardíaca, enfarte cardíaco, isquemia dos membros, doença arterial periférica, etc.

Qualquer dos antagonistas de c-met do invento pode ser utilizado em utilizações médicas do invento.

Em algumas concretizações de utilizações médicas do invento, a substância ou molécula é ou inclui um péptido, anticorpo, fragmento de anticorpo ou sua combinação.

Em algumas concretizações de utilizações médicas do invento, um antagonista de c-met é uma substância ou molécula incluindo, consistindo ou consistindo essencialmente de um péptido, que em algumas concretizações inclui, consiste ou consiste essencialmente da sequência VDWVCFRDLGCDWEL. Em algumas concretizações, o péptido inclui, consiste ou consiste essencialmente de uma sequência de aminoácidos com pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% de identidade ou similaridade de sequência com a sequência VDWVCFRDLGCDWEL. Numa concretização, uma variante desta sequência é qualquer das apresentadas anteriormente na tabela 1. Em algumas concretizações, estes péptidos incluem modificações que melhoram o seu efeito de inibição e/ou terapêutico (incluindo, e.g., afinidade melhorada, propriedades farmacocinéticas melhoradas (tais como semivida, estabilidade, taxa de depuração), toxicidade reduzida para o indivíduo). Tais modificações incluem, e.g., modificações envolvendo glicosilação, PEGuilação, substituição por aminoácidos de ocorrência não natural mas funcionalmente equivalentes, grupos de ligação, etc. As modificações adequadas são bem conhecidas

na arte e além disso podem ser determinadas empiricamente como necessário.

Em algumas concretizações, as utilizações médicas do invento utilizam uma substância ou molécula obtida por qualquer dos métodos de rastreio e/ou identificação do invento.

Em algumas concretizações de utilizações e composições médicas do invento, uma substância/molécula que inibe a sinalização HGF/c-met não interfere substancialmente com a interacção de ligação entre componentes celulares, a não ser com a cadeia β de HGF activada e c-met. Por exemplo, numa concretização, a substância/molécula não interfere substancialmente com a ligação da cadeia α de HGF a c-met.

Num aspecto, o invento proporciona composições incluindo uma ou mais substâncias/moléculas (e.g., antagonistas de HGF/c-met) do invento e um transportador. Numa concretização, o transportador é farmacologicamente aceitável.

Num aspecto, o invento proporciona ácidos nucleicos que codificam uma substância/molécula (e.g., um antagonista de HGF/c-met) do invento. Numa concretização, um ácido nucleico do invento codifica uma substância/molécula (e.g., um antagonista de HGF/c-met) que é ou inclui um polipéptido (e.g., um oligopéptido). Numa concretização, um ácido nucleico do invento codifica uma substância/molécula (e.g., um antagonista de HGF/c-met) que é ou inclui um anticorpo ou seu fragmento.

Num aspecto, o invento proporciona vectores incluindo um ácido nucleico do invento.

Num aspecto, o invento proporciona células hospedeiras incluindo um ácido nucleico ou um vector do invento. Um vector pode ser de qualquer tipo, por exemplo um vector recombinante tal como um vector de expressão. Pode ser utilizada qualquer de uma variedade de células hospedeiras. Numa concretização, uma célula hospedeira é uma célula procariótica, por exemplo, *E. coli*. Numa concretização, uma célula hospedeira é uma

célula eucariótica, por exemplo uma célula de mamífero tal como uma célula de ovário de *hamster* chinês (CHO).

Num aspecto, o invento proporciona métodos para preparar uma substância/molécula (e.g., um antagonista de HGF/c-met) do invento. Por exemplo, o invento proporciona um método para preparar um antagonista de c-met que é ou inclui um anticorpo (ou seu fragmento), em que o referido método inclui expressar, numa célula hospedeira adequada, um vector recombinante do invento que codifica o referido anticorpo (ou seu fragmento) e recuperação do referido anticorpo. Noutro exemplo, o invento proporciona um método para preparar uma substância/molécula (e.g., um antagonista de HGF/c-met) que é ou inclui um polipéptido (tal como um oligopéptido), em que o referido método inclui expressar, numa célula hospedeira adequada, um vector recombinante do invento que codifica o referido polipéptido (tal como um oligopéptido) e recuperar o referido polipéptido (tal como um oligopéptido).

Num aspecto, o invento proporciona um artigo de fabrico incluindo um recipiente; e uma composição contida no interior do recipiente, em que a composição inclui uma ou mais substâncias/moléculas (e.g., antagonistas de HGF/c-met) do invento. Numa concretização, a composição inclui um ácido nucleico do invento. Numa concretização, uma composição incluindo uma substância/molécula (e.g., um antagonista de HGF/c-met) inclui adicionalmente um transportador, que em algumas concretizações é farmacologicamente aceitável. Numa concretização, um artigo de fabrico do invento inclui adicionalmente instruções para administração da composição (e.g., o antagonista) a um indivíduo.

Num aspecto, o invento proporciona um *kit* incluindo um primeiro recipiente incluindo uma composição incluindo uma ou mais substâncias/moléculas (e.g., antagonistas de HGF/c-met) do invento; e um segundo recipiente incluindo um tampão. Numa concretização, o tampão é farmacologicamente aceitável. Numa concretização, uma composição incluindo uma substância/molécula (e.g., um antagonista de HGF/c-met) inclui adicionalmente um transportador, que em algumas concretizações é farmacologicamente aceitável. Numa concretização, um *kit*

inclui adicionalmente instruções para administrar a composição (e.g., o antagonista) a um indivíduo.

DESCRIÇÃO SUCINTA DAS FIGURAS

Figura 1. Ligação directa e competitiva e actividade de HGF β em ensaios de fosforilação de Met.

(A) Ligação de HGF β ao domínio extracelular de Met (Met ECD) por ressonância plasmónica de superfície. Met ECD foi capturado num *chip* CM5 a ~2000 unidades de ressonância. Injectou-se HGF β numa série de concentrações de 12,5 nM a 100 nM. As setas indicam o início das fases de associação e dissociação. Os dados foram analisados por Global Fit utilizando um modelo de ligação 1:1 a partir do qual se determinaram os valores de k_{on} , k_{off} e K_d .

(B) ELISA de competição de HGF β /Met-IgG. Met-IgG foi capturado numa placa revestida com Fc IgG de coelho anti-humano e incubou-se com uma mistura contendo HGF β de tipo selvagem biotinilado 250 nM acoplado a maleimida e uma série de concentrações de HGF β não marcado (●) e proHGF β (■). A quantidade de HGF β de tipo selvagem biotinilado ligado à placa foi detectada por neutravidina-HRP. Dados de pelo menos 3 determinações independentes, que foram normalizados, calculada a média e ajustados por um ajuste de quatro parâmetros utilizando Kaleidagraph a partir do qual se determinaram os valores de IC_{50} ; as barras de erro representam desvios padrão.

(C) A fosforilação de Met dependente de HGF em células A549 foi efectuada tal como descrito nos exemplos utilizando HGF (▲) e HGF β (●).

(D) A inibição de fosforilação de met dependente de HGF foi efectuada em duplicado tal como descrito nos exemplos utilizando HGF a 0,5 nM (◆), 0,25 nM (▲) e 0,125 nM (■) para estimular células A549 na presença de concentrações crescentes de HGF β .

(E) ELISA de competição HGF completo/Met-IgG. Tal foi efectuada de modo semelhante a (A) utilizando HGF biotinilado 1 nM acoplado a NHS e uma série de concentrações de HGF não marcado (○), e HGF- (●). Os dados são de 3 determinações

independentes que foram normalizadas, calculada a média e ajustadas como anteriormente.

Figura 2. Migração celular dependente de HGF por mutantes de HGF. (A) Pureza representativa de mutantes de HGF. A pureza de todos os mutantes de HGF analisada por SDS-PAGE sob condições redutoras é ilustrada por HGF I623A purificada por permuta catiónica. Apresenta-se na pista 1 a conversão incompleta da forma em cadeia única excretada por expressão em CHO em FBS a 1% (v/v). Exposição adicional a FBS a 5% completou o processo de activação proporcionando HGF I623A puro de duas cadeias (pista 2). Os marcadores de peso molecular apresentam-se como $M_r \times 10^3$. B) Migração de células MDA-MB435 num ensaio em Transwell na presença de mutantes de HGF 1 nM. As actividades são expressas como a percentagem de migração das células de controlo expostas a HGF de tipo selvagem 1 nM; apresenta-se a numeração da sequência de HGF completa [numeração de quimiotripsinogénio]. Os valores representam a média de 4-8 experiências independentes \pm DP. (C) Fotografias de migração celular de MDA-MB435 na ausência de HGF de tipo selvagem (a), com HGF de tipo selvagem 1 nM (b), HGF R695A 1 nM (c) e HGF G696A 1 nM (d).

Figura 3. Fosforilação de Met dependente de HGF por mutantes de HGF. A fosforilação de Met de células A549 foi efectuada tal como descrito nos exemplos utilizando várias concentrações de HGF (\bullet), proHGF (\blacklozenge), HGF Q534A (\circ), HGF D578A (\blacktriangle), HGF Y673A (\triangle), HGF V692A (\diamond), HGF R695A (\square) e HGF G696A (\blacktriangledown).

Figura 4. Competição de ligação a Met por mutantes de HGF β . Utilizou-se ELISA de competição HGF β /Met-IgG para avaliar a ligação a Met de HGF β de tipo selvagem (Δ), HGF β (\bullet) e de mutantes de HGF β Q534A [c57] (\circ), D578A [c102] (\blacktriangle), Y619A [c143] (\circ), R695A [c217] (\square), G696A [c219] (\blacktriangledown) e I699A [c221a] (\blacklozenge). Os dados foram ajustados por um ajuste de quatro parâmetros utilizando Kaleidagraph; apresentam-se ensaios de competição individuais representativos para determinações independentes múltiplas em que $n \geq 3$.

Figura 5. Efeitos de mutações da cadeia β em HGF β e HGF de duas cadeias. Apresentam-se os dados de ligação competitiva a Met de mutantes de HGF β na ELISA de ligação competitiva

HGF β /Met e actividade de migração celular de mutantes de HGF de duas cadeias no ensaio de migração celular MDA-MB-435. Os mutantes de cadeia β de HGF foram preparados em base de C604S salvo indicação em contrário.

Figura 6. Efeito de mutações de HGF na estimulação e inibição de proliferação celular. (A) Proliferação celular dependente de HGF por HGF de duas cadeias e mutantes de HGF de duas cadeias (com as mutações indicadas) em células BxPC3. (B) Inibição da proliferação celular dependente de HGF pelo mutante de HGF de duas cadeias em cadeia β de HGF (com as mutações indicadas) e por HGF de cadeia única em células BxPC3.

Figura 7. Afinidades de ligação relativas de mutantes de HGF a Met determinadas por ELISA de ligação competitiva HGF/Met.

Figura 8 Actividades pró-migratórias de mutantes de HGF a concentrações diferentes.

Figura 9 Análise de ligação de pró-HGF de cadeia única e HGF de duas cadeias a c-met-IgG determinado por ELISA de competição de cadeia β de HGF. Os dados foram ajustados por um ajuste com quatro parâmetros utilizando Kaleidagraph e determinou-se IC₅₀ para HGF de duas cadeias. Pró-HGF de cadeia única a concentrações até 100 nM não competiu com a ligação de cadeia β de HGF a c-met-IgG.

MODOS DE LEVAR O INVENTO À PRÁTICA

O invento proporciona métodos, composições, *kits* e artigos de fabrico para identificar inibidores da via de sinalização HGF/c-met (em particular, inibidores da ligação de cadeia β de HGF a c-met) e métodos de utilizar tais inibidores.

Proporcionam-se aqui detalhes destes métodos, composições, *kits* e artigos de fabrico.

Técnicas gerais

A prática do presente invento utilizará, salvo indicação em contrário, técnicas convencionais de biologia molecular (incluindo técnicas recombinantes), microbiologia, biologia

celular, bioquímica e imunologia, que estão dentro da perícia na arte. Tais técnicas são explicadas completamente na literatura, tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edição (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., ed., 1987 e actualizações periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988).

Definições

"Porcentagem (%) de identidade de sequência de aminoácidos" relativamente a uma sequência de péptido (e.g., VDWVCFRDLGCDWEL) ou de polipéptido é definida como a percentagem de resíduos de aminoácidos numa sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácidos na sequência de péptido ou polipéptido específica, após alinhamento das sequências e introdução de espaços, caso necessário, para atingir o máximo de percentagem de identidade de sequência e não considerando quaisquer substituições conservativas como parte da identidade da sequência. O alinhamento para propósitos de determinar a percentagem de identidade de sequência de aminoácidos pode ser conseguido de vários modos que estão dentro da perícia na arte, por exemplo utilizando utilitários de computador disponíveis ao público, tais como os utilitários BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Os peritos na arte podem determinar parâmetros adequados para medir o alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para conseguir alinhamento máximo ao longo das sequências completas em comparação. Para os presentes propósitos, no entanto, os valores de % de identidade de sequência de aminoácidos são gerados utilizando o programa de computador de comparação de sequências ALIGN-2, em que o código-fonte completo para o programa ALIGN-2 é apresentado na tabela A seguinte. O programa de computador de comparação de sequências ALIGN-2 foi concebido por Genentech, Inc. e o código-fonte apresentado na tabela A seguinte foi apresentado com documentação do utilizador ao U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, onde se encontra registado sob o número de registo U.S. TXU510087. O programa ALIGN-2 está

disponível ao público através de Genentech, Inc., South San Francisco, Califórnia ou pode ser compilado a partir do código-fonte proporcionado na figura 8 seguidamente. O programa ALIGN-2 deve ser compilado para utilização num sistema operativo UNIX, de preferência UNIX V4.0D digital. Todos os parâmetros de comparação de sequências são estabelecidos pelo programa ALIGN-2 e não variam.

Em situações em que se utiliza ALIGN-2 para comparações de sequências de aminoácidos, a % de identidade de sequência de aminoácidos de uma determinada sequência de aminoácidos A com, relativamente, ou contra uma determinada sequência de aminoácidos B (que pode ser alternativamente expresso como uma determinada sequência de aminoácidos A ter ou incluir uma determinada % de identidade de sequência de aminoácidos com, relativamente, ou contra uma determinada sequência de aminoácidos B) é calculada da seguinte forma:

$$100 \text{ vezes a fracção } X/Y$$

em que X é o número de resíduos de aminoácidos pontuados como idênticos pelo programa de alinhamento de sequências ALIGN-2 nesse alinhamento do programa de A e B e em que Y é o número total de resíduos de aminoácidos em B. Considerar-se-á que quando o comprimento da sequência de aminoácidos A não for igual ao comprimento da sequência de aminoácidos B, a % de identidade de sequências de A com B não será igual à % de identidade de sequências de aminoácidos de B com A.

Salvo indicação em contrário, todos os valores de % de identidade de sequências de aminoácidos aqui utilizados são obtidos tal como descrito no parágrafo imediatamente anterior utilizando o programa de computador ALIGN-2.

Tabela A

```

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

int    _day[26][26] = {
/*   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},
/* 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},
/* 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},
/* 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},
/* 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},
/* 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},

```

```

/* 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},
/* 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},
/* 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},
/* Y */ {-3,-3,0,-4,-4,7,-5,0,-1,0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3,0,-2,0,10,-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 dely) */

```

```

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

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

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

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

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

```

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* 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
* 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
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    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
};

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,
    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'))
};

main(ac, av)
    int    ac;
    char   *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
    }
}
main

```

```

        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");
        fprintf(stderr,"Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr,"Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    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 */

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

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

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * 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
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;    /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;      /* keep track of delx */

```

```

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

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));
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));
ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

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

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

```

```

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

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

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

```

```

        } else
            ndely[yy]++;
    }

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

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

```

...nw

```

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

```

```

        col1[yy] = mis;
    else if (delx >= dely[yy]) {
        col1[yy] = delx;
        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
            dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejmps(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
    else {
        col1[yy] = dely[yy];
        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
            dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejmps(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
        }
        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
    }
    if (xx == len0 && yy < len1) {

```

```

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

/*
*
* print() -- only routine visible outside this module
*
* static:
* getmat() -- trace back best path, count matches: print()
* pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
* 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()
* stars() - -put a line of stars: dumpblock()
* stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
*/

```

```

#include "nw.h"

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

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

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

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

```

```

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

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

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

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

```

```

    if (siz0) {
        p1++;
        n1++;
        siz0--;
    }
    else if (siz1) {
        p0++;
        n0++;
        siz1--;
    }
    else {
        if (x[bm[*p0-'A']&x[bm[*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);

```

```

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 */

```

```

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

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

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

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

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

```

```

        continue;

    more++;

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

        /*
        * are we at next gap for this seq?
        */
        if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
            /*
            * we need to merge all gaps
            * at this location
            */
            siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
            while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
        }
        ni[i]++;
    }
}
if (++nn == olen || !more && nn) {

```

```

        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) puts('\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

```

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                nums
{
    int    ix;    /* index in out[] holding seq line */

    char    nline[P_LINE];
    register    i, j;
    register char    *pn, *px, *py;

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

```

```

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

                                        ...putline

    int    i;
    register char *px;

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

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

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()                                    stars
{
    int    i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

```

```

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

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

        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
            cx = '*';
            nm++;
        }
        else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
            cx = '!';
        else
            cx = ' ';
    }
    else
        cx = ' ';
    *px++ = cx;
}
*px++ = '\n';
*px = '\0';
}

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

```

```

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

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_alloc() -- 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()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

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

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

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

```

```

cleanup(i)                                cleanup
    int    i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)                            getseq
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */
{
    char    line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int     natgc, tlen;
    FILE    *fp;

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

```

```

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

                                                                    ...getseq

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

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

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

```

```

char      *px, *calloc();

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

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

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

```

```

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

```

```

        }
    }
    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()
*/
writejmps(ix)                                writejmps
{
    int    ix;

    char  *mktemp();

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

```

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

Pretende-se que a expressão "vector", tal como aqui utilizada, se refira a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual foi ligada. Um tipo de vector é um "plasmídeo", que se refere a um ciclo de ADN de cadeia dupla circular ao qual se podem ligar segmentos de ADN adicionais. Outro tipo de vector é um vector de fago. Outro tipo de vector é um vector viral, em que se podem ligar segmentos de ADN adicionais no genoma viral. Determinados vectores são capazes de replicação autónoma numa célula hospedeira na qual são introduzidos (e.g., vectores bacterianos com uma origem de replicação bacteriana e vectores mamíferos epissómicos). Podem ser integrados outros vectores (e.g., vectores de mamífero não epissómicos) no genoma de uma célula hospedeira por introdução na célula hospedeira e consequentemente são replicados conjuntamente com o genoma do hospedeiro. Além disso, determinados vectores são capazes de dirigir a expressão de genes aos quais estão ligados operacionalmente. Tais vectores são aqui denominados "vectores de expressão recombinantes" (ou simplesmente "vectores recombinantes"). Em geral, os vectores de expressão úteis em técnicas de ADN recombinante estão frequentemente sob a forma de plasmídeos. Na presente especificação, "plasmídeo" e "vector" podem ser utilizados indiferentemente, mas o plasmídeo é a forma de vector mais frequentemente utilizada.

"Polinucleótido" ou "ácido nucleico" tal como aqui utilizados indiferentemente referem-se a polímeros de nucleótidos de qualquer comprimento e incluem ADN e ARN. Os nucleótidos podem ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos ou bases modificadas e/ou seus análogos ou qualquer substrato que possa ser incorporado num polímero por

ADN polimerase ou ARN polimerase ou por uma reacção sintética. Um polinucleótido pode incluir nucleótidos modificados, tais como nucleótidos metilados e seus análogos. Caso se encontrem presentes, a modificação da estrutura de nucleótido pode ser efectuada antes ou após a montagem do polímero. A sequência de nucleótidos pode ser interrompida por componentes não nucleótido. Um polinucleótido pode ser modificado adicionalmente após a síntese, tal como por conjugação com um marcador. Outros tipos de modificações incluem, por exemplo, "capuzes", substituição de um ou mais nucleótidos de ocorrência natural com um análogo, modificações internucleótido tais como, por exemplo, as com ligações sem carga (e.g., metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) e com ligações carregadas (e.g., fosforotiolatos, fosforoditiolatos, etc.), os que contêm partes pendentes, tais como, por exemplo, proteínas (e.g., nucleases, toxinas, anticorpos, péptidos de sinalização, poli-L-lisina, etc.), os com intercaladores (e.g., acridina, psoraleno, etc.), os que contêm agentes quelante (e.g., metais, metais radioactivos, boro, metais oxidativos, etc.), os que contêm alquilantes, os que contêm ligações modificadas (e.g., ácido nucleicos alfa anoméricos, etc.), bem como formas não modificadas de polinucleótido(s). Além disso, qualquer dos grupos hidroxilo presentes usualmente nos açúcares podem ser substituídos, por exemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos de protecção padrão, ou activados para preparar ligações adicionais para nucleótidos adicionais ou podem ser conjugados a suportes sólidos ou semi-sólidos. O terminal OH 5' e 3' pode ser fosforilado ou substituído com partes aminas ou agentes de capuz orgânicos de 1 a 20 átomos de carbono. Podem também ser derivatizados outros hidroxilos com grupos de protecção padrão. Os polinucleótidos podem também conter formas análogas de açúcares de ribose ou desoxirribose que são geralmente conhecidas na arte, incluindo, por exemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- ou 2'-azido-ribose, análogos carbocíclicos de açúcar, açúcares α anoméricos, açúcares epiméricos tais como arabinose, xiloses ou lixoses, açúcares piranose, açúcares furanose, sedo-heptuloses, análogos acíclicos e análogos de nucleósido abásicos tais como metilribósido. Pode substituir-se uma ou mais ligações fosfodiéster por grupos de ligação alternativos. Estes grupos de ligação alternativos

incluem, entre outros, concretizações em que o fosfato é substituído por P(O)S("tiolato"), P(S)S ("ditiolato"), "(O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO ou CH₂ ("formacetal") nos quais cada R ou R' é independentemente H ou alquilo substituído ou não substituído (1-20 C.) contendo opcionalmente uma ligação éter (-O-), arilo, alcenilo, cicloalquilo, cicloalcenilo ou araldilo. Nem todas as ligações num polinucleótido têm que ser idênticas. A descrição anterior aplica-se a todos os polinucleótidos aqui referidos, incluindo ARN e ADN.

"Oligonucleótido" tal como aqui utilizado, refere-se em geral a polinucleótidos pequenos, em geral de cadeia única, em geral sintéticos que têm geralmente, mas não necessariamente, menos do que 200 nucleótidos de comprimento. As expressões "oligonucleótido" e "polinucleótido" não são mutuamente exclusivas. A descrição anterior para polinucleótidos é igual e completamente aplicável a oligonucleótidos.

A expressão "factor de crescimento de hepatócitos" ou "HGF", tal como aqui utilizada, refere-se, excepto indicação específica ou contextual em contrário, a qualquer polipéptido de HGF nativo ou variante (quer nativo, quer sintético) que é capaz de activar a via de sinalização HGF/c-met em condições que permitem que tal processo ocorra. A expressão "HGF de tipo selvagem" refere-se geralmente a um polipéptido incluindo uma sequência de aminoácidos de uma proteína HGF de ocorrência natural. A expressão "sequência HGF de tipo selvagem" refere-se genericamente a uma sequência de aminoácidos encontrada num HGF de ocorrência natural.

"Cadeia β de HGF activada" ou suas variações refere-se a qualquer cadeia β de HGF com a conformação que é adoptada pela cadeia β de HGF de tipo selvagem por conversão de proteína HGF de tipo selvagem de uma forma em cadeia única para uma forma em 2 cadeias (i.e., cadeia α e β), em que a referida conversão resulta pelo menos em parte da clivagem entre resíduo 494 e resíduo 495 da proteína HGF de tipo selvagem. Em algumas concretizações, a referida conformação refere-se especificamente à conformação do domínio de activação do domínio do tipo protease da cadeia β . Em algumas concretizações, a referida conformação refere-se ainda mais

especificamente à conformação da região do local activo do domínio do tipo protease da cadeia β . Em geral, a adopção da referida conformação revela um local de ligação c-met, tal como aqui descrito.

As expressões "anticorpo" e "imunoglobulina" são utilizadas indiferentemente no sentido mais lato e incluem anticorpos monoclonais (e.g., anticorpos de comprimento completo ou monoclonais intactos), anticorpos policlonais, anticorpos multivalentes, anticorpos multiespecíficos (e.g., anticorpos biespecíficos desde que apresentem a actividade biológica pretendida) e podem também incluir determinados fragmentos de anticorpos (tal como aqui descrito mais detalhadamente). Um anticorpo pode ser humano, humanizado e/ou amadurecido por afinidade.

Os "fragmentos de anticorpo" incluem apenas uma parte de um anticorpo intacto, em que a parte retém de preferência pelo menos uma, de preferência a maioria ou todas, as funções normalmente associadas com essa parte quando presente num anticorpo intacto. Numa concretização, um fragmento de anticorpo inclui um local de ligação de antigénio do anticorpo intacto e assim retém a capacidade de ligar antigénio. Noutra concretização, um fragmento de anticorpo, por exemplo um que inclui a região Fc, retém pelo menos uma das funções biológicas normalmente associadas com a região Fc quando presente num anticorpo intacto, tal como ligação FcRn, modulação de semivida de anticorpo, função ADCC e ligação de complemento. Numa concretização, um fragmento de anticorpo é um anticorpo monovalente que tem um tempo de semivida *in vivo* substancialmente semelhante ao anticorpo intacto. E.g., tal fragmento de anticorpo pode incluir um braço de ligação de antigénio ligado a uma sequência Fc capaz de conferir estabilidade do fragmento *in vivo*.

A expressão "anticorpo monoclonal" tal como aqui utilizada refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogénea, i.e., os anticorpos individuais que constituem a população são idênticos excepto possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em pequenas quantidades. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único antigénio. Além

disso, contrariamente a preparações de anticorpo policlonal que incluem tipicamente anticorpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no antigénio.

Os anticorpos monoclonais aqui incluídos especificamente incluem anticorpos "quiméricos" nos quais uma parte da cadeia pesada e/ou leve é idêntica ou homóloga às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencente a uma determinada classe ou subclasse de anticorpos, enquanto a restante cadeia(s) é idêntica ou homóloga às sequências correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos de tais anticorpos, desde que eles apresentam a actividade biológica pretendida (patente U.S. N.º 4 816 567; e Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

As formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (e.g., murinos) são anticorpos quiméricos que contêm a sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Na sua maioria, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) nas quais são substituídos resíduos de uma região hipervariável do receptor por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo dador) tal como ratinho, rato, coelho ou primatas não humanos com a especificidade, afinidade e capacidade pretendidas. Em alguns casos, substituem-se resíduos da região de esqueleto (FR) da imunoglobulina humana por resíduos correspondentes não humanos. Além disso, os anticorpos humanizados podem incluir resíduos que não se encontram no anticorpo receptor ou no anticorpo dador. Estas modificações são efectuadas para refinar adicionalmente o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado incluirá substancialmente pelo menos um e tipicamente dois domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as ansas hipervariáveis correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as FR são as de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado incluirá também opcionalmente pelo menos uma parte de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Para detalhes adicionais, consultar Jones *et al.*, Nature 321:522-

525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Consultar também os seguintes artigos de revisão e referências lá citadas: Vaswani e Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle e Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

Um "anticorpo humano" é aquele que tem uma sequência de aminoácidos que corresponde à de um anticorpo produzido por um humano e/ou foi produzido utilizando qualquer das técnicas para preparar anticorpos humanos tal como aqui revelado. Esta definição de um anticorpo humano exclui especificamente um anticorpo humanizado incluindo resíduos de ligação de antigénio não humanos.

Um anticorpo "amadurecido por afinidade" é aquele com uma ou mais alterações em uma ou mais das suas CDR, resultando assim numa melhoria da afinidade do anticorpo para com o antigénio, comparativamente a um anticorpo parental que não tem essa(s) alteração(ões). Os anticorpos amadurecidos por afinidade terão afinidades nanomolar ou mesmo picomolar para com o antigénio alvo. Os anticorpos amadurecidos por afinidade são produzidos por procedimentos conhecidos na arte. Marks *et al.* *Bio/technology* 10:779-783 (1992) descreve maturação por afinidade por permuta de domínios VH e VL. Descreve-se mutagénese aleatória de resíduos de CDR e/ou de esqueleto em: 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); e Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Um anticorpo de "bloqueio" ou um anticorpo "antagonista" é aquele que inibe ou reduz a actividade biológica do antigénio a que se liga (e.g., cadeia β de HGF activada ou local/epítipo em c-met ao qual se liga HGF β activada). Os anticorpos de bloqueio ou anticorpos antagonistas preferidos inibem substancial ou completamente a actividade biológica do antigénio.

Um "anticorpo agonista", tal como aqui utilizado, é um anticorpo que mimetiza pelo menos uma das actividades funcionais de um polipéptido de interesse (e.g., um anticorpo podia proporcionar pelo menos uma das funções de activação de c-met da cadeia β de HGF activada).

Uma "doença" é uma condição que podia beneficiar de tratamento com uma substância/molécula ou método do invento. Tal inclui doenças crónicas ou agudas ou doenças incluindo as condições patológicas que predispõe o mamífero à doença em causa. Exemplos não limitantes de doenças a serem tratadas aqui incluem tumores malignos e benignos; malignidades não leucemias e linfóides; doenças neuronais, gliais, astrocíticas, hipotalâmicas e outras doenças glandulares, macrofágicas, epiteliais, estromais e blastocélicas; e doenças inflamatórias, imunológicas e outras relacionadas com angiogénese.

As expressões "doença proliferativa celular" e "doença proliferativa" referem-se a doenças que estão associadas a algum grau de proliferação celular anómalo. Numa concretização, a doença proliferativa celular é cancro.

"Tumor", tal como aqui utilizado, refere-se a qualquer crescimento e proliferação de células neoplásicas, quer maligno, quer benigno, e todas as células e tecidos pré-cancerosos e cancerosos. As expressões "cancro", "canceroso", "doença proliferativa celular", "doença proliferativa" e "tumor" não são mutuamente exclusivas tal como aqui referidas.

As expressões "cancro" e "canceroso" referem-se ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é caracterizada tipicamente por crescimento/proliferação celular desregulada. Exemplos de cancro incluem, entre outros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia. Exemplos mais particulares de tais cancros incluem cancro das células escamosas, cancro de células pequenas do pulmão, cancro de células não pequenas do pulmão, adenocarcinoma do pulmão, carcinoma escamoso do pulmão, cancro do peritoneu, cancro hepatocelular, cancro gastrointestinal, cancro pancreático, glioblastoma, cancro cervical, cancro dos ovários, cancro do fígado, cancro da bexiga, hepatoma, cancro da mama, cancro do

cólon, cancro colorrectal, carcinoma do endométrio ou uterino, carcinoma das glândulas salivares, cancro do rim, cancro do fígado, cancro da próstata, cancro da vulva, cancro da tiróide, carcinoma hepático e vários tipos de cancros da cabeça e pescoço.

Tal como aqui utilizado, "tratamento" refere-se a intervenção clínica numa tentativa para alterar o decurso natural do indivíduo ou célula a ser tratada e pode ser efectuado para profilaxia ou durante o decurso de patologia clínica. Os efeitos pretendidos do tratamento incluem prevenção de ocorrência ou recorrência de doença, alívio de sintomas, diminuição de quaisquer consequências patológicas da doença directas ou indirectas, prevenção de metástases, diminuição da taxa de progressão da doença, melhoria ou palição do estado da doença e remissão ou prognóstico melhorado. Em algumas concretizações, utilizam-se anticorpos do invento para atrasar o desenvolvimento de uma doença.

Uma "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante períodos de tempo necessários para conseguir o resultado terapêutico ou profilático pretendido.

Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" de uma substância/molécula, agonista ou antagonista do invento pode variar de acordo com factores tais como o estado da doença, idade, sexo e peso do indivíduo e a capacidade da substância/molécula, agonista ou antagonista desencadear uma resposta pretendida no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também aquela em que quaisquer efeitos tóxicos ou adversos da substância/molécula, agonista ou antagonista são ultrapassados pelos efeitos benéficos terapêuticos. Uma "quantidade eficaz profilacticamente" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante períodos de tempo necessários para atingir o resultado profilático pretendido. Tipicamente, mas não necessariamente, utiliza-se uma dose profilática em indivíduos antes da doença ou num estágio inicial da doença, em que a quantidade profilacticamente eficaz será inferior à quantidade terapeuticamente eficaz.

A expressão "agente citotóxico" tal como aqui utilizada refere-se a uma substância que inibe ou previne a função de células e/ou causa a destruição de células. Pretende-se que a expressão inclua isótopos radioactivos (e.g., At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapêuticos e.g. metotrexato, adriamicina, alcalóides de vinca (vincristina, vinblastina, etoposido), doxorubicina, melfalano, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina ou outros agentes de intercalação, enzimas e seus fragmentos tais como enzimas nucleolíticas, antibióticos e toxinas tais como toxinas de moléculas pequenas ou toxinas activas enzimaticamente de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo seus fragmentos e/ou variantes e os vários agentes antitumorais ou anticancerosos revelados seguidamente. Descrevem-se seguidamente outros agentes citotóxicos. Um agente tumoricida causa destruição de células de tumor.

Um "agente quimioterapêutico" é um composto químico útil no tratamento de cancro. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem agentes alquilantes tais como tiotepa e ciclosfosfamida CYTOXAN®; alquilsulfonatos tais como bussulfano, improssulfano e pipossulfano; aziridinas tais como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); uma camptotecina (incluindo o análogo sintético topotecano); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo os seus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina I e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM 1); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictina; espongistatina; mostardas de azoto tais como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracilo; nitrosureias tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimustina; antibióticos tais como os antibióticos enediino (e.g., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gama II e caliqueamicina omega II (consultar,

e.g., Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluindo dinemicina A; bisfosfonatos, tais como clodronato; uma esperamicina; bem como cromóforo neocarzinostatina e cromóforos antibióticos de cromoproteína enedina relacionados), aclacinomisinias, actinomicina, autramicina, azasserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina ADRIAMYCIN® (incluindo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina e desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tais como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tais como metotrexato e 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tais como denopterin, metotrexato, pteropterin, trimetrexato; análogos de purina tais como fludarabina, 6-mercaptipurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; androgénios tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; restabelecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamidoglicósido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; uma epotilona; etoglúcido; nitrato de gálio; hidroxiiureia; lentinano; lonidainina; maitansinóides tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenameto; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etil-hidrazida; procarbazona; complexos de polissacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermânio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C");

ciclofosfamida; tiotepa; taxóides, e.g., paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ isento de Cremophor, formulação de paclitaxel de nanopartículas concebidas racionalmente com albumina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) e doxetaxel TAXOTERE® (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, França); clorambucilo; gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina; platina; etoposido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE®; novantrona; teniposido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinóides tais como ácido retinóico; capecitabina; e sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de qualquer dos anteriores.

Também se incluem na definição de “agente quimioterapêutico” anterior agentes anti-hormonais que actuam regulando ou inibindo a acção de hormonas em tumores, tais como anti-estrogénios e moduladores de receptores de estrogénio selectivos (SERM), incluindo, por exemplo, tamoxifeno (incluindo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona e toremifeno FARESTON; inibidores de aromatase que inibem a enzima aromatase, que regulam a produção de estrogénio nas cápsulas supra-renais, tais como, por exemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestania, fadrozole, vorozole RIVISOR®, letrozole FEMARA® e anastrozole ARIMIDEX®; e anti-androgénios tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida e goserelina; bem como troxacitabina (um análogo de citosina nucleósido de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos anti-sentido, particularmente os que inibem expressão de genes em vias de sinalização implicadas em proliferação celular aberrante, tais como, por exemplo, PKC-alfa, Ralf e H-Ras; ribozimas tais como um inibidor de expressão de VEGF (e.g., ribozima ANGIOZYME®) e um inibidor de expressão de HER2; vacinas tais como vacinas de terapia génica, por exemplo, vacina ALLOVECTIN®, vacina LEUVECTIN® e vacina VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; inibidor de topoisomerase 1

LURTOTECAN®; rnrH ABARELIX®; e sais, ácidos ou derivados farmacêuticamente aceitáveis de qualquer dos anteriores.

Um "agente inibidor de crescimento" quando aqui utilizado refere-se a um composto ou composição que inibe o crescimento de uma célula cujo crescimento é dependente de activação HGF/c-met *in vitro* ou *in vivo*. Assim, o agente inibidor de crescimento pode ser aquele que reduz significativamente a percentagem de células dependentes de HGF/c-met na fase S. Os exemplos de agentes inibidores de crescimento incluem agentes que bloqueiam a progressão do ciclo celular (num local diferente da fase S), tais como agentes que induzem paragem G1 e paragem da fase M. Os bloqueadores de fase M clássicos incluem as vincas (vincristina e vinblastina), taxanos e inibidores de topoisomerase II tais como doxorrubicina, epirrubicina, daunorrubicina, etoposido e bleomicina. Os agentes que param G1 também extravasam para paragem de fase S, por exemplo, agentes alquilantes de ADN tais como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracilo e ara-C. Pode encontrar-se informação adicional em *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, ed., capítulo 1, intitulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente p. 13. Os taxanos (paclitaxel e docetaxel) são fármacos anticancerosos derivados de árvores teixos. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado do teixo europeu, é um análogo semi-sintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel e docetaxel promovem a montagem de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina e estabilizam microtúbulos evitando a despolimerização, que resulta na inibição de mitose nas células.

"Doxorrubicina" é um antibiótico antraciclina. O nome químico completo de doxorrubicina é (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetra-hidro-6,8,11-tri-hidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenediona.

Construção de vector

As sequências de polinucleótidos que codificam os polipéptidos aqui descritos podem ser obtidas utilizando

técnicas recombinantes padrão. As sequências de polinucleótidos pretendidas podem ser isoladas e sequenciadas a partir de fontes de células adequadas. As fontes de células para anticorpos incluiriam células que produzem anticorpos tais como células de hibridoma. Alternativamente, podem sintetizar-se polinucleótidos utilizando técnicas de sintetizador de nucleótidos ou PCR. Uma vez obtidas, as sequências que codificam as imunoglobulinas são inseridas num vector recombinante capaz de replicar e expressar polinucleótidos heterólogos numa célula hospedeira. Podem ser utilizados muitos vectores que estão disponíveis e são conhecidos na arte para o objectivo do presente invento. A selecção de um vector adequado dependerá principalmente do tamanho dos ácidos nucleicos a serem inseridos no vector e da célula hospedeira específica a ser transformada com o vector. Cada vector contém vários componentes, dependendo da sua função (amplificação ou expressão de polinucleótido heterólogo ou ambas) e a sua compatibilidade com a célula hospedeira específica na qual reside. Os componentes do vector incluem geralmente, mas não se limitam a: uma origem de replicação (em particular quando o vector é inserido numa célula procariótica), um gene marcador de selecção, um promotor, um local de ligação de ribossoma (RBS), uma sequência de sinalização, a inserção de ácido nucleico heterólogo e uma sequência de terminação de transcrição.

Em geral, utilizam-se vectores de plasmídeo que contêm sequências de replicação e de controlo que são derivados de uma espécie compatível com a célula hospedeira conjuntamente com estes hospedeiros. O vector usualmente transporta um local de replicação, bem como sequências de marcação que são capazes de proporcionar selecção fenotípica de células transformadas. Por exemplo, *E. coli* é tipicamente transformada utilizando pBR322, um plasmídeo derivado de uma espécie de *E. coli*. O pBR322 contém genes que codificam resistência a ampicilina (Amp) e tetraciclina (Tet) e assim proporciona uma forma fácil de identificar células transformadas. O pBR322, os seus derivados, ou outros plasmídeos microbianos ou bacteriófagos podem também conter, ou ser modificados para conter, promotores que podem ser utilizados pelo organismo microbiano para expressão de proteínas endógenas.

Além disso, os vectores de fago contendo sequências de replicação e de controlo que são compatíveis com o microrganismo hospedeiro podem ser utilizados como vectores de transformação conjuntamente com estes hospedeiros. Por exemplo, podem utilizar-se bacteriófagos tais como λ GEM.TM.-11 para preparar um vector recombinante que pode ser utilizado para transformar células hospedeiras susceptíveis tais como *E. coli* LE392.

Podem ser utilizados no presente invento quer promotores constitutivos, quer indutíveis, de acordo com as necessidades de uma determinada situação, que podem ser avaliadas por um perito na arte. É bem conhecido um elevado número de promotores reconhecidos por uma variedade de células hospedeiras potenciais. O promotor seleccionado pode ser ligado operacionalmente a ADN cistrónico que codifica um polipéptido aqui descrito por remoção do promotor do ADN fonte através de digestão com enzimas de restrição e inserção da sequência de promotor isolada no vector de escolha. Podem ser utilizados tanto a sequência de promotor nativa, como vários promotores heterólogos para dirigir amplificação e/ou expressão dos genes alvo. No entanto, são preferidos os promotores heterólogos, já que em geral permitem maior transcrição e maiores rendimentos de gene alvo expresso comparativamente ao promotor de polipéptido alvo nativo.

Os promotores adequados para utilização com hospedeiros procarióticos incluem o promotor PhoA, os sistemas de promotor de β -galactamase e lactose, um sistema de promotor de triptofano (*trp*) e promotores híbridos tais como promotor *tac* ou *trc*. No entanto, são também adequados outros promotores que são funcionais em bactérias (tais como outros promotores bacterianos ou de fagos conhecidos). As suas sequências de nucleótidos foram publicadas, permitindo assim que um perito na arte os ligue operacionalmente a cistrões que codificam as cadeias leve e pesada alvo (Siebenlist *et al.* (1980) *Cell* 20: 269) utilizando ligantes ou adaptadores para fornecer quaisquer locais de restrição necessários.

Em algumas concretizações, cada cistrão dentro de um vector recombinante inclui uma componente de sequência de sinalização de excreção que dirige translocação dos polipéptidos expressos através de uma membrana. Em geral, a

sequência de sinalização pode ser um componente do vector ou pode ser uma parte do ADN de polipéptido alvo que é inserida no vector. A sequência de sinalização seleccionada para os objectivos deste invento deve ser aquela que é reconhecida e processada (i.e. clivada por uma peptidase de sinalização) pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procarióticas que não reconhecem, nem processam as sequências de sinalização nativas para os polipéptidos heterólogos, a sequência de sinalização é substituída por uma sequência de sinalização procariótica seleccionada, por exemplo, do grupo que consiste em líderes da fosfatase alcalina, penicilinase, Ipp ou enterotoxina II estável ao calor (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA e MBP.

As células hospedeiras procarióticas adequadas para expressar polipéptidos incluem arqueobactérias e eubactérias, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos. Exemplos de bactérias úteis incluem *Escherichia* (e.g., *E. coli*), bacilos (e.g., *B. subtilis*), enterobactérias, espécies de *Pseudomonas* (e.g., *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* ou paracocos. De preferência, utilizam-se células Gram-negativas. De preferência, a célula hospedeira deve excretar quantidades mínimas de enzimas proteolíticas e pode, caso se pretenda, incorporar inibidores de protease adicionais na cultura celular.

Produção de polipéptidos

As células hospedeiras são transformadas ou transfectadas com os vectores de expressão descritos anteriormente e cultivadas em meio nutriente convencional modificado como necessário para induzir promotores, seleccionar produtos de transformação ou amplificar os genes que codificam as sequências pretendidas.

A transfecção refere-se a absorção de um vector de expressão por uma célula hospedeira quer sejam ou não de facto expressas as sequências de codificação. São conhecidos numerosos métodos de transfecção pelos peritos na arte, por exemplo, precipitação com CaPO_4 e electroporação. A transfecção bem sucedida é geralmente reconhecida quando

ocorre qualquer indicação da operação deste vector dentro da célula hospedeira.

A transformação significa introduzir ADN no hospedeiro procariótico de modo que o ADN seja replicável, quer como um elemento extracromossómico, quer integrando o cromossoma. Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é efectuada utilizando técnicas padrão adequadas a tais células. O tratamento com cálcio, utilizando cloreto de cálcio, é geralmente usado para células bacterianas que contêm barreiras de paredes celulares substanciais. Outro método para transformação utiliza polietilenoglicol/DMSO. Ainda outra técnica utilizada é a electroporação.

As células procarióticas utilizadas para produzir os polipéptidos do invento são cultivadas em meios conhecidos na arte e adequados para cultura das células hospedeiras seleccionadas. Exemplos de meios adequados incluem meio Luria (LB) com os suplementos de nutrientes necessários. Em concretizações preferidas, os meios também contêm um agente de selecção, seleccionado com base na construção do vector de expressão, para permitir crescimento selectivo de células procarióticas contendo o vector de expressão. Por exemplo, adiciona-se ampicilina aos meios para crescimento de células que expressam o gene de resistência à ampicilina.

Podem também ser incluídos quaisquer suplementos necessários, além de fontes de carbono, azoto e fosfato inorgânico, em concentrações adequadas sozinhos ou como uma mistura com outro suplemento ou meio tal como uma fonte de azoto complexa. Opcionalmente o meio de cultura pode conter um ou mais agentes redutores seleccionados do grupo que consiste em glutathiona, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol e ditiotretitol.

As células hospedeiras procarióticas são cultivadas a temperaturas adequadas. Para cultura de *E. coli*, por exemplo, a temperatura preferida está na gama de cerca de 20°C a cerca de 39°C, com maior preferência desde cerca de 25°C a cerca de 37°C, ainda com maior preferência a cerca de 30°C. O pH do meio pode ser qualquer pH na gama de cerca de 5 a cerca de 9, dependendo principalmente do organismo hospedeiro. Para

E. coli, o pH é de preferência desde cerca de 6,8 a cerca de 7,4, e com maior preferência cerca de 7,0.

Caso se utilize um promotor indutível no vector de expressão, a expressão de proteína é induzida sob condições adequadas para a activação do promotor. Por exemplo, caso se utilize um promotor PhoA para controlar a transcrição, as células hospedeiras transformadas podem ser cultivadas num meio com fosfato limitante para indução. Podem ser utilizados vários outros indutores, de acordo com a construção de vector utilizada, tal como é conhecido na arte.

Os polipéptidos aqui descritos expressos num microrganismo podem ser excretados para o periplasma das células hospedeiras e dele recuperados. A recuperação de proteína envolve tipicamente ruptura do microrganismo, geralmente por meios tais como choque osmótico, tratamento com ultra-sons ou lise. Uma vez rompidas as células, os resíduos celulares ou células completas podem ser removidas por centrifugação ou filtração. As proteínas podem ser purificadas adicionalmente, por exemplo, por cromatografia em resina de afinidade. Alternativamente, as proteínas podem ser transportadas para o meio de cultura e isoladas a partir deste. As células podem ser removidas da cultura e o sobrenadante de cultura filtrado e concentrado para purificação adicional das proteínas produzidas. Os polipéptidos expressos podem ser isolados adicionalmente e identificados utilizando métodos usualmente conhecidos, tais como fraccionamento em colunas de imunoafinidade ou permuta iónica; precipitação com etanol; HPLC de fase reversa; cromatografia em sílica ou numa resina de permuta catiónica tal como DEAE; focagem isoeléctrica; SDS-PAGE; precipitação com sulfato de amónio; filtração em gel utilizando, por exemplo, Sephadex G-75; resinas de afinidade hidrófobas, afinidade de ligando utilizando um antigénio adequado imobilizado numa matriz e ensaio de hibridação de "Western".

Além das células hospedeiras procarióticas, os sistemas de células hospedeiras eucarióticas estão também bem estabelecidos na arte. Os hospedeiros adequados incluem linhas de células de mamíferos, tais como CHO, e células de insecto tais como as descritas seguidamente.

Purificação de polipéptidos

Os polipéptidos que são produzidos podem ser purificados para obter preparações que são substancialmente homogêneas para ensaios e utilizações adicionais. Podem ser utilizados métodos de purificação de proteínas padrão conhecidos na arte. Os seguintes procedimentos são exemplos de procedimentos de purificação adequados: fraccionamento em colunas de imunoafinidade ou de permuta iónica, precipitação com etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica ou numa resina de permuta catiónica tal como DEAE, cromatofocagem, SDS-PAGE, precipitação com sulfato de amónio e filtração em gel utilizando, por exemplo, Sephadex G-75.

Métodos do invento

O invento proporciona vários métodos baseados na revelação que HGF β activado é capaz de dirigir ligação a c-met e que tal ligação pode ser inibida com a substância ou molécula apropriadas.

Podem utilizar-se várias substâncias ou moléculas (incluindo péptidos, etc.) como agentes terapêuticos. Essas substâncias ou moléculas podem ser formuladas de acordo com métodos conhecidos para preparar composições farmacologicamente úteis, pelas quais o seu produto é combinado numa mistura com um veículo transportador farmacologicamente aceitável. Preparam-se formulações terapêuticas para armazenamento por mistura do ingrediente activo apresentando o grau de pureza pretendido com transportadores, excipientes ou estabilizantes aceitáveis fisiologicamente opcionais (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edição, Osol, A. ed. (1980)), sob a forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Os transportadores, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para os recebedores nas dosagens e concentrações utilizadas e incluem tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico; polipéptidos de baixo peso molecular (menor que cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona, aminoácidos tais como glicina,

glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos e outros hidratos de carbono incluindo glucose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; álcoois de açúcar tais como manitol ou sorbitol; contra-íões formadores de sal tal como sódio; e/ou tensioactivos não iónicos tais como TWEENT[™], PLURONICS[™] ou PEG.

As formulações a ser utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Tal é facilmente conseguido por filtração através de membranas de filtração estéreis, antes ou depois de liofilização e reconstituição.

As composições farmacêuticas aqui são geralmente colocadas num recipiente com um orifício de acesso estéril, por exemplo, um saco ou frasco de solução intravenosa com uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

A via de administração é de acordo com métodos conhecidos, e.g. injeção ou infusão pelas vias intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intra-ocular, intra-arterial ou intralesional, administração tópica ou por sistemas de libertação prolongada.

As dosagens e concentrações de fármaco pretendidas de composições farmacêuticas do presente invento podem variar dependendo da utilização específica pretendida. A determinação da dosagem ou via de administração apropriadas encontra-se abrangida pela perícia de um médico normal. A experimentação animal proporciona orientação fidedigna para a determinação de doses eficazes para terapia humana. A gradação inter-espécies de doses eficazes pode ser efectuada seguindo os princípios estabelecidos por Mordenti, J. e Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" em *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi *et al.*, ed., Pergamon Press, New York 1989, p. 42-96.

Quando se utiliza administração *in vivo* de uma substância ou molécula do invento, as quantidades normais de dosagem podem variar de cerca de 10 ng/kg até 100 mg/kg ou mais de peso corporal de mamífero por dia, de preferência cerca de 1 µg/kg/dia a 10 mg/kg/dia, dependendo da via de administração. Proporciona-se orientação relativamente a

dosagens e métodos de entrega específicos na literatura; consultar, por exemplo, patentes U.S. n.º 4 657 760; 5 206 344; ou 5 225 212. Antecipa-se que formulações diferentes serão eficazes para compostos de tratamento diferentes e doenças diferentes, que a administração tendo como alvo um órgão ou tecido, por exemplo, pode necessitar de entrega de um modo diferente daquela de outro órgão ou tecido.

Nos casos em que se pretende administração com libertação sustentada de uma substância ou de uma molécula numa formulação com características de libertação adequadas para o tratamento de qualquer doença que necessite de administração da substância ou molécula, está contemplada a microencapsulação da substância ou molécula. Efectuou-se com sucesso a microencapsulação de proteínas recombinantes para libertação sustentada de hormona de crescimento humana (rhGH), interferão- (rhIFN-), interleucina-2 e 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," em *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell e Newman, ed., (Plenum Press: New York, 1995), p. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; e patente U.S. n.º 5 654 010.

As formulações com libertação prolongada destas proteínas foram desenvolvidas utilizando polímero de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) devido à sua biocompatibilidade e vasta gama de propriedades biodegradáveis. Os produtos de degradação de PLGA, ácidos láctico e glicólico, podem ser depurados rapidamente no interior do corpo humano. Além disso, a degradabilidade deste polímero pode ser ajustada desde meses a anos dependendo do seu peso molecular e composição. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," em: M. Chasin e R. Langer (Ed.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker: New York, 1990), p. 1-41.

Este invento abrange métodos de rastrear compostos para identificar os que inibem sinalização HGF/c-met através de interferência com a cadeia β de HGF e interacção com c-met.

Concebem-se ensaios de rastreio para identificar compostos que se ligam a, ou complexam com a cadeia β de HGF activada (e de preferência não do tipo zimogénio) e/ou c-met (num local em c-met que inibe ligação de cadeia β de HGF activada a c-met) ou interferem de outro modo com a interacção de cadeia 13 de HGF activada com outras proteínas celulares. Tais ensaios de rastreio incluirão ensaios que se podem transformar em rastreio de alta eficiência de bibliotecas químicas, tornando-os particularmente adequados para identificar candidatos a fármacos de moléculas pequenas.

Os ensaios podem ser efectuados em vários formatos, incluindo ensaios de ligação proteína-proteína, ensaios de rastreio bioquímico, imunoensaios e ensaios baseados em células, que estão bem caracterizados na arte.

Todos os ensaios para antagonistas têm em comum o facto de porem em contacto o fármaco candidato com um local na cadeia HGF β (ou seu equivalente) e/ou c-met que está envolvido na interacção de ligação de cadeia β de HGF activada e c-met, sob condições e durante o tempo suficiente para permitir que essas duas componentes interajam.

Em ensaios de ligação, a interacção é ligação e o complexo formado pode ser isolado ou detectado na mistura reaccional. Numa concretização específica, imobiliza-se uma substância ou molécula candidata numa fase sólida, e.g., numa placa de microtitulação, por ligações covalentes ou não covalentes. Geralmente obtém-se ligação não covalente por revestimento da superfície sólida com uma solução da substância/molécula e secagem. Alternativamente, pode utilizar-se uma molécula de afinidade imobilizada, tal como um anticorpo, e.g., um anticorpo monoclonal, específico para a substância/molécula a imobilizar, para ancorar a uma superfície sólida. Efectua-se o ensaio por adição da componente não imobilizada, que pode ser marcada com um marcador detectável, à componente imobilizada, e.g., a superfície revestida contendo a componente ancorada. Quando a reacção se completa, removem-se as componentes que não reagiram, e.g., por lavagem e detectam-se complexos ancorados à superfície sólida. Quando a componente inicialmente não imobilizada tem um marcador detectável, a detecção do marcador imobilizado à superfície

indica que ocorreu complexação. Quando a componente inicialmente não imobilizada não tem um marcador, pode detectar-se complexação, por exemplo, por utilização de um anticorpo marcado especificamente para ligação ao complexo imobilizado.

Se o composto candidato interage mas não se liga a uma cadeia β de HGF activada ou c-met, a sua interacção com o polipéptido pode ser ensaiada por métodos bem conhecidos para detecção de interacções proteína-proteína. Tais ensaios incluem abordagens tradicionais, tais como, e.g., reticulação, co-imunoprecipitação e co-purificação através de gradientes ou colunas de cromatografia. Além disso, as interacções proteína-proteína podem ser monitorizadas por utilização de um sistema genético baseado em levedura descrito por Fields e colaboradores (Fields e Song, *Nature* (London), 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)) tal como revelado por Chevray e Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Muitos activadores de transcrição, tal como GAL4 de levedura, consistem de dois domínios modulares fisicamente discretos, um actuando como um domínio de ligação de ADN e funcionando o outro como um domínio de activação de transcrição. O sistema de expressão de levedura descrito nas publicações anteriores (geralmente referido como "sistema de dois híbridos") tira partido desta propriedade e utiliza duas proteínas híbridas, uma na qual a proteína alvo está fundida com o domínio de ligação de ADN de GAL4 e outra na qual as proteínas activadoras candidatas estão fundidas com o domínio de activação. A expressão de um gene repórter GAL1-lacZ sob o controlo de um promotor activado por GAL4 depende da reconstituição de actividade GAL4 através de interacção proteína-proteína. Detectam-se colónias contendo polipéptidos em interacção com um substrato cromogénico para p-galactosidase. Encontra-se disponível comercialmente de Clontech um kit completo (MATCHMAKER™) para identificar interacções proteína-proteína entre duas proteínas específicas utilizando a técnica de dois híbridos. Este sistema pode também ser alargado para mapear domínios de proteína envolvidos em interacções específicas de proteína assim como para assinalar resíduos de aminoácido que são cruciais para essas interacções.

Os compostos que interferem com a interacção de cadeia β de HGF activada e c-met podem ser ensaiados como se segue: habitualmente prepara-se uma mistura reaccional contendo a cadeia β de HGF activada e c-met (ou seu equivalente que inclui o local de ligação em c-met da cadeia β de HGF activada correspondente) sob condições e durante um intervalo de tempo que permite interacção e ligação dos dois produtos. Para ensaiar a capacidade de um composto candidato inibir ligação, corre-se a reacção na ausência e na presença do composto de ensaio. Além disso, pode adicionar-se um placebo a uma terceira mistura reaccional para servir como controlo positivo. A ligação (formação de complexo) entre o composto de ensaio e a cadeia β de HGF activada e/ou c-met (ou seu equivalente tal como descrito anteriormente) presente na mistura é monitorizada tal como descrito aqui anteriormente. A formação de um complexo na(s) reacção(ões) de controlo mas não na mistura reaccional contendo o composto de ensaio indica que o composto de ensaio interfere com a interacção entre a cadeia β de HGF activada e c-met.

Para ensaiar para inibidores (tal como antagonistas), pode adicionar-se HGF de duas cadeias incluindo cadeia β de HGF activada a uma célula conjuntamente com o composto a rastrear relativamente a uma actividade específica e a capacidade de um composto inibir a actividade de interesse na presença de HGF de duas cadeias, sugere que o composto poderia ser um antagonista para cadeia β de HGF activada, uma propriedade que poderia ser confirmada adicionalmente por determinação da sua capacidade de ligar ou interagir especificamente com cadeia β de HGF activada e não com cadeia α de HGF (e.g., como verificado em HGF de duas cadeias ou HGF de cadeia única).

Exemplos mais específicos de antagonistas potenciais incluem um oligonucleótido (que pode ser um aptâmero) que se liga à cadeia β de HGF activada e/ou ao seu local de ligação em c-met e em particular, anticorpos incluindo, sem limitações, anticorpos monoclonais e policlonais e fragmentos de anticorpo, anticorpos de cadeia única, anticorpos anti-idiotípicos e versões quiméricas ou humanizadas de tais anticorpos ou fragmentos, assim como anticorpos e fragmentos de anticorpo humanos. Alternativamente, um antagonista potencial pode ser uma proteína intimamente relacionada, por

exemplo, uma forma mutada de cadeia β de HGF que reconhece um parceiro de ligação de cadeia β de HGF mas não surte qualquer efeito, inibindo assim de modo competitivo a acção de cadeia β de HGF de tipo selvagem.

Antagonistas potenciais incluem moléculas pequenas que se ligam ao local activo da cadeia β de HGF, o local de ligação de cadeia β de HGF activada em c-met ou outro local de ligação relevante de cadeia β de HGF activada, bloqueando assim a actividade biológica normal da cadeia β de HGF activada. Exemplos de moléculas pequenas incluem, entre outras, moléculas pequenas de péptidos ou do tipo péptido, de preferência péptidos solúveis e compostos sintéticos não peptídico orgânicos ou inorgânicos.

Estas moléculas pequenas podem ser identificadas por qualquer um ou mais dos ensaios de rastreio discutidos aqui anteriormente e/ou por quaisquer outras técnicas de rastreio bem conhecidas dos peritos na arte.

Tal como aqui descrito, uma substância/molécula do invento pode ser um péptido. Os métodos para obter tais péptidos são bem conhecidos na arte e incluem rastrear bibliotecas de péptido para ligantes para um antigénio alvo adequado. Numa concretização, antigénios alvo adequados incluiriam cadeia β de HGF activada (ou partes desta que incluem o local de ligação para c-met), que é aqui detalhadamente descrito. E.g., um antigénio alvo adequado é um polipéptido antigénio de cadeia β de HGF activada tal como aqui descrito ou um polipéptido de HGF de duas cadeias (que, tal como aqui descrito, inclui uma componente de cadeia β de HGF activada). Nalguns casos, nomeadamente nos casos em que uma substância/molécula pretendida é tal que se liga em qualquer grau significativo a cadeia β de HGF activada mas não a cadeia α de HGF e/ou cadeia β de HGF sob a forma de zimogénio, um ligante candidato pode também ser rastreado relativamente a falta de capacidade de ligação substancial relativamente a um polipéptido incluindo cadeia β de HGF sob a forma de zimogénio (i.e., cadeia β de HGF desactivada) (e.g., HGF de cadeia única). As bibliotecas de péptidos são bem conhecidas na arte e podem também ser preparadas de acordo com métodos da arte. Consultar, e.g., Clark *et al.*, patente U.S. N.º 6 121

416. Bibliotecas de péptidos fundidos com uma componente de proteína heteróloga, tal como uma proteína da cápside de fago, são bem conhecidos na arte, e.g., tal como descrito em Clark *et al.*, anteriormente. Numa concretização, um péptido com a capacidade de bloquear ligação de cadeia β de HGF activada a c-met inclui a sequência de aminoácidos VDWVCFRDLGCDWEL, ou suas variantes. Podem gerar-se variantes de um primeiro ligante de péptido por rastreio de mutantes do péptido para obter as características de interesse (e.g., melhor afinidade de ligação ao alvo, melhor farmacocinética, toxicidade reduzida, índice terapêutico melhorado, etc.). As técnicas de mutagénese são bem conhecidas na arte. Além disso, técnicas de rastreio por mutagénese (tal como as que se baseiam em rastreio de alanina) podem ser especialmente úteis para avaliar importância estrutural e/ou funcional de resíduos de aminoácido individuais no interior do péptido.

A determinação da capacidade de uma substância/molécula candidata do invento, tal como um péptido incluindo a sequência de aminoácidos VDWVCFRDLGCDWEL ou suas variantes, para modular sinalização HGF/c-met e/ou actividades biológicas associadas com a referida sinalização, pode ser efectuada por ensaio da capacidade de modular da substância/molécula em ensaios *in vitro* ou *in vivo*, que estão bem estabelecidos na arte, e.g., tal como descrito em 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.

Anticorpos anti-cadeia β de HGF activada

O presente invento proporciona adicionalmente métodos incluindo a utilização de anticorpos anti-cadeia β de HGF activada. Exemplos de anticorpos incluem anticorpos policlonais, monoclonais, humanizados, biespecíficos e heteroconjugados.

1. Anticorpos policlonais

Os anticorpos anti-cadeia β de HGF activada podem incluir anticorpos policlonais. Métodos para preparar anticorpos policlonais são conhecidos pelo perito na arte. Podem desenvolver-se anticorpos policlonais num mamífero, por

exemplo, por uma ou mais injeções de um agente de imunização e caso pretendido, de um adjuvante. Tipicamente, o agente de imunização e/ou adjuvante serão injectados no mamífero por injeções subcutâneas ou intraperitoneais múltiplas. O agente de imunização pode incluir uma cadeia β de HGF activada (ou parte desta) ou uma sua proteína de fusão. Pode ser útil conjugar o agente de imunização com uma proteína que se sabe ser imunogénica no mamífero a ser imunizado. Exemplos de tais proteínas imunogénicas incluem entre outras hemocianina de lapa gigante, albumina sérica, tiroglobulina de bovino e inibidor de tripsina de soja. Exemplos de adjuvantes que podem ser utilizados incluem adjuvante completo de Freund e adjuvante MPL-TDM (monofosforil-lípido A, dicorinomicolato de trealose sintético). O protocolo de imunização pode ser seleccionado pelo perito na arte sem experimentação desnecessária.

2. Anticorpos monoclonais

Os anticorpos anti-cadeia β de HGF activada podem, alternativamente, ser anticorpos monoclonais. Podem preparar-se anticorpos monoclonais utilizando métodos de hibridoma tal como os descritos por Kohler e Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). Num método de hibridoma, imuniza-se tipicamente um ratinho, *hamster* ou outro animal hospedeiro adequado com um agente de imunização para desencadear linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligarão especificamente ao agente de imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*.

O agente de imunização incluirá tipicamente a cadeia β de HGF activada (ou sua parte) ou uma sua proteína de fusão. De um modo geral, utilizam-se linfócitos de sangue periférico ("PBL") caso se pretendam células de origem humana ou utilizam-se células de baço ou células de gânglios linfáticos caso se pretendam fontes de mamífero não humano. Fundem-se então os linfócitos com uma linha celular imortalizada utilizando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) p. 59-103]. Linhas celulares imortalizadas são geralmente células mamíferas transformadas,

nomeadamente células de mieloma de origem de roedor, bovina e humana. Habitualmente utilizam-se linhas celulares de mieloma de rato ou ratinho. Podem cultivar-se as células de hibridoma num meio de cultura adequado que contém de preferência uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células imortalizadas não fundidas. Por exemplo, se as células parentais não apresentarem a enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina ("meio HAT"), substâncias que evitam o crescimento de células deficientes em HGPRT.

São células imortalizadas preferidas as que fundem eficazmente, mantêm nível de expressão de anticorpo elevado e estável pelas células produtoras de anticorpo seleccionadas e são sensíveis a um meio tal como um meio HAT. Linhas celulares imortalizadas mais preferidas são as linhas de mieloma murino, que se podem obter de, por exemplo, Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia e American Type Culture Collection, Manassas, Virgínia. Descreveram-se também linhas celulares de mieloma humano e de heteromieloma ratinho-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) p. 51-63].

O meio de cultura no qual se cultivam as células de hibridoma pode então ser ensaiado para a presença de anticorpos monoclonais dirigidos contra cadeia β de HGF activada. De preferência, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinado por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioensaio (RIA) ou ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Tais técnicas e ensaios são bem conhecidos na arte. A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada pela análise de Scatchard de Munson e Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Após identificação das células de hibridoma pretendidas, podem subclonar-se os clones por procedimentos de diluição limitante e cultivar-se por métodos padrão [Goding, *supra*]. Meios de cultura adequados para este objectivo incluem, por

exemplo, meio de Eagle modificado da Dulbecco e meio RPMI-1640. Alternativamente, podem cultivar-se as células de hibridoma *in vivo* como ascites num mamífero.

Os anticorpos monoclonais excretados pelos subclones podem ser isolados ou purificados a partir do meio de cultura ou fluido de ascites por procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais tais como, por exemplo, proteína A-Sepharose, cromatografia de hidroxilapatite, electroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

Também se podem produzir anticorpos monoclonais por métodos de ADN recombinante, tal como os descritos em patente U.S. n.º 4 816 567. Pode isolar-se facilmente ADN que codifica os anticorpos monoclonais do invento e sequenciar-se utilizando procedimentos convencionais (e.g., por utilização de sondas de oligonucleótidos que são capazes de ligação especificamente a genes que codificam as cadeias pesada e leve de anticorpos murinos). As células de hibridoma do invento servem como uma fonte preferível de tal ADN. Após isolamento, pode inserir-se o ADN em vectores de expressão, que são então transfetados para células hospedeiras tais como células COS de símio, células de ovário de *hamster* chinês (CHO) ou células de mieloma que não produziriam de outro modo proteína imunoglobulina, para obter síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. O ADN pode também ser modificado, por exemplo, por substituição das sequências murinas homólogas pela sequência de codificação para os domínios constantes da cadeia pesada e leve [patente U.S. n.º 4 816 567; Morrison *et al.*, *supra*] ou por acoplamento covalente à sequência de codificação de imunoglobulina de toda ou parte da sequência de codificação para um polipéptido não imunoglobulina. Tal polipéptido não imunoglobulina pode ser substituído pelos domínios constantes de um anticorpo do invento ou pode ser substituído pelos domínios variáveis de um local de combinação de antigénio de um anticorpo do invento para criar um anticorpo bivalente quimérico.

Os anticorpos podem ser anticorpos monovalentes. São bem conhecidos na arte métodos para preparar anticorpos monovalentes. Por exemplo, um método envolve expressão recombinante de cadeia leve e cadeia pesada modificada de

imunoglobulina. A cadeia pesada é truncada geralmente em qualquer ponto na região Fc de modo a evitar reticulação de cadeia pesada. Alternativamente, substituem-se os resíduos de cisteína relevantes por qualquer outro resíduo de aminoácido ou eliminam-se de modo a evitar reticulação.

Também são adequados métodos *in vitro* para preparar anticorpos monovalentes. Pode obter-se digestão de anticorpos para produzir seus fragmentos, nomeadamente, fragmentos Fab, utilizando técnicas de rotina conhecidas na arte.

Podem também gerar-se anticorpos por rastreo de bibliotecas de apresentação de fagos para anticorpos ou fragmentos de anticorpos que se ligam com a afinidade adequada/pretendida à cadeia β de HGF activada (ou equivalente). Tais técnicas são bem conhecidas na arte, e.g., tal como revelado em patente U.S n.º 5 750 373; 5 780 279; 5 821 047; 6 040 136; 5 427 908; 5 580 717 e suas referências.

3. Anticorpos humanos e humanizados

Os anticorpos anti-cadeia β de HGF activada do invento podem incluir adicionalmente anticorpos humanizados ou anticorpos humanos. Formas humanizadas de anticorpos não humanos (e.g., murinos) são imunoglobulinas, cadeias de imunoglobulina ou seus fragmentos (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ou outras subsequências de anticorpos de uma região de ligação de antigénio) quiméricas, que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Anticorpos humanizados incluem imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) nos quais se substituem resíduos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do receptor por resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo dador) tal como um rato, rato ou coelho com a especificidade, afinidade e capacidade pretendidas. Nalguns casos, substituem-se resíduos de esqueleto Fv da imunoglobulina humana pelos correspondentes resíduos não humanos. Os anticorpos humanizados podem também incluir resíduos que não se encontram nem no anticorpo receptor nem nas sequências CDR ou de esqueleto importadas. De um modo geral, o anticorpo humanizado incluirá substancialmente todo de pelo menos um e tipicamente dois, domínios variáveis, no qual todas ou substancialmente todas as

regiões CDR correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as de uma sequência consensual de uma imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado incluirá também optimamente pelo menos uma parte de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana [Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

São bem conhecidos na arte métodos de humanizar anticorpos não humanos. De um modo geral, um anticorpo humanizado tem nele introduzidos um ou mais resíduos de aminoácido de uma fonte que não é humana. Estes resíduos de aminoácido não humanos são muitas vezes denominados resíduos de "importação", que são tipicamente retirados de um domínio variável de "importação". A humanização pode ser essencialmente efectuada seguindo o método de Winter e colaboradores [Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)], pela substituição de CDR ou sequências de CDR de um anticorpo humano pelas sequências correspondentes de roedor. Assim, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (patente U.S. n.º 4 816 567), em que substancialmente menos que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos CDR e possivelmente alguns resíduos FR são substituídos por resíduos de locais análogos em anticorpos de roedor.

Podem também produzir-se anticorpos humanos por utilização de diferentes técnicas conhecidas na arte, incluindo bibliotecas de disposição de fagos [Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. As técnicas de Cole *et al.* e Boerner *et al.* estão também disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) e Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)]. De igual modo, podem produzir-se anticorpos humanos por introdução de locais de imunoglobulina humana em animais transgênicos, e.g., ratinhos nos quais os genes de imunoglobulina endógena foram parcial ou

completamente inactivados. Após provocação, observa-se produção de anticorpo humano com grandes semelhanças em todos os aspectos à observada em humanos, incluindo rearranjo génico, montagem e reportório de anticorpo. Descreve-se esta abordagem, por exemplo, em patentes U.S. n.º 5 545 807; 5 545 806; 5 569 825; 5 625 126; 5 633 425; 5 661 016 e nas seguintes publicações 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 e Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995).

Os anticorpos podem também ser amadurecidos por afinidade utilizando métodos conhecidos de selecção e/ou mutagénese tal como anteriormente descrito. Anticorpos amadurecidos por afinidade preferidos têm uma afinidade que é cinco vezes, com maior preferência 10 vezes, ainda com maior preferência 20 ou 30 vezes superior à do anticorpo inicial (geralmente murino, humanizado ou humano) a partir do qual se preparou o anticorpo maduro.

4. Anticorpos biespecíficos

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos monoclonais, de preferência humanos ou humanizados, que têm especificidades de ligação para pelo menos dois antigénios diferentes. No presente caso, uma das especificidades de ligação é para cadeia β de HGF activada e/ou local de ligação de cadeia P de HGF em c-met, sendo a outra para qualquer outro antigénio e de preferência para uma proteína ou receptor ou subunidade de receptor de superfície celular.

São conhecidos na arte métodos para produzir anticorpos biespecíficos. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos baseia-se na co-expressão de dois pares de cadeia pesada/cadeia leve de imunoglobulina, em que as duas cadeias pesadas têm especificidades diferentes [Milstein e Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)]. Devido à distribuição aleatória de cadeias leves e pesadas estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de dez moléculas de anticorpo diferentes das quais apenas uma tem a

estrutura biespecífica correcta. A purificação da molécula correcta é habitualmente conseguida por etapas de cromatografia de afinidade. Revelam-se procedimentos semelhantes em WO 93/08829, publicada a 13 de Maio de 1993 e em Traunecker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Podem fundir-se domínios variáveis de anticorpo com as especificidades de ligação pretendidas (locais de combinação anticorpo-antigénio) a sequências de domínio constante de imunoglobulina. A fusão é de preferência com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina incluindo pelo menos parte das regiões de dobra, CH2 e CH3. É preferível ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH1) contendo o local necessário para ligação de cadeia leve presente em pelo menos uma das fusões. Inserem-se os ADN que codificam as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e caso pretendido, a cadeia leve de imunoglobulina, em vectores de expressão independentes e co-transfectam-se para um organismo hospedeiro adequado. Para detalhes adicionais de produção de anticorpos biespecíficos consultar, por exemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

De acordo com outra abordagem descrita em WO 96/27011, a interface entre um par de moléculas de anticorpo pode ser concebida racionalmente para maximizar a percentagem de heterodímeros que são recuperados de cultura de células recombinantes. A interface preferida inclui pela menos uma parte da região CH3 do domínio constante de um anticorpo. Neste método, substituem-se uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos pequenas da interface da primeira molécula de anticorpo por cadeias laterais maiores (e.g. tirosina ou triptofano). Criam-se "hiatos" de compensação de tamanho idêntico ou semelhante à(s) cadeia(s) lateral(is) grandes na interface da segunda molécula de anticorpo por substituição de cadeias laterais de aminoácidos grandes por outras mais pequenas (e.g. alanina ou treonina). Tal proporciona um mecanismo para aumentar o rendimento do heterodímero relativamente a outros produtos finais não pretendidos tais como homodímeros.

Podem preparar-se anticorpos biespecíficos como anticorpos completos ou fragmentos de anticorpo (e.g. anticorpos

biespecíficos $F(ab')_2$). Têm sido descritas na literatura técnicas para gerar anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpo. Por exemplo, podem preparar-se anticorpos biespecíficos utilizando ligação química. Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985) descrevem um procedimento no qual anticorpos intactos são clivados proteoliticamente para gerar fragmentos $F(ab')_2$. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente de complexação ditiol arsenito de sódio para estabilizar ditióis vicinais e evitar formação de dissulfureto intermolecular. Os fragmentos Fab' gerados são então convertidos a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados Fab' -TNB é então reconvertido ao Fab' -tiol por redução com mercaptoetilamina e mistura-se então com uma quantidade equimolar do outro derivado Fab' -TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser utilizados como agentes para a imobilização selectiva de enzimas.

Os fragmentos Fab' podem ser recuperados directamente a partir de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) descrevem a produção de uma molécula de anticorpo biespecífico $F(ab')_2$ completamente humanizado. Cada fragmento Fab' foi excretado separadamente de *E. coli* e submetido a acoplamento químico directo *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico assim formado foi capaz de ligar células que sobre-expressam receptor ErbB2 e células T humanas normais, assim como desencadear a actividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumor de mama humano.

Também se descreveram várias técnicas para produzir e isolar fragmentos de anticorpo biespecífico directamente a partir de cultura de células recombinantes. Por exemplo, produziram-se anticorpos biespecíficos utilizando cremalheiras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). Ligaram-se os péptidos de cremalheiras de leucina das proteínas Fos e Jun a partes Fab' de dois anticorpos diferentes por fusão génica. Reduziram-se os homodímeros de anticorpo na região de dobra para formar monómeros e seguidamente reoxidaram-se para formar os heterodímeros de anticorpo. Este método pode também ser utilizado para a

produção de homodímeros de anticorpo. A tecnologia de "diacorpo" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) proporcionou um mecanismo alternativo para produzir fragmentos de anticorpo biespecífico. Os fragmentos incluem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) ligado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) por um ligante que é demasiado curto para permitir emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Assim, os domínios V_H e V_L de um fragmento são forçados a emparelhar com os domínios V_L e V_H complementares de outro fragmento, formando assim dois locais de ligação de antigénio. Relatou-se também outra estratégia para produzir fragmentos de anticorpo biespecífico por utilização de dímeros de Fv de cadeia única (sFv). Consultar, Gruber *et al.*, J. Immunol. 152:5368 (1994).

Abrangem-se também anticorpos com mais de duas valências. Por exemplo, podem preparar-se anticorpos triespecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60 (1991).

Exemplos de anticorpos biespecíficos podem ligar dois epítomos diferentes da cadeia β de HGF activada ou a um epítomo da cadeia β de HGF activada e um epítomo noutra polipeptido (e.g., c-met ou cadeia HGF).

5. Anticorpos heteroconjugados

Encontram-se também abrangidos pelo âmbito do presente invento anticorpos heteroconjugados. Os anticorpos heteroconjugados são compostos por dois anticorpos ligados covalentemente. Tais anticorpos têm sido propostos, por exemplo, para dirigirem células do sistema imunitário a alvos de células indesejáveis [patente U.S. n.º 4 676 980] e para tratamento de infecção por VIH [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Considera-se que os anticorpos podem ser preparados *in vitro* utilizando métodos conhecidos em química de síntese de proteínas, incluindo os que envolvem agentes de reticulação. Por exemplo, podem construir-se imunotoxinas utilizando uma reacção de permuta de dissulfureto ou por formação de uma ligação tioéter. Exemplos de reagentes adequados para este fim incluem iminotiolato e metil-4-

mercaptobutirimidato e os revelados, por exemplo, em patente U.S. n.º 4 676 980.

6. Concepção racional de função efectora

Pode pretender-se modificar o anticorpo do invento relativamente à função efectora de modo a melhorar, e.g., a eficácia do anticorpo no tratamento de cancro. Por exemplo, podem introduzir-se resíduo(s) de cisteína na região Fc, permitindo assim formação de ligação dissulfureto intercadeias nesta região. O anticorpo homodimérico assim gerado pode ter capacidade de internalização melhorada e/ou capacidade melhorada de matar células de forma mediada por complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Consultar Caron *et al.*, *J. Exp Med.*, 176: 1191-1195 (1992) e Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992). Podem também preparar-se anticorpos homodiméricos com actividade antitumoral aumentada utilizando agentes de reticulação heterobifuncionais tal como descrito em Wolff *et al.* *Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, pode conceber-se racionalmente um anticorpo que tem regiões Fc duplas e pode assim apresentar capacidades melhoradas de lise de complemento e ADCC. Consultar Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design*, 3: 219-230 (1989).

7. Imunoconjugados

O invento também se refere a imunoconjugados incluindo um anticorpo conjugado a um agente citotóxico tal como um agente quimioterapêutico, toxina (e.g., uma toxina activa enzimaticamente de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal ou seus fragmentos) ou um isótopo radioactivo (i.e., um radioconjugado).

Descreveram-se anteriormente agentes quimioterapêuticos úteis para a geração de tais imunoconjugados. Toxinas e seus fragmentos activos enzimaticamente que podem ser utilizados incluem cadeia A de difteria, fragmentos não ligantes activos de toxina de difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI,

PAPII e PAP-S), inibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Estão disponíveis vários radionuclídeos para a produção de anticorpos radioconjugados. Exemplos incluem ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y e ^{186}Re . Preparam-se conjugados do anticorpo e do agente citotóxico utilizando vários agentes de acoplamento de proteína bifuncionais tais como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tal como disuccinimidil suberato), aldeídos (tal como glutaraldeído), compostos bis-azido (tal como bis(p-azidobenzoíl)-hexanodiamina), derivados de bis-diazónio (tal como bis-(p-diazónio-benzoíl)-etilenodiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno) e compostos de flúor bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, pode preparar-se uma imunotoxina de ricina tal como descrito em Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). O ácido de 1-isotiocianatobenzil-3-metildietilenotriaminopenta-acético (MX-DTPA) marcado com carbono 14, é exemplo de um agente quelante para conjugação de radionucleótido ao anticorpo. Consultar W094/ 11026.

Noutra concretização, o anticorpo pode ser conjugado com um "receptor" (tal como estreptavidina) para utilização em marcação prévia de tumor como alvo em que o conjugado anticorpo-receptor é administrado ao doente, seguido de remoção de conjugado não ligado de circulação utilizando um agente de depuração e seguido de administração de um "ligando" (e.g., avidina) que está conjugado com um agente citotóxico (e.g., um radionucleótido).

8. Imunolipossomas

Os anticorpos aqui revelados podem também ser formulados como imunolipossomas. Preparam-se lipossomas contendo anticorpo por métodos conhecidos na arte, tal como descrito em Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); e patentes U.S. n.º 4 485 045 e 4 544 545. Revelam-se lipossomas com tempo de circulação melhorado em patente U.S. n.º 5 013 556.

Podem gerar-se lipossomas especialmente úteis pelo método de evaporação de fase reversa com uma composição de lípido incluindo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivatizada com PEG (PEG-PE). Extrudem-se os lipossomas através de filtros de dimensão de poro definida para preparar lipossomas com o diâmetro pretendido. Podem conjugar-se fragmentos Fab' do anticorpo do presente invento com os lipossomas tal como descrito em Martin *et al.*, J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) através de uma reacção de permuta de dissulfureto. Opcionalmente o lipossoma contém no seu interior um agente quimioterapêutico (tal como doxorubicina). Consultar Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst., 81(19); 1484 (1989).

9. Composições farmacêuticas de anticorpos

Podem administrar-se anticorpos assim com outras moléculas identificadas pelos ensaios de rastreio aqui anteriormente revelados, para o tratamento de várias doenças sob a forma de composições farmacêuticas.

Caso se utilizem anticorpos completos como inibidores, prefere-se internalização de anticorpos. Contudo, podem também utilizar-se lipofecções ou lipossomas para entregar uma substância/molécula do invento a células onde tal se pretende. Quando se utilizam fragmentos de anticorpo, prefere-se o menor fragmento de inibição. Por exemplo, com base nas sequências de região variável de um anticorpo, podem conceber-se moléculas de péptido que retêm a capacidade de ligar cadeia β de HGF activada e/ou local de ligação de cadeia β de HGF em c-met e/ou interferem com a interacção entre cadeia β de HGF activada e c-met. Podem sintetizar-se tais péptidos quimicamente e/ou podem produzir-se por tecnologia de ADN recombinante. Consultar, e.g., Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993). Esta formulação pode também conter mais do que um composto activo se necessário para a indicação específica a ser tratada, de preferência aqueles com actividades complementares que não se afectam negativamente entre si. Alternativa ou adicionalmente, a composição pode incluir um agente que melhore a sua função tal como, por exemplo, um agente citotóxico, citoquina, agente

quimioterapêutico ou agente de inibição de crescimento. Tais moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para o objectivo pretendido.

Os ingredientes activos podem também ser aprisionados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou de gelatina e microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas coloidais de entrega de fármacos (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são reveladas em Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*.

As formulações a ser utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Tal consegue-se facilmente por filtração através de membranas de filtração estéreis.

Podem preparar-se preparações de libertação prolongada. Exemplos adequados de preparações de libertação prolongada incluem matrizes semi-permeáveis de polímeros hidrófobos sólidos contendo o anticorpo, cujas matrizes estão na forma de artigos moldados, e.g., filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de libertação prolongada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) ou poli(álcool vinílico)), polilactidos (patente U.S. n.º 3 773 919), copolímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de γ -etilo, etileno-acetato de vinilo não degradável, copolímeros degradáveis de ácido láctico-ácido glicólico tal como o LUPRON DEPOT™ (microesferas injectáveis compostas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Enquanto polímeros tal como etileno-acetato de vinilo e ácido láctico-ácido glicólico permitem a libertação de moléculas ao longo de 100 dias, determinados hidrogéis libertam proteínas durante períodos de tempo mais curtos. Quando os anticorpos encapsulados permanecem no corpo durante um período de tempo longo, podem desnaturar ou agregar em resultado de exposição a humidade a 37°C, resultando numa perda de actividade biológica e possíveis alterações de imunogenicidade. Podem estabelecer-se estratégias racionais para estabilização

dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, caso de revele que o mecanismo de agregação é formação de ligações S-S intermoleculares através de permuta de tiodissulfureto, pode obter-se estabilização por modificação de resíduos sulfidrilo, por liofilização a partir de soluções ácidas, por controlo do teor de humidade, por utilização de aditivos adequados e pelo desenvolvimento de composições específicas de matriz de polímero.

Seguem-se exemplos dos métodos e composições do invento. Considera-se que podem ser levadas à prática várias outras concretizações, dada a descrição geral anteriormente proporcionada.

EXEMPLOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

As formas maduras do domínio EDC de Met (Glu25 a Gln929) contendo uma cauda de 6 His no terminal C foram expressas em células de insecto e purificadas por protocolos padrão seguidamente descritos, de cromatografia quelante de metal Ni-NTA e de filtração em gel. Obteve-se a proteína de fusão Met-IgG tal como anteriormente descrito (Mark et al., 1992).

Expressão e purificação de proteínas HGF β

Expressaram-se proteínas HGF β em células de insecto utilizando o vector de excreção de baculovírus pAcGP67 (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA), que contém uma sequência de sinalização para excreção do produto para o meio. Todas as construções continham uma cauda de 6 His no terminal carboxilo e foram purificadas até à homogeneidade (>95% de pureza) por cromatografia quelante de metal Ni-NTA e de filtração em gel. Para HGF β de tipo selvagem, clonou-se um fragmento de ADNc que codifica a cadeia β de HGF desde os resíduos Val495 [c16] até Ser728 [c250], por PCR de modo a que Val495 [c16] foi inserida imediatamente após a sequência de sinal de excreção. Efectuou-se mutagénesis dirigida ao local utilizando QuikChange™ (Stratagene, La Jolla, CA) com o oligonucleótido 5'CCTAATTATGGATCCACAATTCCTG3' para produzir HGF β contendo uma mutação de Cys604 [c128] para Ser (HGF β)

para evitar eventuais complicações de uma Cys desemparelhada exposta no domínio do tipo protease. Produziram-se os 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], 1699A [c221a] e R702A [c224] tal como anteriormente na construção HGF β (apresentando a mutação C604S). Também se produziu o mutante de HGF β C561S [c78] (i.e., C561S:C604S) tal como anteriormente na construção HGF β de modo a eliminar ambas as cisteínas livres. proHGF β codifica HGF desde os resíduos Asn479 até Ser728 e tem uma mutação R494E efectuada utilizando o oligonucleótido 5'CAAACGAAACAATTGGAAGTTGTAAATGGGATTC-3'. A cisteína não foi alterada nesta construção para permitir possível formação de dissulfureto entre Cys487 e Cys604. A numeração das posições de aminoácido é como se segue: sequência de HGF completo [numeração de quimiotripsinogénio].

Transfectaram-se vectores de baculovírus contendo as inserções pretendidas para células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) em placas de meio TNM-FH através do sistema de expressão Baculogold™ de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Após 2-4 ciclos de amplificação viral, utilizou-se 10 ml de solução-mãe de vírus para infectar 11 células High Five™ (Invitrogen, San Diego, CA) em suspensão a 5×10^5 células/ml em meio TNM-FH. Incubaram-se culturas a 27°C durante 72 h antes de recolher o meio de cultura por centrifugação a 8 000 x g durante 15 min. Aplicou-se meio de cultura de células a 4 ml de coluna de Ni-NTA agarose (Qiagen, Valencia, CA). Após lavagem com 4 volumes de coluna de Tris·HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazole 5 mM, eluíram-se proteínas HGF β com Tris·HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazole 500 mM. Recolheram-se conjuntamente os eluídos e aplicou-se a uma coluna Superdex™-200 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) equilibrada em HEPES 10 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM. Recolheram-se e concentraram-se os picos de proteína utilizando-se um Centriprep™ YM-10 (Millipore, Bedford, MA). Analisaram-se fracções por SDS-PAGE a 12% corado com azul de Coomassie. Verificaram-se todas as mutações por sequenciação de ADN e espectrometria de massa. Determinou-se a concentração de proteína por análise quantitativa de aminoácidos. A sequenciação do terminal N revelou uma único terminal N

correcto presente para proHGF β e HGF β . As proteínas purificadas apresentaram a massa molecular correcta em SDS-PAGE; as múltiplas bandas observadas foram provavelmente devidas a glicosilação heterogénea, consistente com dados de espectrometria de massa apresentando massas moleculares 2 kDa superiores às previstas pela sequência.

Construção, expressão e purificação de proteínas HGF completas

Produziram-se proteínas recombinantes em 11 culturas de células de ovário de hamster chinês (CHO) por transfecção transitória (Peek et al., 2002). Introduziram-se alterações de aminoácidos por mutagénese dirigida ao local (Kunkel, 1985) e verificaram-se por sequenciação de ADN. O meio de expressão (F-12/meio de Eagle modificado da Dulbecco) continha IgG ultra baixo e soro fetal de bovino (FBS) a 1% (v/v) (Gibco, Grand Island, NY). Após 8 dias recolheu-se o meio e suplementou-se com FBS para proporcionar um conteúdo final de 5-10% (v/v). Incubação adicional durante 2-3 dias a 37°C resultou em conversão completa em HGF de cadeia única. Omitiu-se esta etapa para expressão de proHGF, uma forma em cadeia única não clivável que tem alterações de aminoácido no local de activação por clivagem (R494E) e num local susceptível a protease na cadeia α (R424A) (Peek et al., 2002). Purificaram-se proteínas mutantes a partir do meio por cromatografia de permuta catiónica HiTrap-Sepharose SP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) tal como descrito (Peek et al., 2002). A análise por SDS-PAGE (gel de gradiente de 4-20%) sob condições redutoras e coloração com Simply Blue Safestain mostrou que todas as proteínas HGF mutantes eram >95% puras e foram completamente convertidas a heterodímeros α/β com excepção de proHGF, que permaneceu numa forma em cadeia única. A concentração de proteína para cada mutante foi determinada por análise de aminoácidos quantitativa.

Afinidade de ligação de HGF β e Met por ressonância plasmónica de superfície

A afinidade de ligação de HGF β para com Met foi determinada por ressonância plasmónica de superfície utilizando um instrumento Biacore 3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ). Imobilizou-se o domínio ECD de Met num chip CM5 utilizando acoplamento de amina a ~2000 unidades de

ressonância de acordo com as instruções do fabricante. Injectou-se uma série de concentrações de HGF β (i.e., mutante C604S) em HEPES 10 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM na gama de 12,5 nM a 100 nM a um caudal de 20 μ l/min durante 40 s. Deixou-se que a HGF β ligada se dissociasse durante 10 min. Efectuou-se subtracção adequada de valores de base. Obtiveram-se as constantes de velocidade de associação (k_{on}) e dissociação (k_{off}) por um programa de ajuste global fornecido com o instrumento; utilizou-se a razão k_{off}/k_{on} para calcular a constante de dissociação (K_d).

Ligação de HGF β a Met e ELISA de ligação por competição

Revestiram-se placas de microtitulação (Nunc, Roskilde, Dinamarca) durante a noite a 4° C com anticorpo específico de Fc de IgG de coelho anti-humana a 2 μ g/ml (Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA) em tampão de carbonato de sódio a 50 mM, pH 9,6. Após bloqueio com BSA a 1% em tampão HBS (HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM e Tween-20 a 0,1%), adicionou-se proteína de fusão Met-IgG a 1 μ g/ml (Mark et al., 1992) e incubaram-se as placas durante 1 h com agitação suave à temperatura ambiente. Após lavagem com tampão HBS, adicionaram-se proteínas HGF β durante 1 h. Detectou-se HGF β ligado utilizando anti-His-HRP (Qiagen, Valencia, CA) seguido da adição de substrato TMB/H₂O₂ (KPL, Gaithersburg, MD). Parou-se a reacção com H₃PO₄ 1 M e mediu-se a A₄₅₀ num leitor de microplacas Molecular Devices SpectraMax Plus³⁸⁴. A concentração eficaz para proporcionar metade da ligação máxima (EC₅₀) foi determinada através de um ajuste de quatro parâmetros utilizando Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA).

De modo a desenvolver uma ELISA de competição, biotinilou-se HGF β de tipo selvagem utilizando um excesso molar de 20 vezes de biotina-maleimida (Pierce, Rockford, IL) à temperatura ambiente durante 2 h. Trataram-se as placas como anteriormente com excepção que se utilizou HGF β de tipo selvagem biotinilado e detectou-se utilizando HRP-neutravidina (Pierce, Rockford, IL). Os ensaios de competição continham uma mistura de HGF β de tipo selvagem biotinilado 250 nM e diferentes concentrações de proteínas como indicado (e.g., variantes de HGF β não marcados, HGF (i.e., 2 cadeias) ou proHGF (i.e., HGF na forma em cadeia única)). Após incubação

durante 1 h à temperatura ambiente, a quantidade de HGF β de tipo selvagem biotinilado na placa foi medida como anteriormente descrito. Determinaram-se os valores de IC₅₀ por ajuste dos dados a uma equação de quatro parâmetros (Kaleidagraph, Synergy Software, Reading, PA).

Ligação de mutantes de HGF a Met

Preparou-se HGF biotinilado utilizando o kit de biotinilação de imuno-sonda Sigma (Sigma, St. Louis, MO). Revestiram-se placas de microtitulação com anticorpo específico de Fc de IgG de coelho anti-humana como anteriormente. Lavaram-se as placas em PBS com Tween-20 a 0,05% (v/v) seguido de 1 h de incubação com BSA a 0,5% (p/v), Tween-20 a 0,05% em PBS, pH 7,4 à temperatura ambiente. Após lavagem, adicionou-se aos poços HGF biotinilado 1 nM e proteína de fusão Met-IgG 0,2 nM (Mark et al., 1992) conjuntamente com diferentes concentrações de mutantes de HGF, HGF β de tipo selvagem e incubou-se durante 2 h. Após lavagem, detectou-se HGF biotinilado ligado por adição de conjugado de estreptavidina e peroxidase de rábano diluído (1:3000) (Zymed, South San Francisco, CA) seguido de substrato de peroxidase SureBlue TMB e solução de paragem TMB STOP (KPL, Gaithersburg, MD). Mediu-se a A₄₅₀ e determinaram-se os valores de IC₅₀ como anteriormente descrito. Expressaram-se as afinidades relativas de ligação como IC₅₀(mutante)/IC₅₀(HGF de tipo selvagem).

Fosforilação de Met dependente de HGF

O ensaio de activação de receptores quinase (KIRA) foi efectuado como se segue. Destacaram-se culturas confluentes de células de carcinoma de pulmão A549 (CCL-185, ATCC, Manassas, VA), anteriormente mantidas em meio de crescimento (F12 de Ham /DMEM 50:50 (Gibco, Grand Island, NY) contendo FBS a 10% (Sigma, St. Louis, MO), utilizando Accutase (ICN, Aurora, OH) e inocularam-se em placas de 96 poços a uma densidade de 50 000 células por poço. Após incubação durante a noite a 37°C retirou-se o meio de crescimento e privaram-se as células de soro durante 30 a 60 min em meio contendo FBS a 0,1%. Determinou-se a actividade de fosforilação de Met por HGF ou mutantes de HGF a partir da adição de diluições sucessivas desde 500 até 0,2 ng/ml em meio contendo FBS a 0,1 % seguido de uma incubação de 10 min a 37°C, remoção do meio e lise

celular com tampão de lise de células 1X (n.º de catálogo 9803, Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) suplementado com conjunto I de mistura de inibidores de protease 1X (n.º de catálogo 539131, Calbiochem, San Diego, CA). Repetiu-se o mesmo procedimento para cadeia β de HGF, com início a 5 $\mu\text{g/ml}$. Determinou-se inibição de fosforilação de Met dependente de HGF pela cadeia β de HGF a partir da adição de diluições sucessivas desde 156 a 0,06 nM a placas de ensaio seguido de uma incubação de 15 min a 37°C, adição de HGF a 12,5, 25 ou 50 nM, uma incubação adicional de 10 min a 37°C, remoção do meio e lise celular como anteriormente mencionado. Analisaram-se os produtos de lise celular por Met fosforilada através de um ensaio de electroquimioluminescência utilizando um instrumento Bio Veris M-Series (Bio Veris Corporation, Gaithersburg, MD). Marcou-se mAb anti-fosfotirosina 4G10 (Upstate, Lake Placid, NY) com BV-TAG através de química de NHS-éster de acordo com as instruções do fabricante (Bio Veris). Biotinilou-se mAb ECD anti-Met 1928 (Genentech, South San Francisco, CA) utilizando biotin-X-NHS (Research Organics, Cleveland, OH). Diluíram-se o 4G10 marcado com BV-TAG e o mAb anti-Met biotinilado com tampão de ensaio (PBS, Tween-10 a 0,5%, BSA a 0,5%) e adicionou-se a mistura aos produtos de lise celular. Após incubação à temperatura ambiente com agitação vigorosa durante 1,5 a 2 h, adicionaram-se pérolas magnéticas de estreptavidina (Dynabeads, Bio Veris) e incubou-se durante 45 min. Capturaram-se as pérolas com material ligado (anticorpo anti-Met/Met/anticorpo anti-fosfotirosina) através de um magnete aplicado externamente. Após uma etapa de lavagem mediu-se o sinal quimioluminescente gerado pela fonte de luz como unidades relativas de luminescência num instrumento Bio Veris. Para cada experiência, a fosforilação Met induzida pelos mutantes de HGF foi expressa em percentagem do sinal máximo obtido com HGF de duas cadeias.

Ensaio de proliferação

Obtiveram-se BxPC3 (adenocarcinoma pancreático humano; n.º ECACC 93120816) de European Collection of Cell Cultures (CAMR Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire (UK) e utilizaram-se num ensaio de proliferação dependente de HGF. Cultivaram-se células em meio RPMI contendo FCS a 10% (Sigma F-6178, St. Louis, MO), HEPES

10 mM, glutamina 2 mM, 1X penicilina-estreptomicina (Invitrogen 15140-122, Carlsbad, CA), 100X penicilina 10000 u/ml-estreptomicina 10000 µg/ml) e G418 (Invitrogen 10131-035) a 250 µg/ml. Lavaram-se as células sequencialmente com PBS, PBS contendo EDTA 10 mM e seguidamente removeu-se utilizando tripsina. Recolheram-se as células para meio contendo soro e determinou-se a densidade celular utilizando um hemacitómetro. Inocularam-se células a 50000-75000/ml a 200 µl por poço numa placa MT de fundo branco (Cultur Plate™ 6005680 Packard/PerkinElmer, Boston, MA) utilizando apenas os 60 poços interiores e cultivaram-se durante 24 h. Removeu-se o meio, lavaram-se as células com PBS e adicionou-se novamente às células 200 µl de meio isento de soro contendo BSA a 0,1% (SF-BSA). Cultivaram-se as células durante 24 h adicionais. Removeu-se o meio e adicionaram-se aos poços as diferentes proteínas de ensaio HGF (n=4) em 150 µl de SF-BSA. Utilizou-se HGF de duas cadeias a uma concentração final de 1 nM para os ensaios de inibição. Correram-se controlos na ausência de HGF e/ou na ausência de proteínas HGF de ensaio.

Cultivaram-se as células durante 72 h e seguidamente ensaiaram-se utilizando o kit luminescente CellTiter-Glo (Promega G7571, Madison, WI). O procedimento seguido descreve-se em Promega Technical Bulletin TB288. Leu-se a placa de microtitulação num luminómetro de microplacas Tropix TR717 (Berthold 75323 Bad Wildbad, Alemanha). Normalizou-se a percentagem de estímulo ou inibição de proliferação celular com os controlos adequados.

Ensaio de migração celular

Cultivaram-se células de cancro da mama MDA-MB-435 (HTB-129, ATCC, Manassas, VA) em meio suplementado com soro recomendado. Destacaram-se células confluentes em PBS contendo EDTA 10 mM e diluíram-se com meio isento de soro para uma concentração final de $0,6-0,8 \times 10^5$ células/ml. Adicionou-se 0,2 ml desta suspensão ($1,2-1,6 \times 10^5$ células totais) em triplicado às câmaras superiores de placas Transwell de 24 poços (8 µm de diâmetro de poro) (HTS Multiwell™ Insert System, Falcon, Franklin Lakes, NJ) pré-revestidas com colagénio tipo I de cauda de rato a 10 µg/ml (Upstate, Lake Placid, NY). Adicionou-se HGF de tipo selvagem ou mutantes de

HGF à câmara inferior a 100 ng/ml em meio isento de soro, salvo indicação em contrário. Ensaiou-se igualmente cadeia β de HGF a 30 μ g/ml. Após incubação durante 13-14 h, removeram-se as células do lado apical da membrana e fixaram-se as que migraram para o lado basal em paraformaldeído a 4% seguido de coloração com solução de violeta de cristal a 0,5%. Após lavagem e secagem ao ar, solubilizaram-se as células em ácido acético a 10% e mediu-se A_{560} num leitor de microplacas Molecular Devices. Expressaram-se as actividades pró-migratórias dos mutantes de HGF como percentagem dos controlos HGF após subtracção da migração basal na ausência de HGF. Tiraram-se fotografias de células coradas numa máquina digital Spot (Diagnostics Instruments, Inc., Sterling Heights, MI) ligada a um microscópio Leitz (Leica Mikroskope & Systeme GmbH, Wetzlar, Alemanha). Adquiriram-se imagens com Adobe Photoshop 4.0.1 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA).

RESULTADOS

Ligação de HGF β a Met

Avaliou-se a ligação a HGF β a Met a partir da alteração em unidades de ressonância medida por ressonância plasmónica de superfície num *chip* CM5 derivatizado com o domínio extracelular de Met (Met ECD). Os resultados mostram que HGF β se liga a Met ECD com um K_d de 87 nM calculado a partir de constantes de associação ($k_{on} = 1,18 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e de dissociação ($k_{off} = 0,0103 \text{ s}^{-1}$) relativamente rápidas (figura 1A). Obtiveram-se resultados semelhantes para ligação ao domínio Sema de c-met, para o qual se calculou uma K_d de 27 nM (dados não apresentados). Confirmou-se igualmente a ligação de HGF β a Met por um segundo método independente utilizando um ELISA em placa. Após incubação de HGF β biotilado com uma fusão Met-IgG adequadamente orientada ligada a um anticorpo anti-Fc imobilizado e detecção com HRP-neutravidina, determinou-se um valor de EC_{50} de $320 \pm 140 \text{ nM}$ ($n = 6$; dados não apresentados).

Dado que HGF de cadeia única se liga a Met com afinidade comparável à do HGF de duas cadeias mas não induz fosforilação de Met (Lokker *et al.*, 1992; Hartmann *et al.*, 1992), apresentamos a hipótese de tal se dever à ausência de um local

de ligação Met na forma não clivada da cadeia 13. Para ensaiar esta hipótese, expressamos e purificamos proHGF β , uma forma de HGF β do tipo zimogénio contendo os 16 resíduos do terminal C da cadeia α de HGF e uma mutação no local de clivagem (R494E) para assegurar que a forma de cadeia única permanece intacta. Determinou-se a ligação de HGF β e proHGF β a Met com um ELISA de ligação por competição, resultando em valores de IC₅₀ de $0,86 \pm 0,17$ e $11,6 \pm 1,8$ μM , respectivamente (figura 1B). A redução da ligação de 13,5 vezes mostra que apesar de existir de facto um local de ligação Met em HGF β do tipo zimogénio, este não é óptimo. A perda de afinidade de ligação de proHGF β é também exemplificada nos dados resumidos na figura 5. De facto, noutros ciclos de experimentação, revelou-se que a cadeia β do tipo zimogénio era muito menos eficaz na sua capacidade para competir com a cadeia β marcada para ligação a c-met apresentando um IC₅₀ de cerca de 41 μM , cerca de 75 vezes mais elevado do que o valor revelado para a cadeia β de HGF de 0,56 μM neste ensaio, demonstrando que a cadeia β do tipo zimogénio tem uma ligação a c-met significativamente reduzida (dados não apresentados). Assim, várias experiências confirmam que a cadeia β do tipo zimogénio (proHGF β) é um ligando de Met sub-óptimo.

Inibição da actividade por HGF β

Apesar de HGF β se ligar a Met, não induz fosforilação de Met (figura 1C). A figura 1C mostra que HGF β foi completamente inactivo mesmo a concentrações que excedem em mais de 1000 vezes as concentrações de actividade de fosforilação óptima de HGF completo. De igual modo, em ensaios de migração de células MDA-MB-435, HGF β a concentrações até 0,95 μM não teve qualquer efeito. Contudo, HGF β não inibe fosforilação de Met dependente de HGF de uma forma dependente da concentração (figura 1D), apesar de a inibição ter sido incompleta à concentração mais elevada utilizada. A inibição de fosforilação de Met é consistente com uma competição directa com HGF para ligação a Met. De acordo com tal, os ensaios de ligação por competição mostram que HGF β inibe ligação de HGF completo a Met (figura 1E), apesar de o fazer a concentrações especialmente elevadas (IC₅₀ = 830 ± 26 nM; n = 3). Em comparação, HGF de tipo selvagem completo tinha um valor de IC₅₀ de $0,86 \pm 0,47$ nM (n = 3) neste ensaio.

Mutações em HGF e HGF β afectam migração celular e fosforilação de Met

Para identificar o local de ligação de Met na cadeia β , alteramos sistematicamente resíduos nas regiões correspondentes ao domínio de activação e ao local activo de serina-proteases, aqui referido como "domínio de activação" e "região de local activo" de HGF. A expressão inicial de mutantes de HGF em células CHO proporcionou uma mistura de formas de HGF de cadeia única e de duas cadeias, exemplificadas por HGF mutante 1623A (figura 2A). Obteve-se conversão completa de HGF residual não clivado por exposição adicional do meio de cultura recolhido a soro a 5-10% durante vários dias (figura 2A). A pureza de HGF 1623A após purificação por cromatografia de permuta catiónica é representativa de todos os mutantes de HGF (figura 2A).

Avaliou-se a consequência funcional de mutação de resíduos da cadeia β de HGF por determinação da capacidade dos mutantes de HGF estimularem migração das células MDA-MB435. Os resultados mostraram que 3 mutantes de HGF, R695A [c217], G696A [c219] e Y673A [c195] foram gravemente afectados com menos de 20% da actividade do tipo selvagem, enquanto 5 mutantes Q534A [c57], D578A [c102], V692A [c214], P693A [c215] e G694A [c216] tinham 20%-60% da actividade do tipo selvagem (figura 2B). Adicionalmente, um conjunto adicional de 9 mutantes (R514A, P537A, Y619A, T620A, G621A, K649A, 1699A, N701A e R702A) tinham 60-80% da actividade do tipo selvagem. Os 21 mutantes remanescentes tinham actividades >80% relativamente ao tipo selvagem e consideraram-se essencialmente não modificados relativamente a HGF. Tal como esperado, proHGF não estimulou migração celular (figura 2B). Ilustra-se na figura 2C a capacidade diminuída de R695A [c217] ou G696A [c219] 1 nM promoverem migração celular mostrando que a migração na presença de qualquer dos mutantes é semelhante a migração basal na ausência de HGF.

Para analisar se as actividades reduzidas na migração celular se correlacionavam com fosforilação reduzida de Met, analisou-se um subconjunto de mutantes de HGF num ensaio de receptores quinase (KIRA). Para HGF de tipo selvagem e mutantes de HGF observou-se fosforilação máxima de Met a concentrações entre 0,63 e 1,25 nM (figura 3). A fosforilação

máxima de Met atingida nos mutantes Y673A [c195], R695A [c217] e G696A [c219] foi menos de 30% da observada no tipo selvagem, de acordo com as suas actividades pró-migratórias mínimas ou ausentes. Os mutantes Q534A [c57], D578A [c102] e V692A [c214] tinham actividades intermédias (30-60%) em ensaios de migração celular; estes também apresentavam níveis intermédios de fosforilação de Met, com 56%-83% do nível observado em HGF de tipo selvagem. De acordo com esta falta de actividade de migração celular, proHGF não apresentou qualquer actividade de fosforilação de Met (figura 3).

Efeito de mutações na cadeia β sobre a ligação de HGF e cadeia β de HGF a Met

Analisou-se a afinidade de cada mutante para com a proteína de fusão Met-IgG por ligação de competição a HGF. Com excepção de K649A [c173] e Y673A [c195] (ambos com uma ligação cerca de 4 vezes mais fraca), todos os mutantes de HGF (>30) tinham essencialmente a mesma afinidade de ligação que HGF de duas cadeias ($IC_{50} = 0,83 \pm 0,32$ nM; $n = 30$), indicado pelas suas razões de IC_{50} (IC_{50mut}/IC_{50WT}), que variaram entre 0,36 a 2,25 (figura 7). HGF Y673A [c195] e proHGF apresentaram ligação a Met-IgG cerca de 4 vezes mais fraca comparativamente com HGF (figura 7). [Note-se que enquanto os valores absolutos de medidas de afinidade de ligação podem variar entre experiências, o efeito de mutações específicas sobre a afinidade de ligação comparativamente com o tipo selvagem é reproduzível entre experiências múltiplas]. Também analisamos actividades de migração celular de mutantes seleccionados a concentrações 10 e 50 vezes mais altas; não se observou qualquer aumento de actividade pró-migratória (figura 8). Assim, a função deficiente de mutantes de HGF não se deve a ligação reduzida a Met dado que um aumento de concentração até 50 vezes não apresentou qualquer efeito compensatório.

A correlação fraca entre ligação de mutante de HGF a Met e migração celular dependente de HGF ou fosforilação de Met deve-se provavelmente à afinidade relativamente elevada entre Met e a cadeia α de HGF, que poderia mascarar qualquer afinidade reduzida devida à cadeia β . Assim, efectuamos mutações seleccionadas na própria HGF β para eliminar quaisquer efeitos de cadeia α . Ensaaiaram-se os 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] e R702A [c224] em ELISA de competição para ligação de HGF β biotinilada a Met-IgG. Ensaaiou-se o mutante de HGF β C561S [c78] (C604S:C561S) para avaliar a actividade em mutantes sem cisteínas livres. Produziram-se mutantes num ambiente HGF β C604S [c128] para evitar qualquer dimerização potencial durante a purificação apesar de esta mutação não ter qualquer efeito na ligação a Met-IgG. Normalizaram-se então as afinidades de ligação dos mutantes para com HGF β que tinha IC₅₀ = 0,55 \pm 0,38 μ M (n = 16). Apresentam-se os resultados na figura 5. Representa-se graficamente na figura 4 um subconjunto seleccionado destes. A maioria dos mutantes tinha afinidade de ligação a Met reduzida e alguns mutantes - e.g. R695A [c217] e G696A [c219] - não competiram sequer para ligação (consultar figura 5). Observamos agora uma forte correlação entre actividade reduzida de mutantes de HGF de duas cadeias completos e ligação reduzida do mutante de HGF β correspondente. Verificou-se que alguns mutantes (e.g. R695A [c217], G696A [c219] e Y673A [c195]), que tinham a maior perda de actividade de migração (como mutantes de HGF de duas cadeias completos) também tinham a maior perda em ligação a Met (tal como os mutantes de HGF β). Contrariamente, mutantes com uma pequena redução de actividade de migração (e.g. Y619A [c143] e I699A [c221a]) também tinham uma pequena redução (menos de 10 vezes) na ligação a Met da figura 5. Assim, a eliminação da contribuição da ligação a cadeia α de HGF neste ensaio de ligação a Met revelou que a actividade migratória reduzida de mutantes de HGF completos se devia a uma interacção de ligação deficiente à cadeia β de HGF com o receptor Met.

Mutações em HGF resultam em redução de actividade de estimulação de crescimento e inibição aumentada de proliferação celular dependente de HGF

Tal como apresentado na figura 6A, os mutantes de cadeia β de HGF são menos activos como activadores de proliferação em células BxPC3. Os exemplos de mutantes da figura 6A reflectem um vasto espectro de grandezas de redução de actividade de estimulação de crescimento. Note-se que a actividade de HGF WT a 25 ng/ml foi 83,6 \pm 13,0 % (n = 12) da actividade a 100 ng/ml. A % de actividade refere-se à quantidade de

proliferação na presença de HGF ou mutante de HGF (100 ng/ml ou 25 ng/ml) menos a quantidade de proliferação na ausência de HGF). DP é o desvio padrão e n é o número de determinações independentes.

Os mutantes da cadeia β de HGF são também capazes de actuar como inibidores de proliferação celular na presença de HGF de tipo selvagem (figura 6B). Na figura 6B, actividade relativa refere-se a actividade relativa no ensaio de proliferação. Pode calcular-se % de inibição de vários modos, dois dos quais se apresentam na figura 6B. A % de actividade I refere-se à quantidade de proliferação normalizada para ausência de HGF (0%) e HGF WT a 25 ng/ml (100%). Assim HGF R695A ou HGF R424A:494E inibem 79% ou 63% de actividade de proliferação celular dependente de HGF, respectivamente. A % de actividade II refere-se à quantidade de proliferação normalizada para HGF R695A a 5 μ g/ml (0%) ou HGF R424A:494E a 5 μ g/ml (0%) e HGF WT a 25 ng/ml (100%). Assim HGF R695A ou HGF R424A:494E inibem 68% ou 75% de actividade de proliferação celular dependente de HGF, respectivamente. Note-se que HGF WT foi HGF de duas cadeias a 25 ng/ml; R695A de duas cadeias e R424A:494E de uma cadeia foram a 5 μ g/ml.

Pró-HGF de cadeia única não pode competir com cadeia β de HGF pela ligação a c-met

Os nossos dados indicam que a cadeia β de HGF se liga a c-met e mais especificamente ao domínio Sema de c-met. A cadeia α de HGF também se liga a c-met e pode também ligar-se ao domínio Sema. Analisamos se os locais de ligação para estas duas cadeias poderiam sobrepor-se em c-met. Os resultados demonstraram que pró-HGF de cadeia única, com uma cadeia α intacta e uma cadeia β do tipo zimogénio, não compete com cadeia β de HGF para ligação a c-met-IgG às concentrações indicadas na figura 9. Contudo, HGF de duas cadeias com uma cadeia α intacta e uma cadeia β activada compete com uma IC₅₀ de 19 nM, apoiando a conclusão que as cadeias α e β se ligam em locais diferentes em c-met (figura 9). Uma experiência de controlo em ELISA de competição mostrou que pró-HGF de cadeia única competiu com ligação de HGF de duas cadeias biotinilado para ligação a c-met-IgG com um valor de IC₅₀ de

12 nM, semelhante ao valor de IC_{50} de 6 nM para HGF de duas cadeias (dados não apresentados).

DISCUSSÃO

HGF adquire actividade biológica por conversão proteolítica da forma precursora de cadeia única em HGF de duas cadeias (Naka *et al.*, 1992; Hartmann *et al.*, 1992; Lokker *et al.*, 1992; Naldini *et al.* 1992). Com base na similaridade estrutural de HGF com serina-proteases do tipo quimiotripsina (Perona e Craik, 1995; Rawlings *et al.*, 2002; Donate *et al.*, 1994) e especificamente com plasminogénio, apresentamos a hipótese que este processo de activação esteja associado a alterações estruturais que ocorrem na cadeia β de HGF. Proporcionamos aqui evidências de a cadeia β de HGF "activada" conter um local de ligação de Met distinto localizado numa região que corresponde ao local de ligação de substrato/inibidor de serina-proteases do tipo quimiotripsina.

Interacções de ligação de HGF a Met

Os estudos de ligação com cadeias β de HGF purificadas revelaram que a forma "activada" de HGF β (Val495-Ser728) se liga a Met com uma afinidade aproximadamente 14 vezes mais elevada do que a sua forma precursora, proHGF β (Asn479-Ser728), o que é consistente com a teoria que a optimização do local de ligação de Met é contingente após processamento de HGF de cadeia única. Tal sugeriu que o local de ligação de Met inclui a região de HGF que sofre rearranjos conformacionais após clivagem de scHGF, i.e. o "domínio de activação". De facto, a análise funcional de variantes HGF com substituições de aminoácidos no "domínio de activação" levou à identificação do local de ligação de Met funcional. No entanto, os mutantes de HGF com maiores perdas nas actividades pró-migratórias (Q534A, D578A, Y673A, V692A, P693A, G694A, R695A, G696A e R702A) apresentaram essencialmente afinidades de ligação a Met inalteradas, excepto Y673A (perda de 4 vezes), porque a afinidade de HGF é dominada pela cadeia α de HGF (Lokker *et al.*, 1994; Okigaki *et al.*, 1992). Tal é consistente com as actividades reduzidas que permanecem inalteradas por aumento da concentração de mutantes de HGF mais de 50 vezes (figura 8). Assim, as actividades reduzidas dos mutantes de HGF foram

interpretadas como resultantes de interacções moleculares perturbadas da cadeia β de HGF com o seu local de ligação em Met específico, de baixa afinidade. Em corroboração com tal, verificamos que as actividades biológicas reduzidas de mutantes de HGF seleccionados (completos de 2 cadeias) estavam bem correlacionadas com ligação a Met reduzida dos mutantes de HGF β correspondentes num ensaio que eliminou a contribuição da ligação da cadeia α de HGF. Por exemplo, os mutantes de HGF β R695A [c217], G696A [c219] e Y673A [c195] não apresentaram ligação a Met mensurável, o que está correlacionado com funções biológicas altamente diminuídas como mutantes completos.

Em concordância com os dados para um local de ligação de HGF β a Met de relativa baixa afinidade, as experiências de ressonância plasmónica de superfície com o domínio extracelular de Met immobilizado demonstraram que HGF β se ligou a Met com um K_d de aproximadamente 90 nM. As diferenças de afinidades aparentes verificadas entre os valores de K_d e de IC_{50} são devidas aos diferentes ensaios utilizados, e.g. em que os valores de IC_{50} mais elevados reflectem as maiores concentrações de HGF β necessárias para competir com HGF β biotinilada 250 nM para ligação a Met.

O local de ligação a Met funcional centra-se na "tríade de resíduos catalíticos" Gln534 [c57], Asp578 [c102], Tyr673 [c195] e na ansa [c220] (resíduos Val692, Gly694, Arg695 e Gly696). Todas as nossas substituições por Ala não necessitariam de grandes alterações da conformação da cadeia principal excepto em Gly696. Aqui, os ângulos ϕ/ψ de $50^\circ/146^\circ$ e a substituição por resíduo não Gly levariam a alterações conformacionais na ansa [c220], levando a actividade reduzida do mutante G696A. Conjuntamente, estes resíduos têm uma semelhança notável com a região de processamento de substrato das serina-proteases verdadeiras. Esta revelação está de acordo com um estudo anterior, que identificou Y673 e V692 como resíduos importantes para activação de Met (Lokker et al., 1992). A actividade normal medida para a variante de HGF Q534H nesse estudo pode reflectir compensação funcional de Gln por His, um variante isostérico relativamente próximo.

A importância funcional da ansa [c220] tem precedentes na família de serina-proteases do tipo quimiotripsina bem descritas (Perona e Craik, 1994; Hedstrom, 2002). A conformação canónica extensa de substratos e inibidores inclui resíduos que podem formar interacção da cadeia principal de [c214-c218]. Esta região também é reconhecida como um regulador alostérico de actividade catalítica de trombina (Di Cera *et al.*, 1995) e como um local de interacção com o seu inibidor hirudina (Stubbs e Bode, 1993). Além disso, os resíduos em Factor VIIa e trombina que correspondem a HGF R695 [c217] são importantes para processamento de substrato catalisado por enzima (Tsiang *et al.*, 1995; Dickinson *et al.*, 1996). Adicionalmente, o resíduo correspondente em MSP, R683 [c217], desempenha um papel fulcral na interacção de alta afinidade da cadeia β de MSP com o seu receptor Ron (Danilkovitch *et al.*, 1999). MSP R683 [c217] é parte de um agregado de cinco resíduos arginina expostos à superfície que foram propostos como estando envolvidos em ligação de alta afinidade a Ron (Miller e Leonard, 1998). Embora somente R695 [c217] e possivelmente K649 [c173] sejam conservados em HGF, estes resíduos estão todos localizados dentro da região de ligação de Met à cadeia β de HGF, o que nos leva a especular que o local de ligação de Ron na cadeia β de MSP é altamente homólogo.

Os resultados aqui descritos com mutantes Ala de HGF concordam com um estudo anterior em que se substituiu quer Tyr673 [c195], quer Val692 [c214] por serina (Lokker *et al.*, 1991). A actividade biológica normal medida para a variante de HGF Q534H [c57] em dois relatos anteriores (Lokker *et al.*, 1991; Matsumoto *et al.*, 1991) pode reflectir compensação funcional de Gln por His, um variante isostérica relativamente próximo. No entanto, os nossos resultados contrariam estudos anteriores, demonstrando que a cadeia β de HGF por si só não se liga nem inibe a ligação de HGF a Met (Hartmann *et al.*, 1992; Matsumoto *et al.*, 1998). Num caso a cadeia β de HGF foi diferente da nossa, com resíduos extra da cadeia α derivados da clivagem de HGF por elastase, que poderia afectar prejudicialmente a ligação de Met. Contudo, é mais provável que as concentrações utilizadas, a sensibilidade dos ensaios ou a extensão do processamento de pró-HGF tenham sido insuficientes para observar ligação a este local de baixa

afinidade (Matsumoto *et al.*, 1998). Relatou-se que a cadeia β de HGF se liga a Met, embora apenas na presença do fragmento NK4 da cadeia α (Matsumoto *et al.*, 1998).

Mecanismos de sinalização

Em princípio, a existência de dois locais de ligação a Met - um de alta afinidade e um de baixa afinidade - numa molécula de HGF poderia apoiar um modelo 2:1 de um complexo de sinalização Met:HGF, análogo ao modelo 2:1 proposto para Ron:MSP (Miller e Leonard, 1998). No sistema de ligando/receptor relacionado MSP/Ron, as cadeias α e β individuais de MSP, que não têm actividade de sinalização, podem ligar-se a Ron e competir com MSP completo para a ligação ao receptor (Danilkovitch *et al.*, 1999). O mesmo é verdade para o sistema HGF/Met. No entanto, estudos bioquímicos não identificaram quaisquer complexos 2:1 de Met:HGF (Gherardi *et al.*, 2003). Além disso, este modelo de activação do receptor necessita de um mecanismo molecular ainda desconhecido que evitaria a ligação simultânea de uma molécula de HGF a um receptor Met através das suas cadeias α e β .

Alternativamente, a cadeia β de HGF pode ter funções críticas na activação do receptor, além das envolvidas em interacções directas com Met que favoreceriam um complexo 2:2 de HGF:Met. Verificamos que proHGF β , a forma "desactivada" de cadeia única da cadeia β de HGF, se liga mais fortemente a Met do que vários mutantes na forma "activada" de HGF β , i.e. Y673A, V692A e R695A (e.g., figura 5). É importante que todos os três mutantes de HGF completos correspondentes apresentam actividades mensuráveis de fosforilação do receptor e/ou pró-migratórias, contudo proHGF não, mesmo em concentrações 1000 vezes superiores às necessárias para actividade por HGF. Esta distinção significativa levou-nos a considerar funções adicionais para a cadeia β de HGF na activação do receptor.

Conclusão

Em conclusão, os resultados aqui apresentados demonstram que a cadeia β de HGF contém um local de interacção com Met até agora desconhecido, que é semelhante à "região do local activo" de serina-proteases. Assim HGF é bivalente, com um

local de ligação de Met de alta afinidade na região NK1 da cadeia α . Podem ocorrer outras interações importantes entre duas cadeias β de HGF, duas cadeias α de HGF (Donate *et al.*, 1994) e, tal como verificado para MSP/Ron (Angeloni *et al.*, 2004), entre dois domínios Sema de Met. Além disso, a heparina também desempenha um papel chave na ligação ao receptor de HGF/Met. A identificação de um local de ligação de Met distinto na cadeia β de HGF proporciona um princípio científico e empírico para a concepção de novas classes de inibidores de Met com potencial terapêutico para doenças tais como cancro.

LISTA PARCIAL DE REFERÊNCIAS

Angeloni, D., Danilkovitch-Miagkova, A., Miagkov, A., Leonard, E.J., e 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., e 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., e 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. *Biochemistry* 28, 638-643.

Bottaro, D.P., Rubin, J.S., Faletto, D.L., Chan, A.M., Kmieciak, T.E., Vande Woude, G.F., e 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. Crystallog.* 30, 1160-1161.

Cooper, C.S., Blair, D.G., Oskarsson, M.K., Tainsky, M.A., Eader, L.A., e 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., e 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., e Leonard, E.J. (1999). Interaction of macrophage-stimulating protein with its receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 29937-29943.

Danilkovitch-Miagkova, A., and 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., e 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., e 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.

Di Cera, E., Guinto, E.R., Vindigni, A., Dang, Q.D., Ayala, Y.M., Wuyi, M., e Tulinsky, A. (1995). The Na⁺ binding site of thrombin. *J. Biol. Chem.* 270, 22089-22092.

Dickinson, C.D., Kelly, C.R., e 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.

Donate, L.E., Gherardi, E., Srinivasan, N., Sowdhamini, R., Aparicio, S., e Blundell, T.L. (1994). Molecular evolution and domain structure of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGF1/MSP). *Protein Sci.* 3, 2378-2394.

Drain, J., Bishop, J.R., e 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., Iamelle, L., Gough, J., Bandyopadhyay, A., Hartmann, G., e 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.

Hartmann, G., Naldini, L., Weidner, K.M., Sachs, M., Vigna, E., Comoglio, P.M., e 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.

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.

Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* 102, 4501-4523.

Huber, R., e Bode, W. (1978). Structural basis of the activation and action of trypsin. *Acc Chem. Res.* 11, 114-122.

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., e Fitch, W.M. (1980). Covalent structure of human haptoglobin: a serine protease homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3388-3392.

Lijnen, H.R., Van Hoef, B., Nelles, L., e 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.

Lin, C.-Y., Anders, J., Johnson, M., Sang, Q.A., e 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., e 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.

Lokker, N.A., Presta, L.G., e Godowski, P.J. (1994). 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.* 7, 895-903.

Ma, P.C., Maulik, G., Christensen, J., e 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., e 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.

Mark, M.R., Lokker, N.A., Zioncheck, T.F., Luis, E.A., e 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.

Matsumoto, K., Takehara, T., Inoue, H., Hagiya, M., Shimizu, S., e Nakamura, T. (1991). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 691-699.

Matsumoto, K., Kataoka, H., Date, K., e 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., e 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., e 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., e 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., e 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., e 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., e 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., e 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., e 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., e 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., e Ringe, D. (1999). Crystal structure of the proenzyme domain of plasminogen. *Biochemistry* 38,11180-11188.

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

Rawlings, N.D., O'Brien, E., e 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., e 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., e 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., e 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., e 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., e 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., e 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., e 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., e 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., e 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., e Leonard, E.J. (1997). Macrophage stimulating protein (MSP) binds to its receptor via the MSP β chain. *J. Biol. Chem.* 272, 16999-17004.

Lisboa, 2010-01-04

REIVINDICAÇÕES

1. Método de rastreio ou identificação de uma substância que liga selectivamente a cadeia β activada do factor de crescimento de hepatócitos (HGF), o referido método compreendendo:

comparar (i) a ligação de uma substância candidata a uma cadeia β de HGF activada, com (ii) a ligação da substância candidata a uma cadeia β de HGF de referência, em que a referida cadeia β de referência tem ligação diminuída a c-met comparativamente com a cadeia β de HGF activada,

pelo qual uma substância candidata que apresenta maior afinidade de ligação para com a cadeia β de HGF activada do que a cadeia β de HGF de referência, é seleccionada como uma substância que liga selectivamente a cadeia β de HGF activada.

2. Método de acordo com a reivindicação 1 em que a cadeia β de referência está contida dentro de um polipéptido de HGF de cadeia única.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 em que a cadeia β de referência está fundida no seu terminal N com uma parte da região terminal C da cadeia β de HGF, em que a posição 494 (correspondente ao HGF humano de tipo selvagem) da região terminal C é um aminoácido diferente de arginina.

4. Método de acordo com a reivindicação 3 em que o aminoácido na posição 494 é ácido glutâmico.

5. Método de acordo com a reivindicação 3 ou 4 em que a parte da região C-terminal de HGF inclui a sequência de aminoácidos do resíduo 479 ao 494 de HGF humano.

6. Método de rastreio para uma substância que bloqueia a activação de c-met, o referido método compreendendo o rastreio de uma substância que se liga a c-met e bloqueia a ligação específica da cadeia β de HGF a c-met.

7. Método de acordo com a reivindicação 6 em que a substância compete com a cadeia β de HGF pela ligação a c-met.

8. Utilização de uma substância que inibe a ligação específica da cadeia β de HGF a c-met, na preparação de um medicamento para tratar uma condição patológica associada a activação de c-met num indivíduo, em que a substância é:

- (a) um péptido incluindo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência VDWVCFRDLGCDWEL;
- (b) um anticorpo ou um seu fragmento, que se liga especificamente à referida cadeia β de HGF activada; ou
- (c) uma sua combinação,

em que a substância se liga à cadeia β de HGF activada e inibe a ligação específica da referida cadeia β de HGF activada a c-met, e

em que a condição patológica é um cancro, um tumor, uma doença de proliferação celular, uma doença imunitária ou uma doença relacionada com a angiogénese.

9. Substância que inibe a ligação específica da cadeia β de HGF a c-met, em que a substância é:

- (a) um péptido incluindo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência VDWVCFRDLGCDWEL;
- (b) um anticorpo ou um seu fragmento, que se liga especificamente à referida cadeia β de HGF activada; ou
- (c) uma sua combinação,

em que a substância se liga à cadeia β de HGF activada e inibe a ligação específica da referida cadeia β de HGF activada a c-met, para tratar uma condição patológica associada a activação de c-met num indivíduo, em que a condição patológica é um cancro, um tumor, uma doença de proliferação celular, uma doença imunitária ou uma doença relacionada com angiogénese.

10. Utilização de acordo com a reivindicação 8 ou substância de acordo com a reivindicação 9, em que a identidade da sequência de aminoácidos é de pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 98%.

11. Utilização de acordo com a reivindicação 8 ou substância de acordo com a reivindicação 9, em que o péptido

inclui a sequência de aminoácidos VDWVCFRDLGCDWEL ou uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo apresentado na tabela 1 que consiste em:

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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
V N W V C L R D V G C D W V L

12. Utilização de acordo com a reivindicação 8 ou substância de acordo com a reivindicação 9, em que o péptido consiste numa sequência de aminoácidos apresentada na reivindicação 11.

13. Utilização de acordo com a reivindicação 8 ou substância de acordo com a reivindicação 9, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal, de cadeia única, quimérico, humanizado ou humano.

14. Utilização ou substância de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 13, em que o cancro é cancro da mama, cancro colorrectal, cancro do pulmão, cancro pancreático ou glioblastoma.

15. Utilização ou substância de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 14, em que a substância é obtida por qualquer dos métodos das reivindicações 1-5.

16. Método de rastreio de um antagonista de um receptor de HGF que bloqueia a ligação de HGF ao seu receptor, o referido método compreendendo seleccionar uma substância que se liga a pelo menos um dos resíduos 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 e/ou 702 da cadeia β de HGF.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, em que a substância se liga pelo menos aos resíduos 673 e 695.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, em que a substância também se liga a pelo menos um dos resíduos 534, 578 e 692.

19. Molécula que se liga à cadeia β do factor de crescimento de hepatócitos activada e inibe a ligação específica da referida cadeia β de HGF activada a c-met, em que a referida molécula é:

- (a) um péptido incluindo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência VDWVCFRDLGCDWEL;
- (b) um anticorpo ou um seu fragmento que se liga especificamente à referida cadeia β de HGF activada; ou
- (c) uma sua combinação.

20. Molécula de acordo com a reivindicação 19, em que a identidade de sequência de aminoácidos é de pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 98%.

21. Molécula de acordo com a reivindicação 19, em que o péptido inclui a sequência de aminoácidos VDWVCFRDLGCDWEL ou uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo apresentado na Tabela 1 que consiste em:

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
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
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
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
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
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

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
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
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
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
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
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
V N W V C L R D V G C D W V L

22. Molécula de acordo com a reivindicação 19, em que o péptido consiste numa sequência de aminoácidos apresentada na reivindicação 21.

23. Molécula de acordo com a reivindicação 19, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal, de cadeia única, quimérico, humanizado ou humano.

24. Molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 23, em que a afinidade de ligação da molécula para com a forma activada da cadeia é superior à

afinidade de ligação da molécula para com a cadeia na forma de zimogénio.

25. Molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 24, que se liga ao local activo da cadeia β .

26. Molécula de acordo com a reivindicação 25, em que o referido local activo inclui pelo menos um dos resíduos 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 e/ou 702 da cadeia β .

27. Molécula de acordo com a reivindicação 25, em que a cadeia β activada tem uma conformação de cadeia β obtida por clivagem de HGF de cadeia única.

28. Molécula de acordo com a reivindicação 27, em que a referida clivagem é nos resíduos 494 e 495, ou é adjacente a esses resíduos, de HGF de cadeia única.

29. Molécula de acordo com a reivindicação 28, em que a referida clivagem ocorre entre os resíduos 494 e 495 de HGF de cadeia única.

30. Moléculas de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 24, em que a ligação da referida molécula à cadeia β activada inibe a activação de c-met por HGF.

31. Molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 24, em que a ligação da referida molécula à cadeia β activada inibe a proliferação celular induzida por HGF.

32. Molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 24, em que a ligação da referida molécula à cadeia β activada inibe a dimerização do receptor c-met.

33. Molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-32 que é obtida pelo método de acordo com qualquer das reivindicações 1-5 e 16-18.

34. Molécula tal como definida em qualquer uma das reivindicações 19 a 33, para utilização num método de tratamento de uma condição patológica associada a activação de c-met num indivíduo.

35. Molécula de acordo com a reivindicação 34, em que a condição patológica é um cancro, um tumor, uma doença de proliferação celular, uma doença imunitária ou uma doença relacionada com angiogénese.

36. Moléculas de acordo com a reivindicação 35, em que o cancro é cancro da mama, cancro colorrectal, cancro do pulmão, cancro pancreático ou glioblastoma.

37. Composição incluindo uma molécula tal como definida em qualquer uma das reivindicações 19 a 36, em combinação com um transportador.

38. Composição de acordo com a reivindicação 37, em que o transportador é um transportador farmacologicamente aceitável.

Lisboa, 2010-01-04

REIVINDICAÇÕES

1. Método de rastreio ou identificação de uma substância que liga selectivamente a cadeia β activada do factor de crescimento de hepatócitos (HGF), o referido método compreendendo:

comparar (i) a ligação de uma substância candidata a uma cadeia β de HGF activada, com (ii) a ligação da substância candidata a uma cadeia β de HGF de referência, em que a referida cadeia β de referência tem ligação diminuída a c-met comparativamente com a cadeia β de HGF activada,

pelo qual uma substância candidata que apresenta maior afinidade de ligação para com a cadeia β de HGF activada do que a cadeia β de HGF de referência, é seleccionada como uma substância que liga selectivamente a cadeia β de HGF activada.

2. Método de acordo com a reivindicação 1 em que a cadeia β de referência está contida dentro de um polipéptido de HGF de cadeia única.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 em que a cadeia β de referência está fundida no seu terminal N com uma parte da região terminal C da cadeia β de HGF, em que a posição 494 (correspondente ao HGF humano de tipo selvagem) da região terminal C é um aminoácido diferente de arginina.

4. Método de acordo com a reivindicação 3 em que o aminoácido na posição 494 é ácido glutâmico.

5. Método de acordo com a reivindicação 3 ou 4 em que a parte da região C-terminal de HGF inclui a sequência de aminoácidos do resíduo 479 ao 494 de HGF humano.

6. Método de rastreio para uma substância que bloqueia a activação de c-met, o referido método compreendendo o rastreio de uma substância que se liga a c-met e bloqueia a ligação específica da cadeia β de HGF a c-met.

7. Método de acordo com a reivindicação 6 em que a substância compete com a cadeia β de HGF pela ligação a c-met.

8. Utilização de uma substância que inibe a ligação específica da cadeia β de HGF a c-met, na preparação de um medicamento para tratar uma condição patológica associada a activação de c-met num indivíduo, em que a substância é:

- (a) um péptido incluindo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência VDWVCFRDLGCDWEL;
- (b) um anticorpo ou um seu fragmento, que se liga especificamente à referida cadeia β de HGF activada; ou
- (c) uma sua combinação,

em que a substância se liga à cadeia β de HGF activada e inibe a ligação específica da referida cadeia β de HGF activada a c-met, e

em que a condição patológica é um cancro, um tumor, uma doença de proliferação celular, uma doença imunitária ou uma doença relacionada com a angiogénese.

9. Substância que inibe a ligação específica da cadeia β de HGF a c-met, em que a substância é:

- (a) um péptido incluindo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência VDWVCFRDLGCDWEL;
- (b) um anticorpo ou um seu fragmento, que se liga especificamente à referida cadeia β de HGF activada; ou
- (c) uma sua combinação,

em que a substância se liga à cadeia β de HGF activada e inibe a ligação específica da referida cadeia β de HGF activada a c-met, para tratar uma condição patológica associada a activação de c-met num indivíduo, em que a condição patológica é um cancro, um tumor, uma doença de proliferação celular, uma doença imunitária ou uma doença relacionada com angiogénese.

10. Utilização de acordo com a reivindicação 8 ou substância de acordo com a reivindicação 9, em que a identidade da sequência de aminoácidos é de pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 98%.

11. Utilização de acordo com a reivindicação 8 ou substância de acordo com a reivindicação 9, em que o péptido

inclui a sequência de aminoácidos VDWVCFRDLGCDWEL ou uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo apresentado na tabela 1 que consiste em:

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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
V N W V C L R D V G C D W V L

12. Utilização de acordo com a reivindicação 8 ou substância de acordo com a reivindicação 9, em que o péptido consiste numa sequência de aminoácidos apresentada na reivindicação 11.

13. Utilização de acordo com a reivindicação 8 ou substância de acordo com a reivindicação 9, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal, de cadeia única, quimérico, humanizado ou humano.

14. Utilização ou substância de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 13, em que o cancro é cancro da mama, cancro colorrectal, cancro do pulmão, cancro pancreático ou glioblastoma.

15. Utilização ou substância de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 14, em que a substância é obtida por qualquer dos métodos das reivindicações 1-5.

16. Método de rastreio de um antagonista de um receptor de HGF que bloqueia a ligação de HGF ao seu receptor, o referido método compreendendo seleccionar uma substância que se liga a pelo menos um dos resíduos 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 e/ou 702 da cadeia β de HGF.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, em que a substância se liga pelo menos aos resíduos 673 e 695.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, em que a substância também se liga a pelo menos um dos resíduos 534, 578 e 692.

19. Molécula que se liga à cadeia β do factor de crescimento de hepatócitos activada e inibe a ligação específica da referida cadeia β de HGF activada a c-met, em que a referida molécula é:

- (a) um péptido incluindo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência VDWVCFRDLGCDWEL;
- (b) um anticorpo ou um seu fragmento que se liga especificamente à referida cadeia β de HGF activada; ou
- (c) uma sua combinação.

20. Molécula de acordo com a reivindicação 19, em que a identidade de sequência de aminoácidos é de pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 98%.

21. Molécula de acordo com a reivindicação 19, em que o péptido inclui a sequência de aminoácidos VDWVCFRDLGCDWEL ou uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo apresentado na Tabela 1 que consiste em:

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
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
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
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
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
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

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
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
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
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
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
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
V N W V C L R D V G C D W V L

22. Molécula de acordo com a reivindicação 19, em que o péptido consiste numa sequência de aminoácidos apresentada na reivindicação 21.

23. Molécula de acordo com a reivindicação 19, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal, de cadeia única, quimérico, humanizado ou humano.

24. Molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 23, em que a afinidade de ligação da molécula para com a forma activada da cadeia é superior à

afinidade de ligação da molécula para com a cadeia na forma de zimogénio.

25. Molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 24, que se liga ao local activo da cadeia β .

26. Molécula de acordo com a reivindicação 25, em que o referido local activo inclui pelo menos um dos resíduos 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 e/ou 702 da cadeia β .

27. Molécula de acordo com a reivindicação 25, em que a cadeia β activada tem uma conformação de cadeia β obtida por clivagem de HGF de cadeia única.

28. Molécula de acordo com a reivindicação 27, em que a referida clivagem é nos resíduos 494 e 495, ou é adjacente a esses resíduos, de HGF de cadeia única.

29. Molécula de acordo com a reivindicação 28, em que a referida clivagem ocorre entre os resíduos 494 e 495 de HGF de cadeia única.

30. Moléculas de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 24, em que a ligação da referida molécula à cadeia β activada inibe a activação de c-met por HGF.

31. Molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 24, em que a ligação da referida molécula à cadeia β activada inibe a proliferação celular induzida por HGF.

32. Molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 24, em que a ligação da referida molécula à cadeia β activada inibe a dimerização do receptor c-met.

33. Molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-32 que é obtida pelo método de acordo com qualquer das reivindicações 1-5 e 16-18.

34. Molécula tal como definida em qualquer uma das reivindicações 19 a 33, para utilização num método de tratamento de uma condição patológica associada a activação de c-met num indivíduo.

35. Molécula de acordo com a reivindicação 34, em que a condição patológica é um cancro, um tumor, uma doença de proliferação celular, uma doença imunitária ou uma doença relacionada com angiogénese.

36. Moléculas de acordo com a reivindicação 35, em que o cancro é cancro da mama, cancro colorrectal, cancro do pulmão, cancro pancreático ou glioblastoma.

37. Composição incluindo uma molécula tal como definida em qualquer uma das reivindicações 19 a 36, em combinação com um transportador.

38. Composição de acordo com a reivindicação 37, em que o transportador é um transportador farmacologicamente aceitável.

Lisboa, 2010-01-04

RESUMO**"Modulação da interacção entre a cadeia beta de HGF e C-MET"**

Actividades pró-migratórias de mutantes de HGF a diferentes concentrações

Mutante	Actividade pró-migratória a 1 nM (% do controlo)	Actividade pró-migratória a 10 nM (% do controlo)	Actividade pró-migratória a 50 nM (% do controlo)
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

O invento proporciona métodos e composições para modular a via de sinalização HGF/c-met, em particular por regulação da ligação da cadeia β de HGF a c-met.

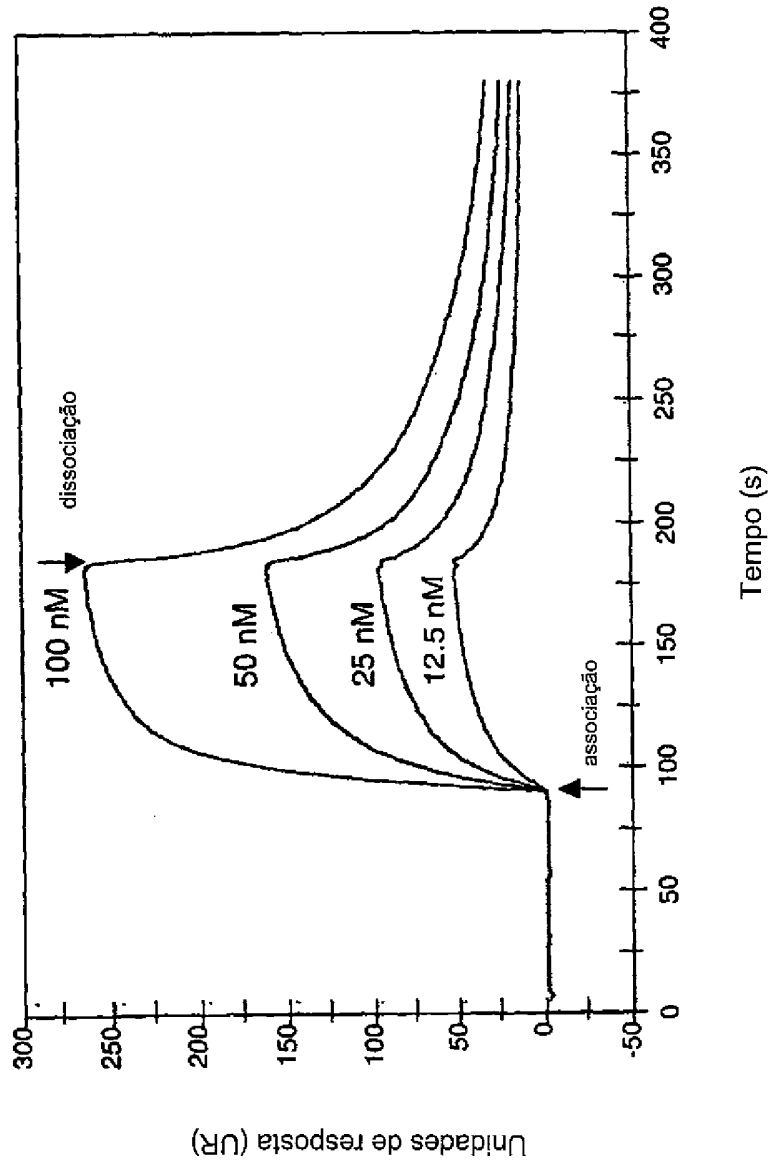


FIG._1A

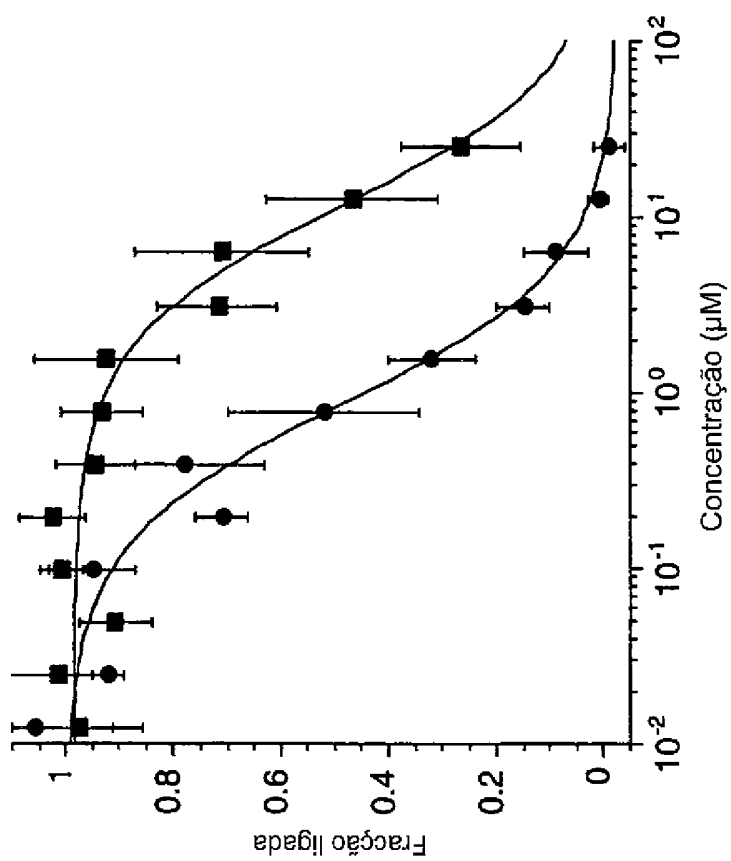


FIG._1B

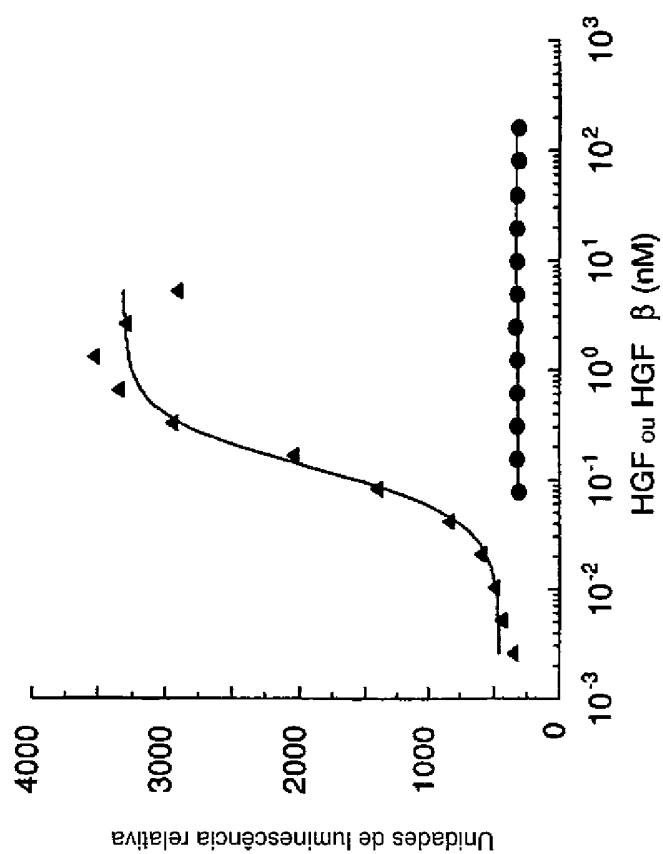


FIG._1C

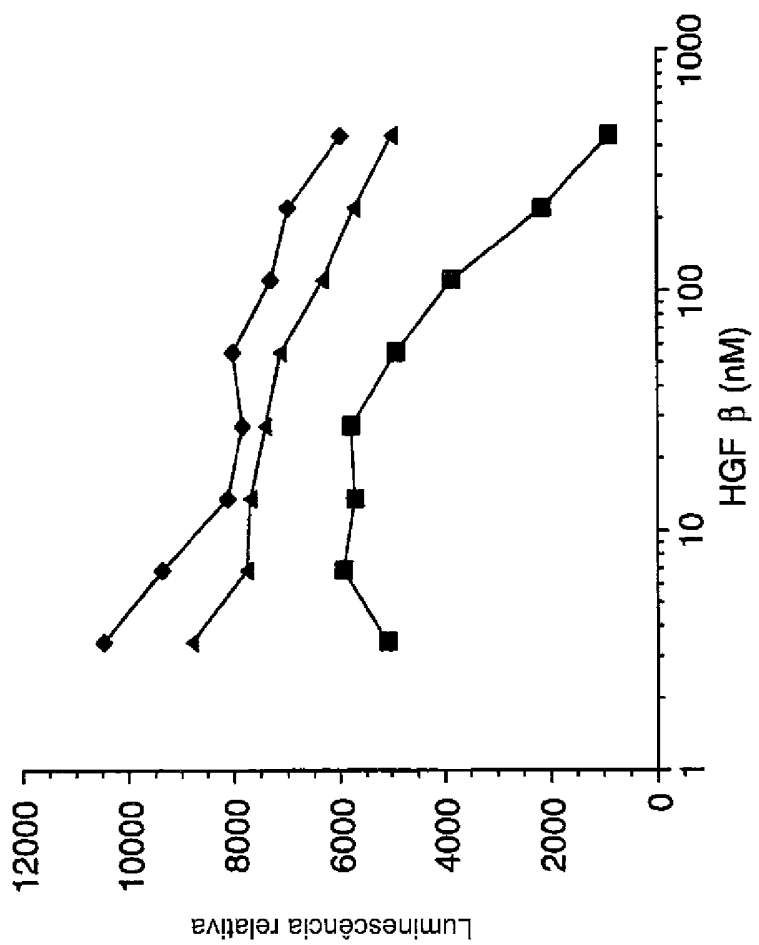


FIG. 1D

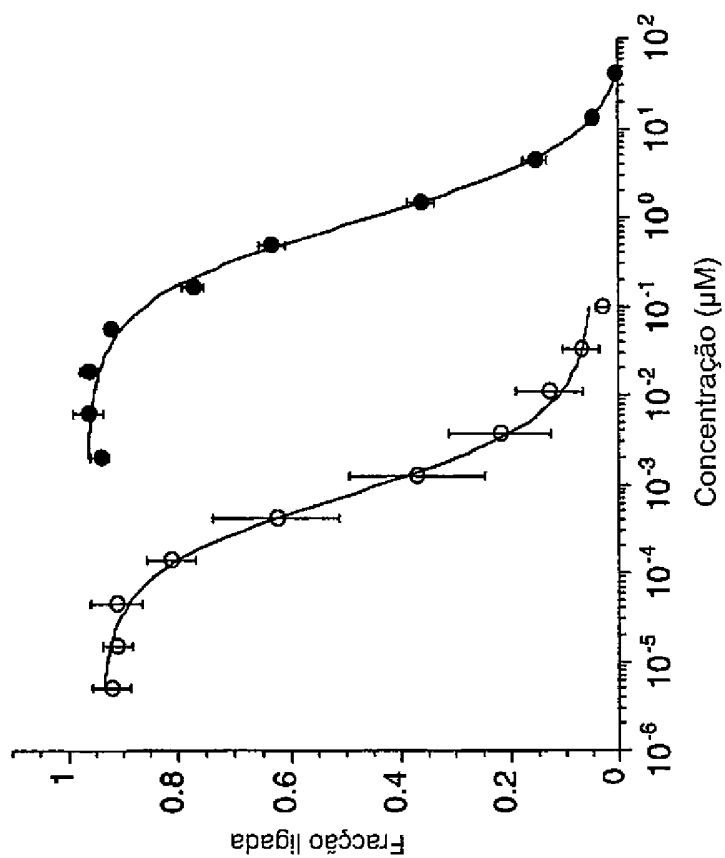


FIG. 1E

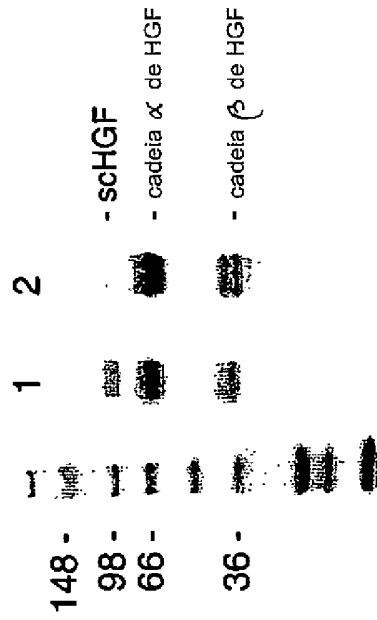


FIG. 2A

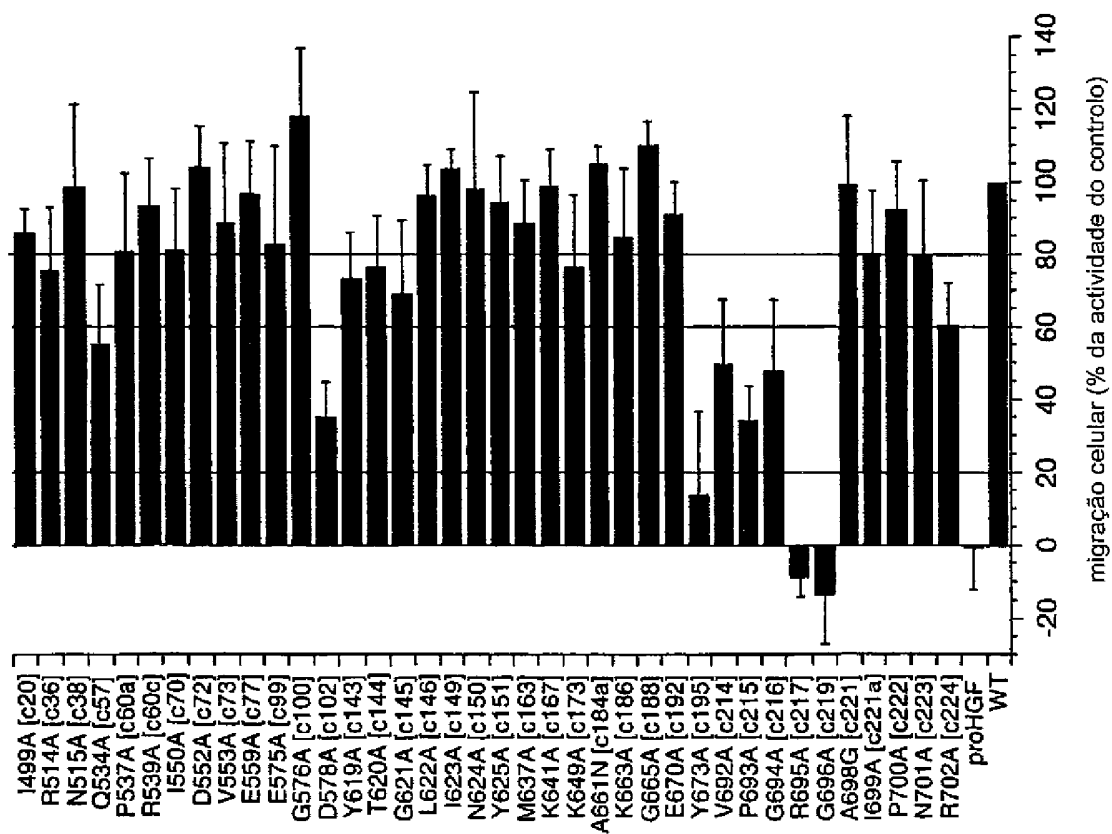


FIG. 2B

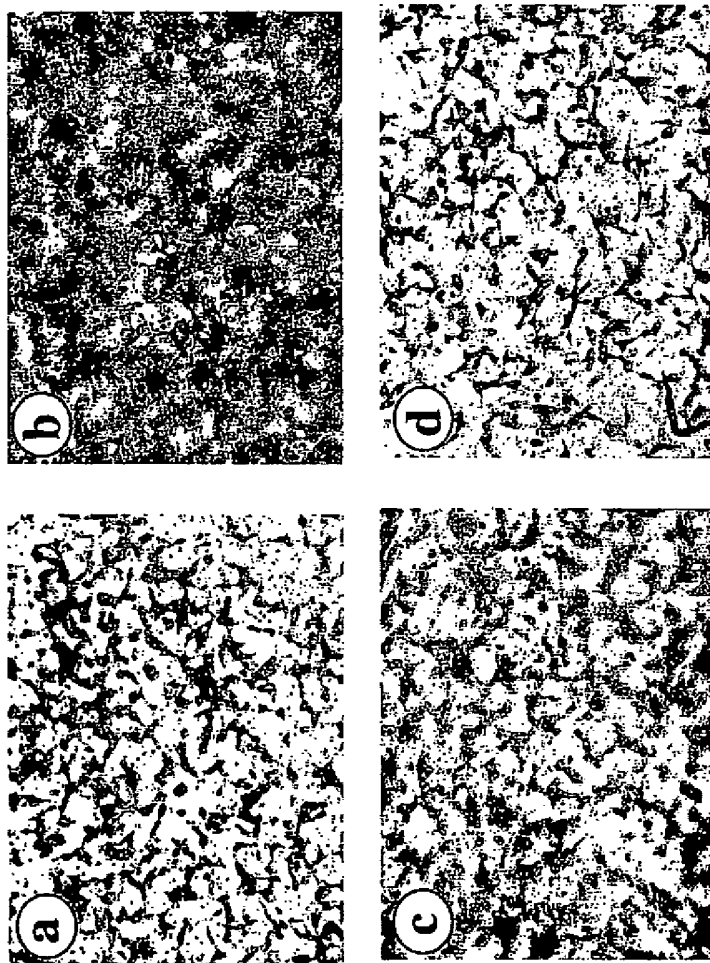


FIG._2C

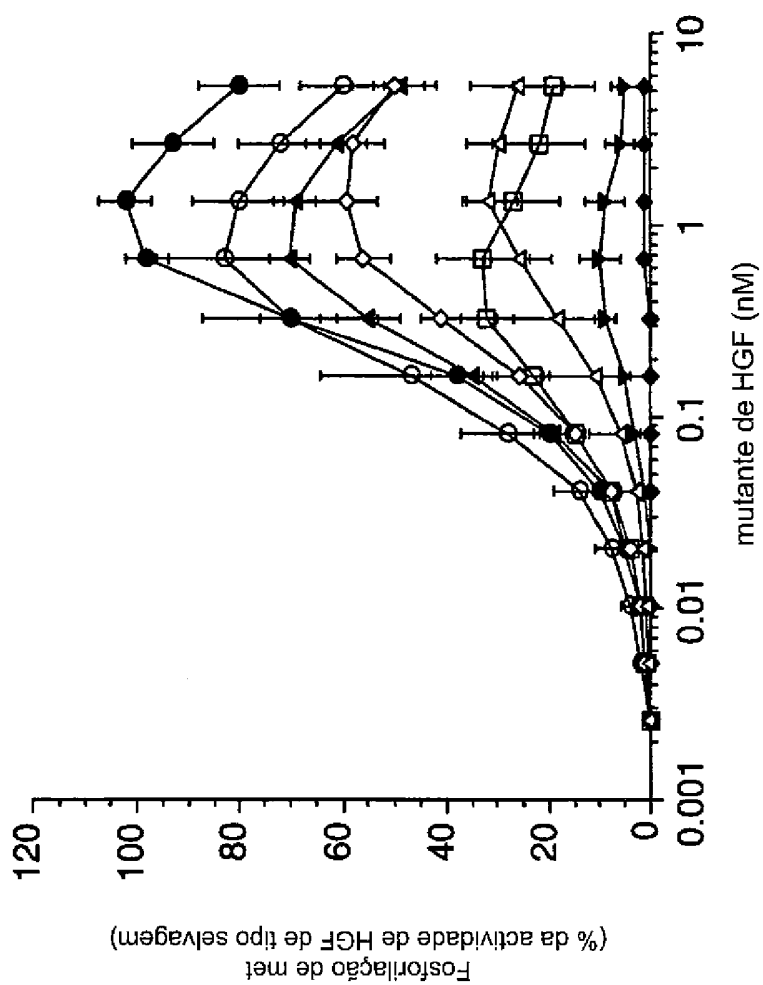


FIG. 3

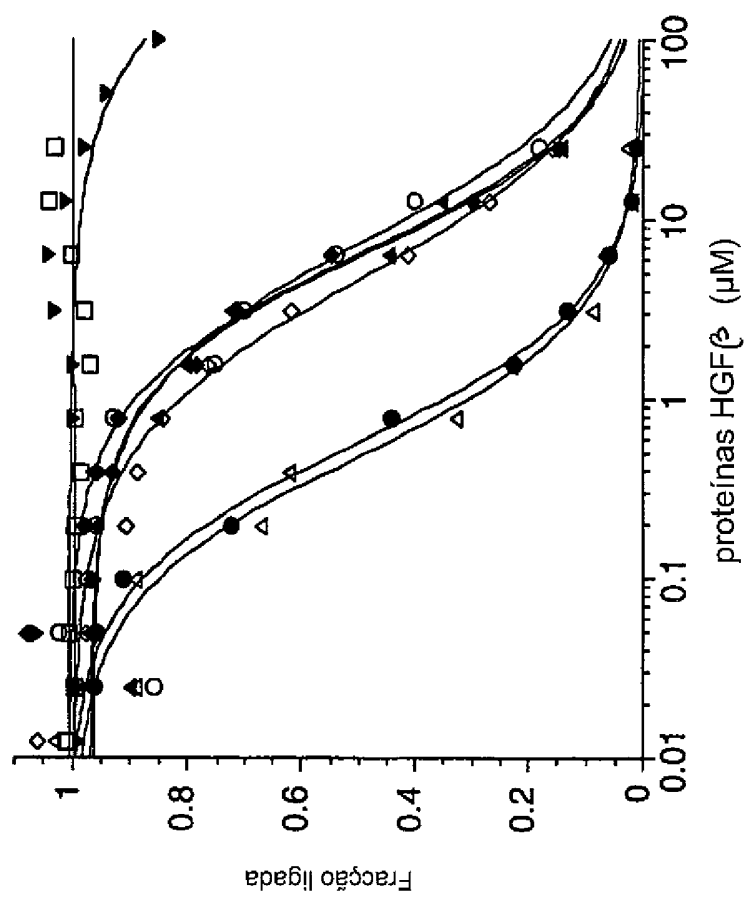


FIG. 4

FIG. 5

Mutante	Mutante de HGF β Afinidade de ligação relativa ^a (IC ₅₀ do mutante/IC ₅₀ de HGF β) \pm DP	Mutante de HGF completo de 2 cadeias Percentagem de redução \pm DP da actividade pró-migratória ^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 .16	0
proHGF ^e	23.5 \pm 10.0	101 \pm 12
C561S ^f	0.85 \pm 0.17	n.d. ^c

^a determinado utilizando ELISA de competição pela ligação HGF β /Met.

^b relativo a actividade de HGF de 2 cadeias de tipo selvagem (=100%) no ensaio de migração celular.

^c não determinado.

^d refere-se a WT C604 para HGF β e WT de 2 cadeias para HGF completo

^e refere-se a R494E para HGF β e R424A:R494E de 1 cadeia para HGF completo

^f refere-se ao mutante C516S:C604S para HGF β

FIG._6A

Proteínas HGF de 2 cadeias	Proteína a 100 ng/ml			Proteína a 25 ng/ml		
	% de actividade	DP	n	% de actividade	DP	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 HGF	Actividade relativa	% de actividade I	% de actividade II	n
sem HGF	1.0	0		2
HGF WT	1.95	100	100	2
R695A	.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

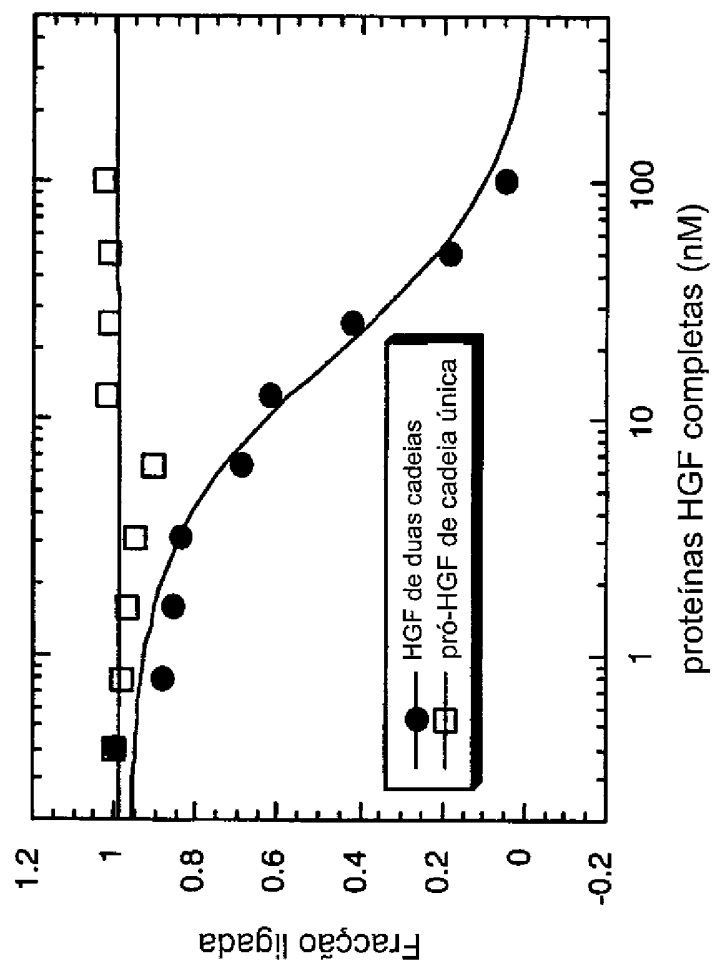
Mutante de HGF	IC ₅₀ mut/ IC ₅₀ WT±DP	Mutante de HGF	IC ₅₀ mut/ IC ₅₀ WT±DP
I499A [c20]	0.52	M637A [c163]	1.38
R514A [c36]	1.41 ± 0.23	K641A [c167]	1.04
NS15A [c38]	1.16	K649A [c173]	3.66
Q534A [c57]	2.04 ± 0.86	A661N [c184a]	1.04 ± 0.34
P537A [c60a]	1.67	K663A [c186]	0.73 ± 0.20
R539A [c60c]	0.94	G665A [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	HGF de tipo selvagem ^a	1

^a O HGF de tipo selvagem de 2 cadeias tinha uma IC₅₀=0,83±0,32 nM (n=30) no ELISA de ligação de competição com HGF/Met.

Actividades pró-migratórias de mutantes de HGF a diferentes concentrações

Mutante	Actividade pró-migratória a 1 nM (% de controlo)	Actividade pró-migratória a 10 nM (% de controlo)	Actividade pró-migratória a 50 nM (% de controlo)
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**

(19)



(11) **EP 1 636 593 B9**

(12)

CORRECTED EUROPEAN PATENT SPECIFICATION

(15) Correction information:

Corrected version no 1 (W1 B1)
Corrections, see
Claims EN 11

(51) Int Cl.:

G01N 33/74 ^(2006.01) **G01N 33/68** ^(2006.01)
C07K 7/08 ^(2006.01) **A61K 38/00** ^(2006.01)

(48) Corrigendum issued on:

16.12.2009 Bulletin 2009/51

(86) International application number:

PCT/US2004/017901

(45) Date of publication and mention of the grant of the patent:

11.03.2009 Bulletin 2009/11

(87) International publication number:

WO 2005/001486 (06.01.2005 Gazette 2005/01)

(21) Application number: **04754499.4**

(22) Date of filing: **04.06.2004**

(54) **MODULATING THE INTERACTION BETWEEN HGF BETA CHAIN AND C-MET**

MODULATION DER WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN HGF-BETA-KETTE UND C-MET

MODULATION DE L'INTERACTION CHAINE HGF BETA/C-MET

(84) Designated Contracting States:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR
HU IE IT LI LU MC NL PL PT RO SE SI SK TR
 Designated Extension States:
AL HR LT LV MK

(74) Representative: **Kiddle, Simon John et al**

Mewburn Ellis LLP
33 Gutter Lane
London
EC2V 8AS (GB)

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

(56) References cited:
US-A- 5 879 910

(43) Date of publication of application:
22.03.2006 Bulletin 2006/12

- **LOKKER N A ET AL: "STRUCTURE-FUNCTION ANALYSIS OF HEPATOCYTE GROWTH FACTOR: IDENTIFICATION OF VARIANTS THAT LACK MITOGENIC ACTIVITY YET RETAIN HIGH AFFINITY RECEPTOR BINDING" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 11, no. 7, 1 July 1992 (1992-07-01), pages 2503-2510, XP002036379 ISSN: 0261-4189 cited in the application**
- **MATSUMOTO ET AL: "Deletion of kringle domains or the N-terminal hairpin structure in Hepatocyte growth factor results in marked decreases in related activities" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 181, no. 2, 16 December 1991 (1991-12-16), pages 691-699, XP002017639 ISSN: 0006-291X**

(60) Divisional application:
09002616.2 / 2 093 570

(73) Proprietor: **Genentech, Inc.**
South San Francisco CA 94080-4990 (US)

(72) Inventors:

- **KIRCHHOFER, Daniel, K.**
Los Altos, CA 94024 (US)
- **LAZARUS, Robert, A.**
Millbrae, CA 94030 (US)
- **YAO, Xiaoyi**
Daly City, CA 94015 (US)

Note: Within nine months of the publication of the mention of the grant of the European patent in the European Patent Bulletin, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to that patent, in accordance with the Implementing Regulations. Notice of opposition shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid. (Art. 99(1) European Patent Convention).

EP 1 636 593 B9

10. The use of claim 8 or the substance of claim 9, wherein the amino acid sequence identity is at least 70%, 80%, 90%, 95% or 98%.

11. The use of claim 8 or the substance of claim 9, wherein the peptide comprises the amino acid sequence VDWVC-FRDLGCDWEL or an amino acid sequence selected from the group shown in Table 1 consisting of:

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
10	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
	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
	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
20	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
	V	D	W	V	C	F	R	D	L	G	C	D	Y	V	L
25	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
	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
30	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
	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
35	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
	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
40	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
	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
45	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
	V	N	W	V	C	F	R	E	L	G	C	D	W	V	L
50	V	N	W	V	C	L	R	D	V	G	C	D	W	V	L

12. The use of claim 8 or the substance of claim 9, wherein the peptide consists of an amino acid sequence shown in claim 11.

13. The use of claim 8 or the substance of claim 9, wherein the antibody is a monoclonal, single-chain, chimeric, humanized or human antibody.

14. The use or substance of any one of claims 8 to 13, wherein the cancer is breast cancer, colorectal cancer, lung