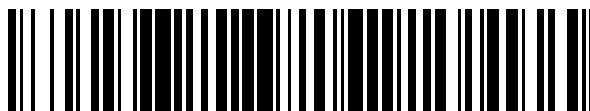


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 188**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08828206 .6**
96 Fecha de presentación: **25.08.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2195345**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2010**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal que se une a Met en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina y métodos relacionados**

30 Prioridad:
24.08.2007 US 845023

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.08.2012

73 Titular/es:
**VAN ANDEL RESEARCH INSTITUTE
333 BOSTWICK, N.E.
GRAND RAPIDS, MI 49503, US y
FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH
CENTER**

72 Inventor/es:
**CAO, Boliang;
VANDE WOUDE, George F.;
KNUDSEN, Beatrice S. y
ZHAO, Ping Xu**

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

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

ES 2 386 188 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal que se une a Met en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina y métodos relacionados

Campo de la invención

La presente invención se encuentra en el campo del diagnóstico molecular y en el de la medicina.

Antecedentes de la invención

La quinasa receptora c-Met regula la prolifección, migración, diferenciación y morfogénesis de ramificación celular durante el desarrollo y la homeostasis¹⁻³. Met también se expresa en la superficie celular de una variedad de tumores sólidos humanos primarios y en sus metástasis (<http://www.vai.org/meet/>). La secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de Met humano se proporciona en la SEC ID N°: 1, aminoácidos 25-567. En su estado activado, el receptor Met controla el crecimiento, la invasión y la metástasis de las células cancerosas a través de múltiples vías de transducción de señales⁴. En algunas líneas celulares de cáncer, la pérdida de la expresión de Met a través del silenciamiento promueve la apoptosis, lo que demuestra que Met es necesario para la supervivencia⁵⁻⁷. La actividad de Met aumenta a través de mutaciones en los dominios quinasa o yuxtamembrana⁸⁻¹¹, a través de la sobreexpresión^{12,13}, o a través de la unión a su ligando, el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF/SF)^{14,15}. La activación de la mutación de Met en la línea germinal, que estimula la activación de Met independiente de ligando, es la causa del desarrollo de carcinomas papilares renales hereditarios¹⁰. En las células cancerosas, la amplificación selectiva del alelo mutado de Met, mejora adicionalmente la actividad global de la Met quinasa¹⁶. La magnitud de expresión de Met predice la agresividad de una serie de tipos de cáncer (<http://www.vai.org/met/>). La detección y cuantificación precisas de la expresión de la proteína Met son necesarias para identificar los cánceres que probablemente son sensibles a los inhibidores de Met y el desarrollo de tales ensayos diagnósticos moleculares queda muy por detrás del desarrollo de fármacos.

Se ha asociado el alto nivel de expresión de c-Met con un mal pronóstico en muchos tipos de cáncer, que incluyen el de mama, de estómago, de cuello uterino, hepatocelular y de cabeza y cuello¹⁷⁻²². Aproximadamente el 25% de los cánceres de ovario y el 11% de los gliomas expresan niveles altos de c-Met. En el cáncer de mama, se observó la expresión de c-Met en un subgrupo de cánceres independientes de HER2, pero se asocia con la proliferación celular aumentada^{23,24}. En el cáncer de mama ductal, la expresión simultánea de Syndecan-1, E-cadherina y c-Met aumenta la angiogénesis y la linfangiogénesis²⁵. Cualquier enfermedad asociada con la expresión de c-Met se denomina en el presente documento "enfermedad relacionada con Met". Sin embargo, se ha cuestionado la fiabilidad de los estudios inmunohistoquímicos a la luz de la variabilidad entre lotes del antisero generado frente al péptido C-terminal en el receptor c-Met, que se ha utilizado en la mayoría de los estudios²⁶. La mayoría de los anticuerpos Met disponibles en el mercado no son fiables (o no han sido sometidos a ensayo rigurosamente para verificar su fiabilidad). Además del aumento de la expresión de c-Met, las concentraciones elevadas de HGF/SF en el microambiente tumoral también se han asociado con resultados adversos. Por ejemplo las células estromales tumorales hipóxicas en el cáncer de páncreas aumentan la secreción de HGF y aceleran la progresión del cáncer de páncreas²⁷.

Las líneas celulares mesenquimales con expresión de c-Met y HGF modificada por ingeniería genética son altamente metastásicas y la expresión del receptor c-Met mutante o la amplificación del locus c-Met en las líneas celulares aumenta el fenotipo proliferativo, invasivo y metastásico de los cánceres^{6,28-30}. Junto con Myc, el c-Met de tipo silvestre provoca la carcinogénesis mamaria³¹. El c-Met es uno de los receptores tirosina quinasa (RTK) más frecuentemente desregulado o modificado genéticamente en los cánceres humanos avanzados y por lo tanto representa una diana de tratamiento atractiva. Se observan mutaciones de c-Met activadoras de la quinasa en los carcinomas esporádicos renal, de pulmón, de cabeza y cuello, hepatocelular, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer gástrico y melanoma^{13,32-35}. Además, se ha detectado la amplificación del locus c-Met en el adenocarcinoma gástrico, colorrectal metastásico y esofágico^{12,13}, enfermedades relacionadas con Met adicionales. La activación de c-Met en las células cancerosas induce la secreción de factores angiogénicos, tales como VEGFA y IL-8 e inhibe la síntesis de trombospondina-1, un factor antiangiogénico^{36,37}. Además, la activación de c-Met en las células endoteliales provoca la angiogénesis. Aunque los efectos citotóxicos de la actividad inhibidora de Met sólo pueden darse en los cánceres con c-Met activado, el efecto antiangiogénico puede existir con mayor frecuencia.

Se produjo un avance importante con el desarrollo de inhibidores de molécula pequeña de c-Met que son oralmente bioactivos ("agentes inhibidores de Met"). De estos inhibidores, PF-2341066 demuestra especificidad para la inhibición de c-Met y la quinasa del linfoma anaplásico (ALK) y conduce a la regresión de los xenoinjertos de cáncer gástrico GTL-16 y los xenoinjertos de CPNM NCI-H441 a una dosis de 50 mg/kg/día³⁸. A esta dosis, c-Met queda inhibido por completo y se logra la máxima eficacia del fármaco con larga duración. Los estudios preclínicos con anticuerpos anti-c-Met con un único brazo e inhibidores de la quinasa de molécula pequeña^{7,39,40}, así como los estudios clínicos tempranos en pacientes destacan adicionalmente la promesa de los inhibidores de c-Met frente a una variedad de tipos de cáncer, sus propiedades farmacodinámicas favorables y su baja toxicidad. De esta manera, cuando se utilizan para tratar los cánceres con un eje Met activo, estos fármacos pueden de hecho beneficiar a muchos pacientes de cáncer. Sin embargo, no se dispone de herramientas de diagnóstico molecular para identificar

los tipos de cáncer que poseen vías Met activas.

Se necesitan con urgencia ensayos diagnósticos moleculares para detectar la expresión y determinar el estado de activación de las dianas de tratamiento de los inhibidores de la quinasa para mejorar el tratamiento de los pacientes con cáncer. Los fármacos que se unen a receptores de la superficie celular, o que penetran en las células e inhiben las quinasas receptoras y no receptoras, muestran grandes promesas en la práctica clínica, sin embargo la detección de las dianas correspondientes en los cánceres humanos presenta un gran desafío. Además del ensayo Hercept para la medición cuantitativa de la expresión de Her-2/Neu, que requería un desarrollo largo y arduo para su uso en las muestras clínicas de rutina y la aprobación de la FDA, no se dispone de ensayos diagnósticos validados para la expresión de la proteína quinasa receptora o no-receptora. La dificultad para desarrollar estos reactivos de diagnóstico se deriva del bajo nivel de expresión de las quinasas, el estado de activación lábil, que depende de la fosforilación de proteínas y la baja especificidad de los anticuerpos frente a la mayoría de los fosfoepítomos, que indican la actividad quinasa. Por consiguiente, la mayoría de las tirosina quinasas receptoras (RTK) carecen de los reactivos de detección para las mediciones de la expresión en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE), que es la preparación de tejidos más comúnmente obtenida a partir de cánceres de pacientes. Resulta cada vez más evidente que la estratificación de pacientes para el tratamiento con inhibidores de la quinasa es crucial para el éxito con la actividad antineoplásica de este grupo de agentes. Para un tipo de tumor sólido dado, la frecuencia de los cánceres que expresan la proteína diana sensible al fármaco es pequeña. Por lo tanto, si los pacientes no se seleccionan cuidadosamente para el tratamiento, muchos agentes podían dejar de demostrar eficacia en la fase II y en la fase III de los ensayos clínicos.

El receptor c-Met es particularmente difícil de medir en tejidos FFPE, debido a la elección de reactivos pobres, la validación insuficiente del rendimiento de los anticuerpos c-Met en los tejidos FFPE y la sensibilidad de c-Met a la fijación en formalina. Teniendo en cuenta la promesa de agentes inhibidores de c-Met novedosos en la práctica clínica, se necesitan ensayos diagnósticos de acompañamiento para identificar a los pacientes que potencialmente se beneficiarían de estos agentes.

Pozner-Moulis *et al.* (Laboratory Investigation (2007) 87, 251-260) analizan la validación de anticuerpos mediante un análisis cuantitativo de la expresión de proteínas utilizando como modelo la expresión de Met en el cáncer de mama. García *et al.* (British Journal of Cancer (2007) 96, 329-335) describe la sobreexpresión de c-Met en los carcinomas inflamatorios de mama por cuantificación automatizada en micromatrices de tejidos.

Resumen de la invención

La presente invención incluye un anticuerpo monoclonal "Met4", que es un anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection bajo el número de registro PTA-7680. La presente invención también incluye un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo Met4. La invención también proporciona un anticuerpo anti-Met, o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, que se une al mismo epítipo que el epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection bajo el número de registro PTA-7680, en el que el epítipo está dentro del polipéptido DVLPEFR en los residuos de aminoácidos 236-242 de la proteína Met humana dentro de la secuencia SEC ID N°: 1, o el epítipo se encuentra dentro del polipéptido DVLP en los residuos de aminoácidos 236-239 de la SEC ID N°: 1. La invención también proporciona un anticuerpo anti-Met que se une a un polipéptido que consiste en los aminoácidos identificados en la SEC ID N° 1 como 236-239, o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo. En el presente documento también se describe un anticuerpo anti-Met, o un fragmento o derivado de dicho anticuerpo, que compite con Met4 por la unión a Met. En este documento se describe adicionalmente un anticuerpo monoclonal, o derivado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que tiene todas las características biológicas de identificación del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection bajo el número de registro PTA-7680; un anticuerpo monoclonal específico para Met, donde la región variable de la cadena ligera y/o la cadena pesada de dicho anticuerpo, o un sitio de unión al antígeno de dichas regiones variables, tiene todas las características estructurales o de identificación biológica de los sitios o las regiones correspondientes del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection bajo el número de registro PTA-7680; un anticuerpo monoclonal específico para Met que se une al mismo epítipo que el epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection bajo el número de registro PTA-7680 (o derivado o fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo); un anticuerpo monoclonal que se une a un polipéptido que incluye los aminoácidos identificados en la SEC ID N° 1 como 236-242, o un derivado o fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, y, un anticuerpo monoclonal que se une a un polipéptido que incluye los aminoácidos identificados en la SEC ID N° 1 como 236-239, o un derivado o fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo.

La invención también incluye una composición que comprende los anticuerpos anti-Met o los fragmentos de unión al antígeno del mismo de la invención. En el presente documento también se describe una composición que comprende cualquiera de los fragmentos, derivados o anticuerpos monoclonales descritos en el párrafo anterior. El fragmento, derivado o anticuerpo monoclonal de las composiciones anteriormente indicadas puede ligarse a un resto detectable.

Además, en el presente documento se describe una composición útil para el diagnóstico con la composición del párrafo anterior, y un portador o excipiente diagnósticamente aceptable. Además, con esta composición, el fragmento, derivado o anticuerpo monoclonal puede ligarse a un resto detectable.

- 5 La invención también incluye un kit, que tiene: (a) un primer recipiente que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención, (b) un segundo recipiente con un portador, tal como un excipiente o portador diagnósticamente o farmacéuticamente aceptable; y (c) las instrucciones para el uso del anticuerpo para la detección de Met, el diagnóstico, el pronóstico o la evaluación de un agente inhibidor de Met. Con este kit, el fragmento, derivado o anticuerpo monoclonal puede ligarse a un resto detectable. Además, este kit puede incluir un
10 segundo fragmento, derivado o anticuerpo monoclonal; segundo fragmento, derivado o anticuerpo monoclonal que se une al fragmento, derivado o anticuerpo monoclonal del primer recipiente, y el segundo anticuerpo puede marcarse con un resto detectable. Además, este también puede incluir un agente inhibidor de Met.

- La presente invención también incluye varios métodos. En primer lugar hay un método para detectar la presencia de Met en una muestra biológica, muestra de la que se sospecha que expresa Met, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra de la que se sospecha que expresa Met obtenida de un paciente (b) proporcionar una composición de la invención; (c) poner en contacto la muestra con esta composición y (d) detectar la presencia de Met en la muestra. El segundo es un método para diagnosticar o pronosticar una enfermedad relacionada con Met en un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene una enfermedad relacionada con Met, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una composición de la invención, (b) poner en contacto con esta composición un tejido o una muestra biológica obtenida del paciente, (c) determinar el nivel de expresión de Met en el tejido o en la muestra, y (d) comparar el nivel de expresión con un control adecuado. La enfermedad relacionada con Met puede ser el cáncer, y el cáncer puede ser el cáncer de ovario. Por último hay un método para determinar la eficacia de un agente inhibidor de Met, que comprende las etapas: (a) proporcionar un primer tejido o muestra biológica obtenida de un paciente que tiene un cáncer relacionado con Met, (b) proporcionar una composición de la invención; (c) poner en contacto el primer tejido o muestra biológica y el tejido o la muestra post-tratamiento, obtenida después de tratar al paciente con un agente inhibidor de Met, con esta composición, (d) determinar el nivel de expresión de Met en cada uno del primer tejido o muestra biológica y el tejido o la muestra post-tratamiento, y (e) comparar el nivel de expresión de Met en el primer tejido o muestra biológica con el nivel de expresión de Met en el tejido o en la muestra post-tratamiento para determinar la eficacia de dicho agente inhibidor de Met. En cada uno de estos métodos, el tejido o la muestra o las muestras biológicas pueden fijarse en formalina.

- La invención también incluye la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection bajo el número de registro PTA-7680.

- Los expertos en la materia podrán comprender y apreciar mejor estas y otras características, ventajas y objetos de la presente invención por referencia a la siguiente memoria descriptiva, reivindicaciones y dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

- Las Figuras IA a IF muestran la especificidad de Met4. Las Figuras IA y IB muestran las secciones de los bloques de tejido FFPE teñidos con Met4 (Panel A) o C28 (Panel B). La expresión de Met se produce específicamente en las células epiteliales basales (eje de la flecha larga con punta de flecha cerrada), las células endoteliales (punta de flecha cerrada, sin eje) y en la membrana basolateral de las células secretoras (flecha larga y punta de flecha abierta). Las figuras IC a IF muestran la tinción por inmunofluorescencia con Met4 y C28. Las células de cáncer gástrico MKN45 (positivas para Met) y las células NIH3T3 (negativas para Met) se co-cultivaron y se fijaron con formalina. La Figura 1C muestra Met4; La Figura 1D muestra Brighfield; la Figura 1E muestra Met C28, y la Figura 1F es una superposición de las Figuras 1C y 1E.

- La Figura 2 es una transferencia de Western que caracteriza el epítipo de Met4. Se realizó la transferencia de Western de las proteínas de los lisados celulares de células cancerosas de ovario IGROV1 positivas para Met o A2780 negativas para Met. Se trató la membrana de nitrocelulosa con formalina al 10%, se hizo hervir en solución de recuperación de antígeno o se sometió a ambos tratamientos de forma secuencial. Las membranas tratadas se sondaron con Met4 y se desarrollaron utilizando quimioluminiscencia. LC: control de carga.

- Las Figuras 3A-3C comparan la reactividad a Met4 y Met C-28 en las líneas celulares de cáncer de ovario fijadas en formalina. La Figura 3A es una transferencia de Western de las líneas celulares de cáncer de ovario sondadas con Met C-28. LC: control de carga. En la Figura 6 se muestran los resultados de la expresión de ARN proporcionales a la expresión de proteínas observada. La Figura 3B muestra la tinción inmunohistoquímica con C28 y Met4 de sedimentos celulares FFPE de las líneas celulares de cáncer de ovario. El color marrón indica la expresión positiva del receptor Met. Es de destacar que todas las líneas celulares se tiñen con Met C-28. En cambio la reactividad a Met4 se correlaciona con la expresión de Met medida en la transferencia de Western. La Figura 3C es un gráfico que muestra una correlación entre las intensidades de señal del WB y las mediciones IHC. El WB se sondó con el anticuerpo monoclonal 3D4 (Zymed) y se cuantificó la expresión de c-Met utilizando el sistema LICOR. La IHC se realizó con Met4 a una dilución de 1:500 (4 µg/ml). El coeficiente de correlación de Pearson es 0,602.

Las Figuras 4A y 4B muestran la especificidad de la unión de Met4 en las líneas celulares fijadas en formalina. La Figura 4A es una transferencia de Western de las líneas celulares de cáncer de ovario sondadas con Met C-28. Se utiliza β -tubulina como control de carga. La Figura 4B muestra una tinción inmunohistoquímica con Met4 de los sedimentos celulares FFPE. El color marrón indica la expresión positiva del receptor Met. U118: glioblastoma, SW1783: glioblastoma U373: glioblastoma, NIH3T3: fibroblastos de ratón, DBTRG: glioblastoma, U87: glioblastoma, S114: células NIH 3T3 transfectadas con los genes humanos para HGF/SF y Met 23, MCF7: cáncer de mama.

Las Figuras 5A y 5B muestran la reactividad a Met4 en los cánceres de ovario y el glioblastoma. Las secciones de los cánceres de ovario (Figura 5A) o una micromatriz de tejido de glioma (Figura 5B) se tiñeron con Met4. Se tomaron imágenes con un aumento de 400X. Se incluyeron controles negativos y positivos de tejidos de próstata en cada tinción y se muestran en la Figura 3B (panel inferior derecho). En las Tablas 2 y 3 se muestran los resúmenes de las tinciones histológicas.

La Figura 6 es una mancha de transferencia que muestra la expresión de ARN de Met en las líneas celulares de cáncer de ovario. El ARN se aisló a partir de líneas celulares de cáncer de ovario. Se amplificó un fragmento dentro del dominio Met quinasa a partir de ARN de transcripción inversa, amplificado 32 ciclos y se visualizó en un gel de agarosa.

La Figura 7 muestra la selección con la biblioteca de péptidos expresados en fagos.

Figura 8 es un diagrama de flujo del procedimiento para el mapeo del epítipo de Met4.

La Figura 9 es un gráfico de barras que muestra los valores OD450nm del ELISA de los clones de fagos específicos para Met4 recuperados de la biblioteca 12 de expresión en fagos en comparación con el tipo silvestre M13.

Las Figuras 10A-C muestran el ELISA competitivo de Met4 RA4E en presencia del péptido 1 y 2. La Figura 10A muestra el ELISA de Met4 (1:10.000) en presencia del péptido 1 diluido en serie (relación molar 10 a 320 veces de Met4). La Figura 10B muestra el ELISA de Met4 en presencia del péptido 1 y 2. La Figura 10C muestra el ELISA de RA4E en presencia del péptido 1 y 2.

La Figura 11A-C muestra la tinción por inmunofluorescencia de Met4 y RA4E en células MKN45 y NIH3T3. Figura 11A: Rojo, Met4 y Verde, C28. Figura 11B: Rojo, Met4; Verde, RA4E. Figura 11C: Rojo, Met4 + péptido 1, Verde, RA4E + péptido 1.

Descripción detallada de las formas de realización preferentes

Las formas de realización preferentes de la presente invención pueden entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de las formas de realización específicas y los Ejemplos y Listados de Secuencias incluidos de aquí en adelante.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el significado comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

La "afinidad" o "avidez" de un anticuerpo por un antígeno puede determinarse experimentalmente utilizando cualquier método adecuado (véase, por ejemplo, Berzofsky, *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions", en Fundamental Immunology, Paul, W E, Ed., Raven Press, Nueva York, NY (1984), Kuby, Jams Immunology, WH Freeman and Company Nueva York, N.Y. (1992), y los métodos que se describen en el presente documento). La afinidad medida de una interacción antígeno-anticuerpo concreta puede variar si se mide bajo condiciones diferentes (por ejemplo, la concentración salina, el pH). De esta manera, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión al antígeno (por ejemplo, K sub D, CI50) se hacen preferentemente con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "muestra biológica" se refiere a un extracto de órgano o de tejido y a cualquier fluido u otro material derivado del cuerpo de un sujeto normal o enfermo, tal como sangre, suero, plasma, linfa, orina, saliva, lágrimas, fluido cerebroespinal, leche, líquido amniótico, bilis, líquido ascítico, pus y similares.

El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Tales portadores pueden ser líquidos estériles, tal como agua y aceites, que incluyen los de origen petrolífico, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Como portadores se emplean preferentemente agua o solución acuosa, soluciones salinas y dextrosa acuosa y soluciones de glicerol.

El término "célula" se utiliza en su sentido biológico habitual, y no se refiere a un organismo multicelular entero. La célula puede estar, por ejemplo, *in vitro*, por ejemplo, en un cultivo celular. La célula puede ser procariota (por ejemplo, una célula bacteriana) o eucariota (por ejemplo, una célula de mamífero o de planta).

"Derivado" se refiere a una proteína o a un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína o de un polipéptido parental que ha sido modificado por la introducción de sustituciones, supresiones o adiciones de residuos de aminoácidos. La proteína o el polipéptido derivado posee una función similar o idéntica a la del polipéptido parental.

La expresión "resto detectable" como se utiliza en el presente documento se refiere a un resto que puede ser detectado y/o del que pueden obtenerse imágenes *ex vivo* o *in vitro*, mediante un procedimiento o una modalidad descrita en el presente documento o conocida para un experto en la materia. Como se utiliza en el presente documento, el resto detectable puede ligarse directa o indirectamente al anticuerpo Met4 de la presente invención, a un anticuerpo anti-Met4, un fragmento de unión, o derivado del mismo.

La expresión "marcado diagnósticamente" significa que el anticuerpo de la presente invención, un anticuerpo anti-Met4, un fragmento de unión, o un derivado del mismo, lleva fijado un marcador detectable diagnósticamente.

"Formaldehído" se refiere a un producto químico orgánico que tiene la fórmula de CH_2O . El formaldehído es soluble en agua. "Formalina" se refiere a una solución acuosa de formaldehído.

"Fragmento" se refiere a una proteína o a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de por lo menos 4 residuos de aminoácidos (preferentemente, por lo menos 10 residuos de aminoácidos, por lo menos 15 residuos de aminoácidos, por lo menos 20 residuos de aminoácidos, por lo menos 25 residuos de aminoácidos, por lo menos 40 residuos de aminoácidos, por lo menos 50 residuos de aminoácidos, por lo menos 60 residuos de aminoácidos, por lo menos 70 residuos de aminoácidos, por lo menos 80 residuos de aminoácidos, por lo menos 90 residuos de aminoácidos, por lo menos 100 residuos de aminoácidos, por lo menos 125 residuos de aminoácidos, o por lo menos 150 residuos de aminoácidos) de la secuencia de aminoácidos de una proteína o de un polipéptido parental. Ejemplos de fragmentos de unión comprendidos dentro de la expresión "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen ([τ]) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (n) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región bisagra, (in) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, ([τ]v) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.* (1989) *Nature* 341 544-46), que consiste en un dominio VH, y también pueden utilizarse (v[τ]) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, anticuerpos de camélidos, y anticuerpos camelizados. Tales anticuerpos, por ejemplo, pueden incluir las CDR de sólo uno de los dominios variables que se describen en el presente documento. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes distintos, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, por un conector sintético que les permite generarse como una única cadena de proteínas en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv), véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242 423-26, Huston *et al.* (1988) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 85 5879-83). Tales anticuerpos monocatenarios también pretenden estar comprendidos dentro de la expresión "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando las técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia, y los fragmentos se evaluaron para la función de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Una proteína o anticuerpo que está "ligado a un resto detectable" es uno que está unido, covalentemente, a través de un conector, o a través de enlaces iónicos, de van der Waals, o de hidrógeno a un marcador de manera que pueda detectarse la presencia de la proteína o del anticuerpo detectando la presencia del marcador o resto detectable unido a la proteína o al anticuerpo.

Un "anticuerpo monoclonal o AcMo" como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo que es parte de una población prácticamente, si no totalmente, homogénea de anticuerpos que son un producto de un único clon de linfocitos B. Los AcMos son conocidos en la técnica y se generan utilizando métodos convencionales; véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); patente de EE.UU. N° 4.376.110; Harlow, E. *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), *Monoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Nueva York, N.Y. (1980); H. Zola *et al.*, en *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press, 1982). Los AcMos también pueden producirse de manera recombinante, por ejemplo, de acuerdo con la patente de EE.UU. N° 4.816.567.

"Cribado" o "diagnóstico" se refiere al diagnóstico, el pronóstico, la monitorización, la caracterización, la selección de pacientes (incluyendo los participantes en los ensayos clínicos), y la identificación de pacientes en riesgo o que tienen un trastorno o evento clínico concreto o que tienen más probabilidades de responder a un tratamiento terapéutico concreto, o para evaluar o monitorizar la respuesta del paciente a un tratamiento terapéutico concreto.

Una "molécula pequeña" se refiere a una composición que tiene un peso molecular inferior a 3 kilodaltons (kDa), y preferentemente inferior a 15 kilodaltons, y más preferentemente inferior a aproximadamente 1 kilodaltons. Las moléculas pequeñas pueden ser ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas orgánicas (que contienen carbono) o inorgánicas. Como comprenderán los expertos en la materia, en base a la presente descripción, pueden cribarse extensas bibliotecas de mezclas químicas y/o biológicas, a

menudo extractos de algas, hongos o bacterias con cualquiera de los ensayos de la invención.

"Sujeto" o "paciente" se refiere a un mamífero, preferentemente un ser humano, que necesita un tratamiento para una afección, trastorno o enfermedad.

La expresión "célula tumoral" se refiere a una célula cancerosa, precancerosa o transformada *in vivo*, *ex vivo*, o en cultivo tisular, que presenta cambios fenotípicos espontáneos o inducidos que no implican necesariamente la captación del nuevo material genético. Aunque la transformación puede surgir de la infección con un virus de transformación y la incorporación del nuevo ácido nucleico genómico, o la captación del ácido nucleico exógeno, también puede surgir espontáneamente o después de la exposición a un carcinógeno, mutando de esta manera un gen endógeno. Un "tumor" incluye por lo menos una célula tumoral.

En la siguiente descripción, se hará referencia a diversas metodologías conocidas para los expertos en la materia de la inmunología, la biología celular y la biología molecular. Los trabajos de referencia estándares que exponen los principios generales de la inmunología incluyen A.K Abbas *et al.*, Cellular and Molecular Immunology (cuarta ed.), W.B. Saunders Co., Filadelfia, 2000; C.A. Janeway *et al.*, Immunobiology. The Immune System in Health and Disease, Cuarta ed., Garland Publishing Co., Nueva York, 1999; Roitt, I. *et al.*, Immunology, (edición actual) CV. Mosby Co., St. Louis, Mo (1999), Klein, J., Immunology, Blackwell Scientific Publications, Inc., Cambridge, Mass., (1990).

Los anticuerpos son polipéptidos conocidos también como moléculas de inmunoglobulina (Ig), que presentan especificidad de unión a un epítipo o antígeno específico. El uso actual del término "anticuerpo" es amplio, extendiéndose más allá de la molécula de Ig de 4 cadenas intacta convencional (característica de los anticuerpos IgG, IgA e IgE). Un anticuerpo puede producirse en forma de anticuerpos policlonales (por ejemplo, suero inmunológico fraccionado o no fraccionado) o un AcMo (véase más adelante). También se incluyen las moléculas de Ig con más de una especificidad de antígeno (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico formado por la unión de las cadenas o regiones de unión al antígeno de dos anticuerpos diferentes). Los anticuerpos son por lo general polipéptidos que presentan especificidad de unión a un antígeno específico. Una molécula de Ig nativa es por lo general una glicoproteína heterotetramérica, compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas, estando ligada cada cadena L a una cadena H por un enlace disulfuro intercatenario. Enlaces disulfuro adicionales hacen de puente entre las dos cadenas H. Cada cadena H y L tiene enlaces disulfuro intracatenarios separados regularmente. El extremo N-terminal de cada cadena H y de cada cadena L incluye una región (V_H y V_L) o dominio variable (V). Hacia el extremo C-terminal de los dominios V_H hay una serie de dominios (C_H) constantes (C); las cadenas L solo tienen un único dominio C en su extremo C-terminal (denominado C_L). Residuos de aminoácidos concretos forman una interfaz entre los dominios V_H y V_L . Las cadenas L de vertebrados se asignan a uno de dos tipos distintos, también denominados isotipos, κ y λ , en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios C. Dependiendo de la secuencia de sus dominios C_H , las Igs son miembros de clases diferentes: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, identificadas por sus cadenas H denominadas, respectivamente, γ , μ , α , ϵ y δ . También se conocen varias subclases o isotipos, por ejemplo, los isotipos IgG IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ (que comprenden las cadenas H conocidas como γ_1 , γ_2 , γ_3 y γ_4 , respectivamente), o los isotipos IgA IgA₁, e IgA₂ (que comprenden las cadenas H α_1 y α_2 , respectivamente).

Cuando se utiliza para describir dominios o regiones de moléculas de anticuerpos, el término "variable" se refiere a secuencias de aminoácidos que difieren entre diferentes anticuerpos y que son responsables de la especificidad antígeno-anticuerpo. La variabilidad de secuencia se distribuye uniformemente por toda la región V pero por lo general es mayor en tres regiones concretas, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables, que están presentes en los dominios V_H y V_L . Las partes más altamente conservadas de los dominios V se llaman regiones marco (FR). Cada dominio V_H y V_L comprende por lo general cuatro regiones FR que adoptan en gran parte una configuración de hoja β , unida a tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de hoja β . Las CDR en cada cadena se mantienen muy cercanas mediante las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno (Kabat, EA *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987)). Los dominios C no están implicados directamente en la unión al antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la opsonización, la fijación del complemento y la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

En la definición de anticuerpo también se incluye un fragmento de unión al antígeno de una molécula de Ig, que incluye, fragmentos scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv, todos conocidos en la técnica. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación, y pueden tener una menor unión no específica a tejido que un anticuerpo intacto (Wahl *et al.*, J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)). Los fragmentos Fab (y otras formas de anticuerpos monovalentes que solo tienen un único sitio de unión al antígeno), tienen otras ventajas conocidas, especialmente si se prefiere evitar o limitar la internalización del anticuerpo en las células que contienen Met *in vivo* o la activación de Met y las consiguientes vías de transducción de señales.

Se comprenderá que las formas o los fragmentos Fab, F(ab')₂, Fv y scFv de los anticuerpos útiles en la presente invención pueden utilizarse para la detección, la cuantificación o el aislamiento de las proteínas Met y el diagnóstico o el tratamiento de los tumores que expresan Met de la misma manera que un anticuerpo intacto. Los fragmentos

convencionales se producen por lo general por escisión proteolítica, utilizando enzimas tales como la papaína (para los fragmentos Fab) o la pepsina (para los fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos Fv se describen en (Hochman, J. *et al.*, 1973, *Biochemistry* 12:1130-1135; Sharon, J., *et al.*, 1976, *Biochemistry* 15:1591-1594). Los polipéptidos scFv incluyen las regiones hipervariables de la Ig de interés y recrean el sitio de unión al antígeno de la Ig nativa al tiempo que son una fracción del tamaño de la Ig intacta (Skerra, A. *et al.* (1988) *Science*, 240: 1038-1041; Pluckthun, A. *et al.* (1989) *Methods Enzymol* 178: 497-515; Winter, G. *et al.* (1991) *Nature*, 349: 293-299); Bird *et al.*, (1988) *Science* 242: 423; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:5879; patentes de EE.UU. N^{os} 4.704.692, 4.853.871, 4.946.778, 5.260.203, 5.455.030. También se incluyen como anticuerpos los diacuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados mediante la combinación de más de un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno de anticuerpos de especificidad diferente.

La presente invención se refiere a un anticuerpo denominado "Met4" que se une a un epítipo en el dominio extracelular de Met. Como se describe en el Ejemplo 7 más adelante, el epítipo es el polipéptido DVLPEFR en los residuos de aminoácidos 236-242 de la proteína Met humana (SEC ID N^o 1, véase la Tabla 5) o, más concretamente, el epítipo es el polipéptido DVLP en los residuos de aminoácidos 236-239 de la SEC ID N^o 1 (Tabla 5).

Se considera importante que Met4 se une a Met tratado con formalina y puede cuantificar con precisión la expresión de Met desnaturalizado en los tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE). Es decir, Met4 resulta útil en preparaciones de tejido para diagnóstico y pronóstico. En una forma de realización, el anticuerpo Met4 es un agente de diagnóstico de acompañamiento para los fármacos inhibidores de Met. Además, debido a la reactividad a Met4 con la superficie de las células que expresan Met, Met4 también resulta útil con las aplicaciones *in vivo* para la obtención de imágenes moleculares.

El anticuerpo monoclonal Met4 es producido por una línea celular de hibridoma que fue depositada el 29 de junio de 2006, en la American Type Culture Collection (ATCC), bajo el número de registro PTA-7680. La dirección de la ATCC es 10801 University Blve., Manassas, VA, 20110-2209. El hibridoma Met4 fue aislado en base a un ensayo de cribado en tejidos de próstata FFPE y a la expresión específica establecida de c-Met en determinadas subpoblaciones de células epiteliales y endoteliales de próstata (Figura 1A y B). Este método de cribado aumentaba en gran medida las posibilidades de obtener un anticuerpo anti-Met que reaccione con c-Met en los tejidos FFPE.

En el presente documento se describe un anticuerpo anti-Met, o un fragmento o derivado de ese anticuerpo, que compite con un anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection bajo el número de registro PTA-7680. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "compite con un anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection bajo el número de registro PTA-7680" se refiere a cualquier anticuerpo monoclonal o policlonal (por ejemplo, sea producido por un ratón, un conejo o por otro organismo) que reconoce el mismo epítipo que un anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection bajo el número de registro PTA-7680. Puede demostrarse si tal anticuerpo anti-Met, fragmento o derivado del mismo, compite de ese modo mediante métodos de ensayo biológico tales como el ELISA competitivo. Por ejemplo, la unión de Met4 a la proteína Met puede medirse por ELISA indirecto. Es decir, una mayor concentración de Met4 añadido al sistema de reacción da habitualmente un mayor valor DO (densidad óptica) cuantitativamente. Si se mezcla un anticuerpo anti-Met policlonal de conejo con Met4 en una relación molar diferente, y el valor DO disminuye, significa que el anticuerpo de conejo compite con un anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection bajo el Número de Registro PTA-7680. (Véase, el Ejemplo 7).

Los anticuerpos, fragmentos y sus derivados, son útiles para medir la expresión de c-Met en tejidos FFPE. Met4 demuestra especificidad única para c-Met y cuantifica los niveles de expresión de c-Met en tejidos FFPE con buena precisión, evaluada por comparación de la IHC de Met4 y las señales de la transferencia de Western ($\sigma = 0,602$) (Figura 3). La tinción con Met4 era reproducible en tinciones repetidas en el mismo día, en días diferentes y cuando se comparaban dos lotes distintos de Met4.

La mayoría de los estudios sobre la expresión de c-Met en tejidos FFPE emplean diversos lotes del anticuerpo policlonal anti-Met C-28 de Santa Cruz. Una comparación sistemática de los anticuerpos comerciales c-Met, que incluyen tres anticuerpos monoclonales y dos lotes distintos de C-28 con la tecnología AQUATM demostraba claramente una cantidad mayor a la esperada de variabilidad en un estudio en micromatrices de tejido de cáncer de mama²⁶. Uno de los anticuerpos, DO-24 (Upstate), se unía al dominio extracelular de c-Met, mientras que el otro reconocía los epítopos intracelulares. A pesar del hecho de que todos los anticuerpos se unían al receptor Met en una transferencia de Western, su reactividad tisular era incongruente entre las muestras de cáncer de mama del mismo paciente. Los resultados más coherentes se obtuvieron al comparar MAB3729 de Chemicon y un único lote de C28. MAB3729 poseía una buena reproducibilidad y un coeficiente de correlación de 0,94 para núcleos de la misma línea celular en portaobjetos adyacentes de TMA. Al comparar dos lotes diferentes de C28, se observó una considerable variabilidad entre lotes, lo que compromete la utilidad clínica de C-28 y su utilidad para evaluar otros anticuerpos c-Met por comparación. Por lo tanto, actualmente no existe un "patrón de oro" para el ensayo de anticuerpos novedosos que reaccionan con c-Met en las preparaciones de tejidos FFPE. Sin embargo, Met4 ha sido

validado en sedimentos celulares FFPE comparando la cuantificación de c-Met por transferencia de Western con la cuantificación por tinción IHC (Figura 3C).

Met4 reacciona con un epítipo en los aminoácidos extracelulares 25 a 567 de la proteína receptora Met⁴¹. Más específicamente, Met4 reacciona con un epítipo en los aminoácidos extracelulares 236 a 242 de Met. Aun más específicamente, Met4 reacciona con un epítipo en los aminoácidos extracelulares 236 a 239 de Met (Ejemplo 6). El sitio de unión a Met4 es sensible a la desnaturalización por ebullición en tampón de muestra SDS, pero se restablece por recuperación con calor o fijación con formalina (Figura 2). Normalmente se utiliza la misma recuperación con calor con los tejidos fijados en formalina y mejora enormemente la reactividad del anticuerpo⁵⁰. La ebullición hidroliza los enlaces que se generan por entrecruzamiento con formalina y también provoca el replegamiento de las proteínas. Tanto la fijación en formalina como la recuperación con calor resultaron eficaces para restablecer el sitio de unión a Met4 dentro de la proteína receptora Met desnaturalizada después de la transferencia de Western. La fiabilidad de un ensayo es especialmente importante cuando se aplican los valores de medición a las decisiones sobre el tratamiento del paciente. Por lo tanto, la variabilidad intraensayo e interensayo del ensayo IHC de Met4 se determinó utilizando sedimentos celulares. Se supone que el material celular en un sedimento celular es más homogéneo que en una sección de tejido, ya que consiste en un único tipo de células. Sin embargo, se observaron importantes diferencias morfológicas entre los portaobjetos de sedimentos celulares que se obtuvieron a partir de secciones adyacentes dentro del mismo bloque de tejido. Esta variabilidad aumentaba el %CV de la comparación intraensayo e interensayo.

Algunos anticuerpos Met que se unen al dominio citoplasmático de c-Met reaccionan con los epítipos nucleares. Un estudio reciente demuestra que el dominio citoplasmático de Met puede escindirse y translocarse al núcleo⁵¹. Sin embargo, la función biológica de los fragmentos nucleares de Met, su actividad quinasa y las dianas y la amplia relevancia clínica de la expresión nuclear de Met son inciertas. La expresión nuclear de Met medida con el anticuerpo MAB3729 en las secciones de TMAs de cáncer de mama se asociaron con una disminución de la supervivencia a 5 años del 75% al 65%²⁶. Se necesitan estudios adicionales de la expresión nuclear de c-Met para evaluar su papel como biomarcador.

Aunque se ha observado claramente la activación de c-Met a través de la sobreexpresión o la mutación somática de genes en determinados tipos de cáncer, parecen ser poco frecuentes en los gliomas o cánceres de ovario primarios. La sobreexpresión de c-Met a través de la duplicación del gen c-Met en minicromosomas se observó en 3/18 gliomas de grado IV y en 1/18 de grado II⁵². En una cohorte diferente, las amplificaciones de genes c-Met se producían en 3/11 gliomas⁵³. Como se demuestra en los Ejemplos del presente documento, se confirmó el aumento de la expresión de c-Met en gliomas de alto grado en el análisis de un TMA de glioma. Sin embargo, inesperadamente, las células endoteliales de la vasculatura tumoral de los gliomas no siempre muestran expresión de c-Met. A diferencia de los gliomas, todos los cánceres de ovario expresan c-Met, y 7/28 han demostrado una alta expresión de c-Met. Esta observación difiere de un estudio previo que observaba una menor sobreexpresión de c-Met en el cáncer endometrioide de ovario y una alta expresión de c-Met del 10% en los demás subtipos histológicos⁵⁴. Se desconocen los mecanismos responsables de la alta expresión de c-Met y el estado de activación de c-Met en el cáncer de ovario. Una comparación del ARN de c-Met y la expresión de proteínas en el panel de líneas celulares para este estudio demostró una correlación pobre. No está claro, en las líneas celulares de cáncer de ovario, si la alta expresión de proteína c-Met se produce debido a la amplificación del gen c-Met, el aumento de la transcripción o la retención post-traducciona de la proteína c-Met. La relevancia de la sobreexpresión de c-Met en el cáncer de ovario y su relación con la eficacia terapéutica del fármaco inhibidor de Met se evaluará mejor en un estudio clínico que compare la respuesta al tratamiento y los niveles de expresión de c-Met.

La presente invención se refiere también a un método para detectar, en una muestra biológica, células de las que se sospecha que expresan Met, tales como las células tumorales. Pueden utilizarse diversas técnicas de inmunoensayo conocidas en la técnica, tales como los ensayos de unión competitiva, los ensayos de tipo sándwich directos o indirectos y los ensayos de inmunoprecipitación llevados a cabo en las fases heterogénea u homogénea. Véase, por ejemplo, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987) págs. 147-158). Los anticuerpos utilizados de esta manera pueden ser marcados de manera detectable con un marcador detectable que produce, directa o indirectamente, una señal detectable. Un experto en la materia puede generar fácilmente marcadores o agentes de detección adecuados o para el anticuerpo Met4. El anticuerpo Met4 puede detectarse en el tejido o en la muestra ligando un resto detectable al anticuerpo Met4 (o a un anticuerpo anti-Met4). El tejido o la muestra se pone en contacto con el anticuerpo Met4 marcado de manera detectable (y con el anticuerpo anti-Met4, si el resto detectable se liga en cambio al anticuerpo anti-Met4), y se detecta la presencia del resto detectable en el tejido o en la muestra.

Existen muchos marcadores y métodos de marcado diferentes conocidos para los expertos en la materia. Ejemplos de los tipos de marcadores que pueden utilizarse en la presente invención incluyen isótopos radiactivos, isótopos paramagnéticos, y compuestos de los que pueden obtenerse imágenes por tomografía de emisión de positrones (PET). Los expertos en la materia conocerán otros marcadores adecuados para la unión a los anticuerpos utilizados en la invención, o serán capaces de determinarlos, mediante experimentación de rutina. Resultan eficaces los anticuerpos marcados diagnósticamente (por ejemplo, marcados radiactivamente).

Los marcadores detectables adecuados para el diagnóstico incluyen marcadores radiactivos, fluorescentes, fluorogénicos, cromogénicos, u otros marcadores químicos. Los radiomarcadores útiles, que se detectan simplemente mediante un contador gamma, un contador de centelleo, exploración PET o autorradiografía incluyen ^3H , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S y ^{14}C . Además, el ^{131}I es un isótopo terapéutico útil (véase más adelante).

Los marcadores fluorescentes comunes incluyen fluoresceína, rodamina, dansilo, ficoeritrina, ficocianina, alofococianina, o-ftaldehído y fluorescamina. El fluoróforo, tal como el grupo dansilo, debe ser excitado por luz de una longitud de onda concreta hasta la fluorescencia. Véase, por ejemplo, Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Sexta Ed., Molecular Probes, Eugene, Oreg., 1996). La fluoresceína, los derivados de la fluoresceína y las moléculas similares a la fluoresceína tales como el Verde de Oregon.TM. y sus derivados, Verde de Rodamina.TM. y Verde de Rhodol.TM., se acoplan a grupos amina utilizando el isotiocianato, el éster de succinimidilo o grupos que reaccionan con diclorotriazinilo. De manera similar, los fluoróforos también pueden acoplarse a tioles utilizando maleimida, yodoacetamida, y grupos que reaccionan con la aziridina. Las rodaminas de longitud de onda larga, que son básicamente derivados del Verde de Rodamina.TM. con sustituyentes en los nitrógenos, se encuentran entre los reactivos de marcado fluorescentes más fotoestables conocidos. Sus espectros no se ven influidos por los cambios de pH entre 4 y 10, una ventaja importante sobre las fluoresceínas para muchas aplicaciones biológicas. Este grupo incluye tetrametilrodaminas, X-rodaminas y derivados del Rojo de Texas.TM. Otros fluoróforos preferentes para derivatizar el péptido de acuerdo con la presente invención son aquellos que se excitan mediante luz ultravioleta. Los ejemplos incluyen el azul cascada, derivados de la cumarina, naftalenos (de los cuales es miembro el cloruro de dansilo), pirenos y derivados de piridiloxazol. También se incluyen como marcadores dos materiales inorgánicos relacionados que han sido descritos recientemente: nanocristales semiconductores, que comprenden, por ejemplo, sulfato de cadmio (Bruchez, M. *et al.*, Science 281:2013-2016 (1998), y puntos cuánticos, por ejemplo, seleniuro de cadmio desactivado con sulfuro de cinc (Chan, WCW *et al.*, Science 281:2016-2018 (1998)).

En otro método, se deja reaccionar los grupos amino de un anticuerpo con un reactivo que produce un producto fluorescente, por ejemplo, fluorescamina, dialdehídos tales como o-ftaldialdehído, naftaleno-2,3-dicarboxilato y antraceno-2,3-dicarboxilato. Los derivados de 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD), de cloruro y de fluoruro, resultan útiles para modificar las aminas para producir productos fluorescentes.

Los anticuerpos también pueden marcarse para su detección utilizando metales emisores de fluorescencia tales como $^{152}\text{Eu}^+$, u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden fijarse al péptido utilizando grupos quelantes de metales tales como el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El DTPA en forma de anhídrido puede modificar fácilmente los anticuerpos que contienen NH_2 .

Los anticuerpos también pueden hacerse detectables acoplándolos a un compuesto fosforescente o quimioluminiscente. A continuación, se determina la presencia del péptido marcado quimioluminiscentemente detectando la presencia de la luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Ejemplos de agentes quimioluminiscentes especialmente útiles son el luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato. Asimismo, puede utilizarse un compuesto bioluminiscente para marcar los péptidos. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en los sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Compuestos bioluminiscentes importantes para los fines de marcado son luciferina, luciferasa y aecuatorina.

En otra forma de realización más, se utiliza la detección colorimétrica, basada en compuestos cromógenos que tienen, o dan como resultado, cromóforos con altos coeficientes de extinción.

Puede lograrse la detección *in situ* del anticuerpo marcado eliminando una muestra histológica de un sujeto y examinándola mediante microscopía en condiciones apropiadas para detectar el marcador. Los expertos en la materia percibirán fácilmente que puede modificarse cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como los procedimientos de tinción) con el fin de lograr tal detección *in situ*.

Una forma de marcar un anticuerpo es ligándolo a una enzima y utilizándolo en un inmunoensayo enzimático (EIA), o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Tales ensayos se describen en mayor detalle en: Butler, J.E., The Behavior of Antigens and Antibodies Immobilized on a Solid Phase (capítulo 11) En: STRUCTURE OF ANTIGENS, Vol. 1 (Van Regenmortel, M., CRC Press, Boca Raton 1992, págs. 209-259; Butler, J.E., ELISA (capítulo 29), En: van Oss, C.J. *et al.*, (eds.), IMMUNOCHEMISTRY, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1994, págs. 759-803 Butler, J.E. (ed.), IMMUNOCHEMISTRY OF SOLID-PHASE IMMUNOASSAY, CRC Press, Boca Raton, 1991; Voller, A. *et al.*, Bull. WHO 53:55-65 (1976); Voller, A. *et al.*, J. Clin. Pathol. 31:507-520 (1978); Butler, J.E., Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981); Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, 1980 Ishikawa, E. *et al.* (eds.) Enzyme Immunoassay, Kagaku Shoin, Tokio, 1981. Esta enzima, a su vez, cuando se expone más tarde a su sustrato, reaccionará con el sustrato de tal manera que produzca un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Las enzimas que se utilizan comúnmente para este fin incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, Δ -V-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa

de levadura, α -glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, asparaginasa, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa.

- 5 En el presente documento se describen modificaciones químicas que incluyen las modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-Met. Se introduce en la molécula un tipo de modificación haciendo reaccionar residuos de aminoácidos diana con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con los residuos N-terminal o C-terminal o las cadenas laterales seleccionadas.

- 10 La derivatización con agentes bifuncionales resulta útil para el entrecruzamiento del anticuerpo (o fragmento o derivado) a una superficie o matriz de soporte insoluble en agua para su uso en un método de purificación (que se describe más adelante). Los agentes de entrecruzamiento comúnmente utilizados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazo-acetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluyen ésteres de disuccinimidilo como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes derivatizadores
15 tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato crean productos intermedios fotoactivables que pueden entrecruzarse cuando se irradian con luz. En la inmovilización de proteínas se utilizan matrices reactivas insolubles en agua tales como los carbohidratos activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes de EE.UU. N^{os} 3.969.287, 3.691.016, 4.195.128, 4.247.642, 4.229.537 y 4.330.440.

- 20 Otras modificaciones incluyen la desamidación de los residuos de glutaminilo y asparaginilo a los correspondientes residuos glutamilo y aspártico, respectivamente, la hidroxilación de la prolina y la lisina, la fosforilación de los grupos hidroxilo de los residuos serilo o treonilo, la metilación de los grupos α -amino de la lisina, la arginina, y la cadena lateral de la histidina (véase, por ejemplo, T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman y Co., San Francisco, (1983)), la acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo
25 carboxilo C-terminal.

- En el presente documento también se describen anticuerpos en los que se ha modificado el patrón nativo de glicosilación del polipéptido. Esto supone la delección de uno o más restos carbohidrato y/o la adición de uno o más
30 sitios de glicosilación que no están presentes en las cadenas del polipéptido nativo. La glicosilación de proteínas está por lo general ligada a N (fijada a una cadena lateral de Asp) o ligada a O (fijada a un ácido hidroxiamino, más comúnmente Ser o Thr; posiblemente 5-hidroxiPro o 5-hidroxiLys). El tripéptido Asp-Z-Ser y Asp-Z-Thr (donde Z es cualquier aminoácido excepto Pro) son secuencias de reconocimiento para la fijación enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de la Asp. La presencia de cualquiera de estas secuencias crea un sitio potencial de N-glicosilación. La O-glicosilación implica habitualmente la unión de N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa. La
35 adición de sitios de glicosilación en el polipéptido puede lograrse modificando la secuencia nativa de aminoácidos para incluir una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para los sitios de N-glicosilación) o la adición de, o la sustitución por, una o más serina o treonina (para los sitios de O-glicosilación). La secuencia de aminoácidos puede modificarse a través de cambios a nivel del ADN, por ejemplo, mutando el ADN que codifica la cadena polipeptídica de la Ig en las bases preseleccionadas para generar codones que codifican los aminoácidos
40 deseados. Véase, por ejemplo la patente de EE.UU. N^o 5.364.934.

- También puede utilizarse el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar o los azúcares pueden fijarse a (a) arginina e His, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de Cys, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, Thr, o
45 hidroxipro, (e) residuos aromáticos tales como los de Phe, Tyr, o Trp, o (f) el grupo amida de Gln. Estos métodos se describen en el documento WO87/05330 (11 de septiembre de 1987) y en Aplin *et al.*, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, págs. 259-306 (1981).

- La eliminación de restos carbohidrato existentes puede lograrse químicamente o enzimáticamente o por sustitución mutacional de codones (como se ha descrito anteriormente). La desglicosilación química se logra, por ejemplo, exponiendo el polipéptido a ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente escinde la mayoría de los
50 azúcares o todos ellos excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), al tiempo que dejan el polipéptido intacto. Véanse: Hakimuddin *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987); Edge *et al.*, *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). Se utiliza cualquiera de una serie de endoglicosidasas y exoglicosidasas para la escisión enzimática de los restos carbohidrato de los polipéptidos (Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987)).
55

La glicosilación en sitios potenciales de glicosilación puede evitarse mediante el uso de la tunicamicina (Duskin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257:3105 (1982)) que bloquea la formación de enlaces N-glicosídicos.

- 60 Otro tipo de modificación química de los anticuerpos de la presente invención comprende unir a cualquiera de una serie de polímeros no proteicos diferentes, tales como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, o polioxialquilenos, de la manera descrita en las patentes de EE.UU. N^{os} 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 y 4.179.337 y en el documento WO93/00109.

- 65 Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse en una composición, que incluye los anticuerpos y un portador y/o un excipiente.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un método para diagnosticar o pronosticar una enfermedad relacionada con Met, tal como un cáncer, por ejemplo, el cáncer de ovario. El método utiliza el anticuerpo Met4, o un fragmento o derivado de tal anticuerpo, con un tejido o muestra biológica de un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene una enfermedad relacionada con Met. El método también puede utilizar un anticuerpo que compite con Met4 por la unión a Met, o un fragmento o derivado del mismo, con un tejido o una muestra biológica de un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene una enfermedad relacionada con Met. El anticuerpo anti-Met4, el anticuerpo competidor, o un fragmento o derivado del mismo, se liga a un resto detectable. La presencia del resto detectable se detecta en el tejido o en la muestra del paciente, y el nivel de expresión de Met en el tejido o en la muestra se determina y se compara con un control adecuado. En los Ejemplos que se presentan más adelante, se demuestra que el anticuerpo Met4 resulta útil para la detección de Met en varios tipos de tumores. En base a los datos presentados en los Ejemplos que se presentan más adelante, un experto en la materia puede establecer fácilmente controles adecuados como puntos de referencia de comparación para la expresión de Met. Un control adecuado es la mediana o el promedio del nivel de expresión de muchos pacientes que, o bien no tienen cáncer, o no tienen un tipo concreto de cáncer. Cuanto mayor sea el número de pacientes utilizados para establecer la mediana o el promedio de la expresión de Met como control, más precisa será la determinación diagnóstica. Preferentemente, se utilizan por lo menos 25, 50, ó 100 pacientes para establecer el nivel de control de la expresión.

La presente descripción también incluye un método para monitorizar o evaluar la eficacia de un tratamiento para el cáncer inhibidor de Met determinando si se ha inhibido o erradicado Met en las células de un paciente. El método utiliza el anticuerpo Met4, o un fragmento o derivado del mismo con un tejido o una muestra biológica de un paciente que ha recibido un agente inhibidor de Met, y Met4, o un fragmento o derivado del mismo, se liga a un resto detectable. La presencia del resto detectable se detecta en el tejido o en la muestra, y el nivel de expresión de Met en el tejido o en la muestra se determina y se compara con los niveles de Met pretratamiento o en tratamientos anteriores en el paciente para determinar si se ha inhibido o erradicado Met en las células del paciente.

Habiendo descrito ahora la invención de manera general, la misma se comprenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden ser limitativos de la presente invención, salvo que se especifique.

Ejemplos

Se evaluaron la especificidad de Met4 por c-Met, la precisión de la cuantificación de c-Met, y la fiabilidad del ensayo de tinción con Met4 en sedimentos celulares fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE). Se utilizó Met4 para medir la expresión de c-Met en una cohorte de muestras clínicas de tejido de cánceres de ovario y gliomas. En concreto, en 22 líneas celulares, la señal de Met4 del análisis inmunohistoquímico de sedimentos celulares FFPE se correlacionaba con las mediciones de transferencia de Western de la expresión de c-Met ($\sigma = 0,603$). A diferencia de Met4, el anticuerpo C-28 de Santa Cruz reaccionó con sedimentos celulares FFPE de líneas celulares que no expresaban c-Met. La reproductibilidad técnica de los ensayos de tinción con Met4 repetidos ascendió a un %CV = 37% para la variabilidad intraensayo y un %CV = 21% para la variabilidad interensayo. Los cánceres de ovario de los subtipos histológicos seroso, endometriode y de células claras mostraron tinción positiva con Met4 y en el 25% la señal de Met4 fue alta. La tinción con Met4 fue positiva en las células cancerosas del 63% de los gliomas, sin embargo la expresión de la tinción con Met4 en la vasculatura tumoral del glioma fue negativa en la mayoría de los casos. En base a estos resultados (es decir, debido a que el anticuerpo Met4 medía la expresión de c-Met de manera precisa y reproducible en tejidos FFPE), el anticuerpo Met4 resulta útil para la cuantificación de la expresión de c-Met en un tejido o en una muestra biológica en un contexto clínico.

Ejemplo 1: Materiales y Métodos para los Ejemplos 1-5; generación y validación de anticuerpos monoclonales:

La proteína recombinante Met 25-567H fue preparada por el laboratorio del Dr. Eric Xu en el Instituto Van Andel. La construcción Met 25-567H (SEC ID N° 1, aminoácidos en las posiciones 25-567) y la proteína Met 928 purificada fueron del laboratorio del Dr. Ermanno Gheradi en Cambridge Antibody Technology⁴¹. La proteína de fusión recombinante Met-IgG fue adquirida en R&D Systems (Minneapolis, MN).

Se produjeron anticuerpos monoclonales de ratón frente a Met inyectando a ratones BALB/c por vía intraperitoneal Met 25-567H nativo y desnaturalizado (ebullición en tampón de muestra SDS) en adyuvante completo de Freund, seguido por dos inyecciones adicionales con adyuvante incompleto de Freund. Después de 1 mes, se dio una inyección final por vía intraperitoneal e intravenosa sin adyuvante. Los antisueros policlonales de los ratones inmunizados se sometieron a ensayo por inmunofluorescencia indirecta con células NIH3T3 (negativas para Met) y MKN45 (positivas para Met) fijadas en formalina. Las células del bazo se fusionaron con células de mieloma P3X63AF8/653 utilizando técnicas estándar 4 días después de la inyección final. Las células de hibridoma se cribaron para determinar la reactividad a Met mediante ELISA y tinción por inmunofluorescencia.

Se recubrieron diez placas de 96 pocillos con 2 µg/ml de Met25-567H en tampón de recubrimiento (0,2 M de Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9,6, 50 µl por pocillo) durante toda la noche a 4°C. Se bloquearon las placas con PBS que contenía BSA al 1% (200 µl/pocillo) durante toda la noche a 4°C. Se añadieron cincuenta microlitros de sobrenadante de hibridoma a los pocillos durante 1,5 horas a temperatura ambiente (TA). Las placas se lavaron dos

- veces en tampón de lavado (PBS con Tween-20 al 0,05%), y se añadió IgG anti-ratón de cabra acoplada a fosfatasa alcalina (Sigma) (50 µl/pocillo) a una dilución de 1:2.000 durante 1,5 horas a TA. Después de lavar cuatro veces en tampón de lavado, se añadió CP-nitrofenil fosfato como sustrato de la fosfatasa (Kirkegaard y Perry Laboratories) durante 30 minutos, y se midió la absorbancia a 405 nm. Se seleccionaron un total de 34 hibridomas que presentaban una fuerte reactividad con Met25-567H (valor DO superior a 2,0) y se sometieron a ensayo en Met928 mediante ELISA y 14 de ellos fueron positivos. Los 14 clones que reaccionaron con Met25-567H y con Met928 se sometieron a ensayo frente a Met-IgG mediante ELISA. Siete clones resultaron ser positivos frente a las tres proteínas Met y se sometieron a ensayo mediante tinción por inmunofluorescencia.
- 10 Las células NIH3T3 y MKN45 se mezclaron y se sembraron sobre diez placas de 96 pocillos y se cultivaron a 37°C durante toda la noche. Las células se lavaron y se fijaron al día siguiente con formalina al 10%. Se añadieron cincuenta microlitros de sobrenadante de hibridoma de los siete clones a los pocillos que contenían células fijas durante 1,5 horas a 37°C. Las placas se lavaron dos veces en tampón de lavado (PBS con Tween-20 al 0,05%), y se añadió IgG anti-ratón de cabra conjugado con Rojo de Rodamina (Jackson ImmunoResearch Lab.) (30 µl/pocillo) a una dilución de 1:100 durante 1,5 horas a 37°C. Después de lavar dos veces en tampón de lavado, se examinaron las células bajo microscopio de fluorescencia. Cinco clones resultaron ser positivos y se recogieron y se expandieron. Los sobrenadantes de estos cinco clones y tres clones de la fusión anterior se validaron mediante técnicas de inmunohistoquímica en secciones de tejido prostático humano normal fijados en formalina. El clon 8G6 (denominado Met4) dio la señal más fuerte y se sub-clonó dos veces y se validó mediante ELISA frente a tres proteínas Met recombinantes. El anticuerpo monoclonal se produjo utilizando un biorreactor y se purificó utilizando columna de afinidad de proteína-G mediante FPLC.

Inmunohistoquímica:

- 25 Sedimentos celulares: las células NIH 3T3, S114 (células NIH 3T3 transfectadas con los genes humanos para HGF/SF y Met)²³, SK-LMS-1/HGF (una línea celular del leiomioma humano autocrino para Met humano y HGF/SF humano)²⁴, SW-1783, U118, U87, U373, DBTRG (glioblastoma cerebral humano), MCF-7 (cáncer de mama), ES-2, CaOV3, OV-90, SKOV3, TOV-112D, y TOV-21G (adenocarcinoma de ovario) se obtuvieron de la ATCC y se cultivaron de acuerdo con sus especificaciones de medios. Las líneas celulares 1847, 2780, OVCAR10, OVCAR5, OVCAR3, PEO-1 (adenocarcinomas de ovario) se obtuvieron del Pacific Ovarian Cancer Research Consortium (Seattle, WA). La 2008 se obtuvo del Dr. George Coucos (Universidad de Pennsylvania). Las capas de células se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%, se rasparon y se embebieron en HistoGel (Richard Allan-Scientific). Los sedimentos de HistoGel se procesaron utilizando los mismos ajustes que para los tejidos grandes de pacientes y se embebieron en parafina.
- 35 Tejidos humanos: se obtuvieron secciones de cáncer de ovario fijadas en formalina e incluidas en parafina del Pacific Ovarian Cancer Research Consortium bajo un protocolo aprobado por el IRB. Las micromatrices de tejidos de gliomas se adquirieron en Cybrdi (Frederick, Maryland). La recuperación de antígeno se realizó con Target Retrieval Solution, pH 9 (DAKO, Dinamarca) durante 20 minutos en un vaporizador de verduras de Black and Decker. Los portaobjetos se cargaron en el Autostainer de Dako. Todas las incubaciones siguientes se realizaron a temperatura ambiente en el Autostainer: se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena durante 8 minutos con peróxido de hidrógeno al 3%; a continuación se completó una etapa de bloqueo de la proteína utilizando un Serum-Free Protein Block de Dako durante 10 minutos. Se diluyó anticuerpo monoclonal Met4 anti-humano de ratón 1:150 en tampón Tris/BSA al 1% para teñir los portaobjetos de TMA y 1:500 para teñir los sedimentos celulares. Se diluyó anticuerpo policlonal anti-Met de Santa Cruz 1:300. Para el control de isotipo, se diluyó IgG de ratón purificado para hacerlo coincidir con la concentración de Met4. Se diluyeron anticuerpos secundarios IgG anti-conejo o anti-ratón biotinilados (Vector Labs) a 1:200 y se aplicaron durante 30 minutos. A continuación, se utilizó estreptavidina conjugada con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) a una concentración de 1:2.000 durante 30 minutos. Por último, se aplicó el sistema líquido DAB + sustrato cromógeno de Dako durante 7 minutos. Los portaobjetos se contrastaron con Automation Hematoxylin de Dako durante 2 minutos, se deshidrataron y se cubrieron con un cubreobjetos.

- La puntuación de las secciones teñidas inmunohistoquímicamente se llevó a cabo como se describe⁴². En resumen, se obtiene una puntuación acumulada multiplicando el porcentaje de células positivas por la intensidad de tinción. Las puntuaciones acumuladas se dividieron en categorías de 0 a 3 y se agruparon por el subtipo histológico (cáncer de ovario) o el grado del tumor (glioma).

Análisis de la transferencia de Western:

- 60 Se lisaron células subconfluentes en RIPA complementado con tampón con inhibidores de fosfatasa y proteasas (Roche) como se ha descrito⁴³. Los lisados de proteínas de las líneas celulares se midieron utilizando un ensayo de Bradford. Las muestras se midieron en el mismo día utilizando estándares BSA comprendidos entre 0 y 12 µg/ml. Las muestras se diluyeron de manera que 1-2 ml de muestra proporcionaron mediciones dentro del rango lineal de la curva estándar. Las muestras (50 mg) se resolvieron en un gradiente de 4-15% de SDS-PAGE y se transfirieron sobre ImmobilonTM-P PVDF (Millipore, Billerica, MA) o membranas de transferencia de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA). Las membranas para la transferencia de Western fijada en formalina se fijaron en formalina

tamponada neutra Z-fix al 2% (Anatech Ltd., Battle Creek, MI) durante 20 minutos y se lavaron en PBS. La recuperación de antígeno se logró con Target Retrieval Solution, pH 9 durante 20 minutos en un vaporizador de verduras de Black and Decker. La membrana se bloqueó con tampón de bloqueo con leche al 5% a temperatura ambiente y se incubó con el anticuerpo policlonal Met anti-humano de conejo C-28 en BSA al 5% a una dilución de 1:250 durante 1,5 horas a temperatura ambiente o a una dilución de 1:1.000 durante toda la noche. De manera alternativa, se utilizó una dilución de 1:1.000 durante toda la noche y el clon:3D4 anti-cMet de ratón de Zymed a una dilución de 1:500. Se utilizó IgG-HRP anti-conejo de burro (Amersham) a una dilución de 1:5.000 o se utilizó IgG anti-ratón de cabra AlexaFluor 680 (Molecular Probes) a una dilución de 1:10.000. Las bandas de proteínas se detectaron mediante un reactivo de quimioluminiscencia (Pierce) o mediante Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska). Las imágenes escaneadas en el Odyssey® Infrared Imaging System se escanearon utilizando el canal de 700 nm a una intensidad de 5,0. La intensidad de la señal de las bandas específicas de Met se midió utilizando el módulo de análisis de geles 1D en el software ImageQuant TL. Se sustrajo el fondo utilizando la herramienta "rolling ball".

15 *Análisis digital de imágenes de los sedimentos celulares teñidos mediante IHC:*

Se obtuvieron imágenes espectrales de los portaobjetos de los sedimentos celulares teñidos con Met4 utilizando un sistema de cámaras Nuance CRI (www.cri-inc.com). Se recogieron 6-10 imágenes de cada portaobjetos. La emisión se midió entre 420 nm y 720 nm en incrementos de 20 nm. Los cubos de imágenes resultantes se convirtieron en unidades de densidad óptica, y se separaron matemáticamente en sus componentes DAB y hematoxilina individuales utilizando espectros deducidos a partir de las muestras de control y se guardaron en una biblioteca de espectros. La tinción de DAB se pseudo-coloreó de rojo para aumentar el contraste. La hematoxilina se pseudo-coloreó de azul y las imágenes se convirtieron a un formato pseudo-fluorescente para la cuantificación.

A continuación se cuantificaron las imágenes separadas espectralmente con un software desarrollado por nuestro laboratorio que identifica la densidad óptica DAB media así como el número de píxeles por encima del fondo (como se determina utilizando el algoritmo de autoumbrales de Ridler y Calvard⁴⁴). El recuento de células se identificó contando los núcleos (según se identifica mediante contratinción de hematoxilina) utilizando el algoritmo de componentes conectados⁴⁵ en píxeles cuya densidad óptica de hematoxilina estaba por encima del fondo. Se determinó un recuento de los núcleos totales después de utilizar un filtro de umbral de paso alto automático. El umbral para la tinción de Met4 positiva se fijó utilizando un valor de filtro de umbral de intensidad de 171 unidades de intensidad. Este parámetro de umbral se definió utilizando las líneas celulares de control negativo (A2780, OVCAR10 y TOV-112D) y restringiendo el número de píxeles positivos al 0,1%. Esto es similar a las estadísticas PPA⁴⁶. A continuación se utilizaron estos recuentos para determinar el porcentaje de células Met4 positivas para cada sedimento de muestra.

Análisis estadístico

Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson utilizando el software Microsoft Excel®.

Ejemplo 2: Desarrollo de un anticuerpo monoclonal anti-c-Met para la cuantificación de c-Met en tejidos fijados en formalina.

Las limitaciones de C-28, un anticuerpo policlonal de Santa Cruz, que se ha utilizado para medir la expresión de Met en la mayoría de los estudios in vitro e inmunohistoquímicos, motivó el desarrollo, por parte de los inventores, de un anticuerpo monoclonal (AcMo) para la medición de la expresión de proteínas c-Met en los cánceres de pacientes para las aplicaciones clínicas, que incluye la obtención de imágenes moleculares y la inmunohistoquímica en tejidos fijados en formalina. Se diseñó el inmunógeno para obtener anticuerpos c-Met que reaccionan con el dominio extracelular del receptor Met, ya que esto proporciona la medición más directa para evaluar la abundancia de expresión de c-Met en la superficie celular. Los AcMos resultantes superan la variabilidad entre lotes de C-28 y la reactividad nuclear observada con anticuerpos que se unen al dominio citoplasmático de Met.

Como criba final para identificar los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al receptor Met en los tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE), las secciones de los tejidos prostáticos de archivo se tiñeron con sobrenadantes de hibridoma (Tabla 1).

Tabla 1: Proceso de selección para el aislamiento del hibridoma Met4:

	Hibridomas	Criterios de selección positiva	Criterios de selección negativa	Clones de hibridoma positivos para la siguiente criba
Fusión de esplenocitos	Medio bazo	Supervivencia en medio HAT		960
ELISA frente a Met25-567H	960	ELISA positivo frente a Met25-567H		34

	Hibridomas	Criterios de selección positiva	Criterios de selección negativa	Clones de hibridoma positivos para la siguiente criba
ELISA frente a Met928	34	ELISA positivo frente a Met25-567H y Met928		14
ELISA frente a Met-IgG	14	ELISA positivo frente a 3 proteínas: Met25-567H, Met928 y Met-IgG		7
Tinción de IF en células MKN45/NIH3T3 fijadas en formalina	7	Células MKN45	Células NIH3T3	5
IHC en sección de próstata	8 (tres de ellas de la fusión previa)	Células epiteliales basales Células endoteliales Células plasmáticas	Células secretoras Matriz extracelular Células estromales intensas	3/8 Met4 dieron la tinción específica más fuerte

En base al distinto patrón subcelular de la expresión del receptor Met en la próstata^{47,48}, se seleccionaron los anticuerpos monoclonales que reaccionan con las células epiteliales basales, las células epiteliales luminales atroficas⁴⁹ y las células endoteliales, y que delinean la membrana plasmática basolateral de las células epiteliales secretoras (Figura 1A y B). Se excluyeron los anticuerpos que se unían a las proteínas nucleares, a las proteínas citoplasmáticas de las células secretoras, o difusamente a las proteínas del estroma prostático. El anticuerpo que proporcionaba la señal más intensa y específica se denominó Met4. Met4 reacciona con el citoplasma de las células epiteliales basales y la membrana plasmática de las células epiteliales luminales (Figura 1A, inserto). Se validó Met4 adicionalmente mediante la tinción de co-cultivos de células MKN45 que reaccionan con Met y células NIH3T3 que no reaccionan con Met, que se fijaron en formalina al 10%. La tinción por inmunofluorescencia se observa específicamente a lo largo de la membrana de las células MKN45 y coincide con la inmunorreactividad a C-28 (Santa Cruz) (Figura 1C-F).

Ejemplo 3: Especificidad de Met4 para la reactividad con c-Met en células fijadas en formalina

Para confirmar la reactividad de Met4 con la proteína receptora Met, se sondó una transferencia de Western con Met4. Recapitulando las condiciones de los tejidos fijados en formalina, las membranas de transferencia de Western se trataron con formalina al 10% y se sometieron al mismo tipo de recuperación de antígeno que se había aplicado a las secciones de tejido. Met4 no reaccionó con la proteína receptora Met desnaturalizada en las células de cáncer de ovario IGROV1, que expresan una gran cantidad de c-Met. La fijación en formalina o la ebullición de la membrana en tampón de recuperación de antígeno aumentó la unión de Met4 a c-Met y puso de manifiesto una banda de c-Met de 140kDa (Figura 2). Met4 reaccionó de manera no específica con bandas de menor peso molecular, algunas de las cuales también aparecían en la línea celular A2780 negativa para el receptor Met. Los resultados de la inmunofluorescencia y de la transferencia de Western demuestran que Met4 se une a un epítipo específico en Met que es sensible a la desnaturalización y que se restablece mediante fijación en formalina o recuperación de antígeno.

Para validar adicionalmente la especificidad de Met4 en las preparaciones de células fijadas en formalina, se analizaron los paneles de líneas celulares. Las líneas celulares se seleccionaron en base a los niveles de expresión de Met. El primer panel consistió en 14 líneas celulares de cáncer de ovario. Estas líneas celulares expresan cantidades variables de proteína c-Met. A2780, OVCAR10 y TOV-112D no expresan ARN de Met o la proteína (Figura 3 y Figura 6) y las células IGROV1 y OVCAR5 expresan altamente Met. Para comparar las particularidades de Met4 y Met C-28 en las preparaciones fijadas en formalina con los correspondientes resultados de la transferencia de Western, se procesaron sedimentos celulares de cada línea celular exactamente de la misma manera que los tejidos humanos. Se tiñeron secciones paralelas de sedimentos celulares en portaobjetos con anticuerpo Met4 o Met C-28. Aunque Met C-28 reaccionó de manera indiscriminada con todas las líneas celulares, Met4 tiñó solamente las líneas que eran positivas para la expresión de Met en la transferencia de Western y en los análisis de PCR (Figura 3B). Para determinar si la reactividad de Met4 en los tejidos fijados en formalina era proporcional al nivel de expresión de la proteína c-Met, se compararon las mediciones digitales de la intensidad de tinción de las secciones teñidas mediante IHC con la cantidad de c-Met detectado en una transferencia de Western. Después de eliminar valores atípicos, se atribuyeron a aglutinamientos de Histogel en la preparación del sedimento celular, el coeficiente de correlación de Pearson entre la IHC y la WB fue $s = 0,602$ (Figura 3C).

Adicionalmente, la especificidad de Met4 se sometió a ensayo en una variedad de líneas celulares no ováricas, la mayoría de las cuales eran líneas celulares de glioblastoma (Figura 4) y los resultados confirmaron que Met4 reacciona con células humanas que expresaban c-Met, pero no con células de ratón positivas para c-Met o con células humanas negativas para c-Met.

Ejemplo 4: Reproducibilidad de las mediciones inmunohistoquímicas de Met4

Dado que los resultados demuestran que el novedoso anticuerpo Met4 se une específicamente a c-Met en preparaciones de células FFPE, se sometió a ensayo la reproducibilidad de la tinción en células TOV21D, que expresan niveles intermedios de c-Met. La reproducibilidad del ensayo es un factor crítico en el desarrollo de un anticuerpo para un ensayo clínico. Se analizó la coherencia de las intensidades de la tinción con Met4 en sedimentos celulares FFPE entre las tinciones repetidas en el mismo día (variabilidad intraensayo) y los portaobjetos teñidos en tres días diferentes (variabilidad interensayo). Además, se compararon los resultados de la tinción de dos lotes distintos de anticuerpo Met4. Los dos lotes de anticuerpo purificado que se prepararon por separado a partir de medio de cultivo de hibridoma pusieron de manifiesto un coeficiente de correlación de $s = 0,75$. Las variabilidades intraensayo e interensayo consisten en componentes de variabilidad (de ensayo) técnica y biológica, que no pueden separarse en este análisis. Se observaron diferencias morfológicas significativas entre las células TOV21D en los sedimentos celulares en diferentes días que influyeron en la intensidad de tinción con Met4. Por consiguiente, el %CV fue 39% de la variabilidad intraensayo. La variabilidad del ensayo de Met4 realizado en tres días distintos (variabilidad interensayo) fue %CV = 21%. La variabilidad interensayo se calculó a partir de las variabilidades diarias medias y menos que la variabilidad intraensayo.

Ejemplo 5: Expresión de Met en los cánceres de ovario y en los gliomas

Para evaluar la especificidad de Met4 en los tejidos FFPE de archivo, se analizaron secciones de tejidos de cáncer de ovario y un TMA de gliomas. Met4 poseía alta especificidad de tinción para las células cancerosas de ovario, las células endoteliales, una población de células en el estroma ovárico y las células plasmáticas. No se observó tinción nuclear (Figura 5). Los subtipos histológicos de los cánceres de ovario incluían el seroso, endometriode y de células claras, pero no cánceres mucinosos y todos los cánceres estaban en el estadio FIGO III-IV. Los 29 cánceres de ovario mostraron reactividad a Met4 (Tabla 2).

Tabla 2: Reactividad de Met4 en cánceres de ovario

Puntuación	Frecuencia (pts)	Porcentaje	Subtipo histológico		
			Seroso (%S)	Endometriode (%EM)	de células claras (%CC)
0					
1	9	30	3 (23%)	4 (36%)	2 (40%)
2	12	45	6 (46%)	5 (45%)	1 (25%)
3	7	25	4 (31%)	2 (18%)	1 (25%)

Las secciones de cáncer de ovario se tiñen con Met4. La puntuación global representa la intensidad de tinción media de la sección en una escala categórica de 0 a 3. (S - carcinoma papilar seroso, EM - carcinoma endometriode, CC - carcinoma de células claras).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la intensidad de tinción con Met4 en los subtipos de cáncer de ovario. Los cánceres de células claras, que se consideran el subtipo más agresivo, no demostraron una mayor reactividad que otros subtipos histológicos.

Para evaluar la especificidad de Met4 y la expresión de c-Met en tumores cerebrales, se tiñó una matriz de tejido de gliomas. La micromatriz de tejido presentó 18 gliomas en núcleos triplicados. Además, hubo tres casos de tejidos cerebrales normales (Tabla 3, Figura 5B).

Tabla 3: Reactividad a Met4 de los gliomas (54 núcleos)

Puntuación	Frecuencia (Núcleos)	Porcentaje (Núcleos)	Frecuencia (Pacientes)	Porcentaje (Pacientes)
0	21	34	5	37
1	22	35	7	36
2	13	21	3	16
3	6	10	3	11
Total	62	100	18	100

Se tiñó una micromatriz de tejido de 18 gliomas en núcleos triplicados con el anticuerpo Met4. Se evaluó la reactividad a Met4 multiplicando la intensidad de tinción relativa y el porcentaje de células positivas. La puntuación global se expresa en una escala categórica de 0 a 3.

Las neuronas y los astrocitos reactivos se tiñeron fuertemente con Met4, mientras que los oligodendrocitos no mostraron tinción con Met. Sorprendentemente, las células endoteliales variaron en la positividad a Met, incluyendo

las células endoteliales de la vasculatura tumoral. Cinco de los 18 los gliomas fueron negativos para Met y 3/18 se tiñeron fuertemente. Los tres eran gliomas de alto grado. En conjunto, el 70% de los gliomas expresó c-Met y los niveles de expresión de c-Met aumentaban con el grado del tumor.

5 Ejemplo 6: Materiales y métodos de mapeo del epítipo de Met4:

Se preparó Met4 en PBS a una concentración de 2,0 mg/ml. Se obtuvieron las bibliotecas de péptidos expresados en fagos Ph.D.-12 y Ph.D.-7 del kit de biblioteca de péptidos expresados en fagos de New England Biolabs. El cebador de secuenciación The-96 gIII, así como la cepa huésped *E. coli* ER2738 también se obtuvieron de este kit. Todas las otras soluciones se prepararon utilizando SIGMA Chemicals.

La Figura 8 muestra los métodos utilizados para mapear el epítipo de Met4. En primer lugar, una biblioteca de fagos, cada una expresando una secuencia de péptidos diferente, se expone a una placa recubierta con el anticuerpo Met4. La Figura 7 muestra la bioselección con la biblioteca de péptidos expresados en fagos. La expresión en fagos permite la existencia de una unión entre secuencias aleatorias de péptidos y el ADN que codifica estas secuencias. La bioselección es una técnica de selección en la que los péptidos expresados en fagos se exponen a una superficie recubierta con una molécula diana (enzima, anticuerpo, etc.)

La bioselección se realizó utilizando la Biblioteca de Expresión en Fagos M13 de acuerdo con el kit de biblioteca de péptidos de expresión en fagos de New England Biolabs. Diversas etapas incluyen recubrir una placa de Petri de 60x15 mm con 100 µg/ml de anticuerpo Met4 y exponer la placa a aproximadamente 1x10¹¹ ufp de la biblioteca de péptidos M13. El fago no unido se lavó con TBST, y el fago unido específicamente se eluyó con glicina HCl al 10% y BSA. Como se describe adicionalmente en mayor detalle más adelante, se amplifica el fago eluido; el proceso se repite para un total de 3 a 4 rondas; y, por último, se aislaron y secuenciaron los clones individuales positivos para el anticuerpo Met4.

Para la amplificación y la precipitación de fagos, se utilizó una dilución 1:100 de cultivo ER2738 para la infección y la amplificación. El fago se precipitó con polietilenglicol al 20%, NaCl 2,5 M. Los fagos específicos para el anticuerpo Met4 se tomaron a través de varios ciclos de unión/amplificación: la Tabla 4 muestra el número de fagos en ufp para la entrada inicial de la Biblioteca Ph.D.-12, así como la salida después de cada ronda de selección frente a Met4.

Tabla 4

Entrada de fago	Fago eluido de la 1ª ronda de selección	Fago eluido de la 2ª ronda de selección	Fago eluido de la 3ª ronda de selección
1x10 ¹¹ ufp	1,5 x 10 ⁴ ufp	6,0 x 10 ⁴ ufp	1,1 x 10 ⁸ ufp
% de recuperación	0,000015%	0,00006%	1,1%
Factor de enriquecimiento	1,00	4X	73333X

La titulación y la amplificación de los aislados finales del fago se realizaron para asegurar que cada clon del fago correspondía a una única secuencia de ADN.

El ELISA de las colonias M13 se realizó de acuerdo con los siguientes métodos: se expuso el anticuerpo Met4 a clones individuales de expresión de péptidos M13. Se utilizó como anticuerpo secundario una dilución 1:5.000 de anticuerpo anti- M13 conjugado con HRP en tampón de leche al 1%. El sustrato de peróxido utilizado se obtuvo del kit de sustrato Pierce TMB. Se leyó la placa a 450 nm utilizando el programa KC4 PC. La Figura 9 es un gráfico de barras que muestra los valores OD450nm del ELISA de los clones de fagos específicos para Met4 recuperados de la biblioteca 12 de expresión en fagos en comparación con el tipo silvestre M13.

Se aisló ADNmc de M13, como sigue: se seleccionaron los 8 clones del fago M13 con la lectura de absorbencia más alta del ELISA y se aislaron sus moléculas de ADNmc utilizando el protocolo QIAprep Spin M13 del manual QIAprep M13 de QIAGEN.

Los epítipos se caracterizaron mediante secuenciación de ADN de los clones de fagos ultra-específicos. La secuenciación de ADN se realizó como sigue: se combinaron 2,0 µl de ADN aislado de cada clon M13 con 1,0 µl del cebador de secuenciación 28 gIII en tubos para PCR. Las muestras se sometieron a PCR y se realizó la secuenciación. Los péptidos M13 específicos para Met4 (de la biblioteca de péptidos 12 de expresión en fagos) se compararon con la secuencia del dominio de unión a HGF/SF extracelular de Met humano utilizando el programa Sim. Las similitudes entre las secuencias de aminoácidos están en negrita en la Tabla 5.

Tabla 5:

DWDPSYRHRPPS
SPCVDWGPHRAC
TPPNSVDILPSR
AHGPFDLPELH
AWSDWSPSSRQT

SMWDFEPSSRPR
TIRPDWSPALRA
Proteína Met ²³³SYIDVLPEFRDSYP²⁴⁶

El epítipo de Met4:

El análisis de la secuencia de ADN se mapeó a un epítipo DVLPEFR en la proteína Met humana en los residuos de aminoácidos 236-242 (de la SEC ID N° 1, véase la Tabla 5) o, más concretamente, a un epítipo DVLP en la proteína Met humano en los residuos de aminoácidos 236-239 (de la SEC ID N° 1, véase la Tabla 5).

Ejemplo 7: el anticuerpo anti-Met de conejo RA4E se une al epítipo de Met4:

Un péptido SYIDVLPEFRDSYP a partir de los residuos de aminoácidos 233-246 de Met humana (péptido 1) y otro péptido NFLLDShpVSPEVI a partir de los aminoácidos 478-491 de Met (péptido 2) fueron sintetizados por Genemed Synthesis, Inc. Se conjugó el péptido 1 con la proteína KLH. Los polisúeros de conejo fueron generados por Pacific Immunology Corp frente a SYIDVLPEFRDSYPKLH. Se purificó el anticuerpo policlonal (denominado "RA4E") a través de una columna de afinidad conjugada con el péptido 1.

El anticuerpo anti-Met RA4E compite con Met4:

El anticuerpo anti-Met de conejo RA4E se caracterizó mediante ELISA de competición. En el ELISA competitivo, se recubrieron placas de 96 pocillos con la proteína Met₂₅₋₅₆₇ a 1 µg/ml. Se mezclaron Met4 y RA4E con el péptido 1 y el péptido 2 en dilución en serie y se incubaron las mezclas en la placa recubierta con Met durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, se añadió a la placa conjugado AP anti-ratón o anti-conejo a una dilución de 1:2.000. Después del desarrollo, se midieron los valores de densidad óptica mediante un lector de ELISA a 405 nm. El péptido 1 bloqueaba la unión de Met4 y RA4E a la proteína Met de una forma dependiente de la dosis (Figura 10A-C), mientras que el péptido 2 no tuvo ningún efecto sobre la unión.

Tinción por inmunofluorescencia de Met4 y RA4E en células MKN45 y NIH3T3:

Se caracterizó adicionalmente el anticuerpo anti-Met de conejo RA4E mediante tinción por inmunofluorescencia. Se co-cultivaron células MKN45 y NIH3T3 en portaobjetos de 8 cámaras durante toda la noche a 37°C. A continuación se lavaron las células con PBS y se fijaron con formalina al 10%. Las células fijadas se incubaron con Met4 y RA4E (8 µg/ml cada uno) a 4°C durante toda la noche. Se utilizó C28 (20 µg/ml) como control positivo. Se añadieron conjugados FITC anti-conejo y rojo de rodamina anti-ratón a las células después del lavado y se incubaron los portaobjetos a temperatura ambiente (TA) durante 1,5 horas. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Met4 y RA4E se encontraron co-localizados en las células MKN45 que expresaban Met, pero no en las células NIH3T3 negativas para Met (Figuras 11A-C). Dado que RA4E teñían las células MKN45 positivas para Met fijadas en formalina al 10% de manera similar a Met4, RA4E debe tener propiedades similares a Met4. Es decir, estos datos sugieren que RA4E, al igual que Met4, podría utilizarse para el diagnóstico clínico en secciones de tejido fijado en formalina e incluido en parafina (FFPE) mediante tinción inmunohistoquímica.

La descripción anterior se considera únicamente la de la(s) forma(s) de realización preferente(s). A los expertos en la materia y a los que realizan o utilizan la invención se les ocurrirán modificaciones de la invención. Por lo tanto, se entiende que la(s) forma(s) de realización que se muestra(n) en los dibujos y que se ha(n) descrito anteriormente es/son meramente para fines ilustrativos.

Referencias

1. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF: Met, metastasis, motility and more, Nat Rev Mol Cell Biol 2003, 4:915-925
2. Shu W, Guttentag S, Wang Z, Andl T, Ballard P, Lu MM, Piccolo S, Birchmeier W, Whitsett JA, Millar SE, Morrissey EE: Wnt/beta-catenin signaling acts upstream of N-myc, BMP4, and FGF signaling to regulate proximal-distal patterning in the lung, Dev Biol 2005, 283:226-239
3. Rosario M, Birchmeier W: How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase, Trends Cell Biol 2003, 13:328-335
4. Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF: Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins, Oncogene 2000, 19:5582-5589.
5. Shinomiya N, Gao CF, Xie Q, Gustafson M, Waters DJ, Zhang YW, Vande Woude GF: RNA interference reveals that ligand-independent met activity is required for tumor cell signaling and survival, Cancer Res 2004, 64:7962-7970
6. Lutterbach B, Zeng Q, Davis LJ, Hatch H, Hang G, Kohl NE, Gibbs JB, Pan BS: Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival, Cancer Res 2007, 67:2081-2088
7. Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, Tretiakova MS, Nallasura V, Fox EA, Hansen M, Schaefer E, Naoki K, Lader A, Richards W, Sugarbaker D, Husain AN, Christensen JG, Salgia R: Functional expression

and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer, *Cancer Res* 2005, 65:1479-1488

8. Peschard P, Fournier TM, Lamorte L, Naujokas MA, Band H, Langdon WY, Park M: Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein, *Mol Cell* 2001, 8: 995-1004

9. Ma PC, Maulik G, Christensen J, Salgia R: c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition, *Cancer Metastasis Rev* 2003, 22:309-325

10. Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, Scherer SW, Zhuang Z, Lubensky I, Dean M, Allikmets R, Chidambaram A, Bergerheim UR, Feltis JT, Casadevall C, Zamarron A, Bernues M, Richard S, Lips CJ, Walther MM, Tsui LC, Geil L, Orcutt ML, Stackhouse T, Lipan J, Slife L, Brauch H, Decker J, Niehans G, Hughson MD, Moch H, Storkel S, Lerman MI, Linehan WM, Zbar B: Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas, *Nat Genet* 1997, 16:68-73

11. Jeffers M, Schmidt L, Nakaigawa N, Webb CP, Weirich G, Kishida T, Zbar B, Vande Woude GF: Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94:11445-11450

12. Di Renzo MF, Olivero M, Giacomini A, Porte H, Chastre E, Mirossay L, Nordlinger B, Bretti S, Bottardi S, Giordano S, et al.: Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer, *Clin Cancer Res* 1995, 1:147-154

13. Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Ito H, Tahara E: Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer, *Biochem Biophys Res Commun* 1992, 189:227-232

14. Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino G, Bardelli A, Ponzetto C, Narsimhan RP, Hartmann G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, et al.: Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor, *Embo J* 1991, 10:2867-2878

15. Rosen EM, Knesel J, Goldberg ID: Scatter factor and its relationship to hepatocyte growth factor and met, *Cell Growth Differ* 1991, 2:603-607

16. Zhuang Z, Park WS, Pack S, Schmidt L, Vortmeyer AO, Pak E, Pham T, Weil RJ, Candidus S, Lubensky IA, Linehan WM, Zbar B, Weirich G: Trisomy 7-harboring non-random duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas, *Nat Genet* 1998, 20:66-69

17. Kang JY, Dolled-Filhart M, Ocal IT, Singh B, Lin CY, Dickson RB, Rimm DL, Camp RL: Tissue microarray analysis of hepatocyte growth factor/Met pathway components reveals a role for Met, matriptase, and hepatocyte growth factor activator inhibitor 1 in the progression of node-negative breast cancer, *Cancer Res* 2003, 63:1101-1105

18. Tsarfaty I, Alvord WG, Resau JH, Altstock RT, Lidereau R, Bieche I, Bertrand F, Horev J, Klabansky RL, Keydar I, Vande Woude GF: Alteration of Met protooncogene product expression and prognosis in breast carcinomas, *Anal Quant Cytol Histol* 1999, 21:397-408

19. Huang TJ, Wang JY, Lin SR, Lian ST, Hsieh JS: Overexpression of the c-met protooncogene in human gastric carcinoma--correlation to clinical features, *Acta Oncol* 2001, 40:638-643

20. Lo Muzio L, Farina A, Rubini C, Coccia E, Capogreco M, Colella G, Leonardi R, Campisi G, Carinci F: Effect of c-Met expression on survival in head and neck squamous cell carcinoma, *Tumour Biol* 2006, 27:115-121

21. Baykal C, Ayhan A, A1 A, Yuce K, Ayhan A: Overexpression of the c-Met/HGF receptor and its prognostic significance in uterine cervix carcinomas, *Gynecol Oncol* 2003, 88:123-129

22. Kaposi-Novak P, Lee JS, Gomez-Quiroz L, Coulouam C, Factor VM, Thorgerisson SS: Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype, *J Clin Invest* 2006, 116:1582-1595

23. Tolgay Ocal I, Dolled-Filhart M, D'Aquila TG, Camp RL, Rimm DL: Tissue microarray-based studies of patients with lymph node negative breast carcinoma show that met expression is associated with worse outcome but is not correlated with epidermal growth factor family receptors, *Cancer* 2003, 97:1841-1848

24. Lengyel E, Prechtel D, Resau JH, Gauger K, Welk A, Lindemann K, Salanti G, Richter T, Knudsen B, Vande Woude GF, Harbeck N: C-Met overexpression in node-positive breast cancer identifies patients with poor clinical outcome independent of Her2/neu, *Int J Cancer* 2005, 113:678-682

25. Gotte M, Kersting C, Radke I, Kiesel L, Wulfig P: An expression signature of syndecan-1 (CD138), E-cadherin and c-met is associated with factors of angiogenesis and lymphangiogenesis in ductal breast carcinoma in situ, *Breast Cancer Res* 2007, 9:R8

26. Pozner-Moulis S, Cregger M, Camp RL, Rimm DL: Antibody validation by quantitative analysis of protein expression using expression of Met in breast cancer as a model, *Lab Invest* 2007, 87:251-260

27. Ide T, Kitajima Y, Miyoshi A, Ohtsuka T, Mitsuno M, Ohtaka K, Miyazaki K: The Hypoxic Environment in Tumor- Stromal Cells Accelerates Pancreatic Cancer Progression via the Activation of Paracrine Hepatocyte Growth Factor/ c-Met Signaling, *Ann Surg Oncol* 2007,

28. Rong S, Segal S, Anver M, Resau JH, Vande Woude GF: Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91:4731-4735

29. Jeffers M, Fiscella M, Webb CP, Anver M, Koochekpour S, Vande Woude GF: The mutationally activated Met receptor mediates motility and metastasis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:14417-14422

30. Smolen GA, Sordella R, Muir B, Mohapatra G, Barmettler A, Archibald H, Kim WJ, Okimoto RA, Bell DW,

Sgroi DC, Christensen JG, Settleman J, Haber DA: Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103:2316-2321

31. Welm AL, Kim S, Welm BE, Bishop JM: MET and MYC cooperate in mammary tumorigenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102:4324-4329

32. Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD, Johnson BE, Salgia R: c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions, *Cancer Res* 2003, 63:6272-6281

33. Di Renzo MF, Olivero M, Martone T, Maffe A, Maggiora P, Stefani AD, Valente G, Giordano S, Cortesina G, Comoglio PM: Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas, *Oncogene* 2000, 19:1547-1555

34. Lee JH, Han SU, Cho H, Jennings B, Gerrard B, Dean M, Schmidt L, Zbar B, Vande Woude GF: A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer, *Oncogene* 2000, 19:4947-4953

35. Puri N, Ahmed S, Janamanchi V, Tretiakova M, Zumba O, Krausz T, Jagadeeswaran R, Salgia R: c-Met is a potentially new therapeutic target for treatment of human melanoma, *Clin Cancer Res* 2007, 13:2246-2253

36. Zhang YW, Su Y, Volpert OV, Vande Woude GF: Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:12718-12723

37. Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL, Polverini P, Rosen EM: Scatterfactor induces blood vessel formation in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90:1937-1941

38. Zou HY, Li Q, Lee JH, Arango ME, McDonnell SR, Yamazaki S, Koudriakova TB, Alton G, Cui JJ, Kung PP, Nambu MD, Los G, Bender SL, Mroczkowski B, Christensen JG: An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms, *Cancer Res* 2007, 67:4408-4417

39. Martens T, Schmidt NO, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R, Westphal M, Lamszus K: A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo, *Clin Cancer Res* 2006, 12:6144-6152

40. Puri N, Khrantsov A, Ahmed S, Nallasura V, Hetzel JT, Jagadeeswaran R, Karczmar G, Salgia R: A selective small molecule inhibitor of c-Met, PHA665752, inhibits tumorigenicity and angiogenesis in mouse lung cancer xenografts, *Cancer Res* 2007, 67:3529-3534

41. Gherardi E, Youles ME, Miguel RN, Blundell TL, Iamelle L, Gough J, Bandyopadhyay A, Hartmann G, Butler PJ: 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 U S A* 2003, 100:12039-12044

42. Chen D, Adenekan B, Chen L, Vaughan ED, Gerald W, Feng Z, Knudsen BS: Syndecan-1 expression in locally invasive and metastatic prostate cancer, *Urology* 2004, 63:402-407

43. Gmyrek GA, Walburg M, Webb CP, Yu H-M, You X, Vaughan ED, Vande Woude GF, Knudsen BS: Normal and Malignant Prostate Epithelial Cells Differ in Their Response to Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor, *Am J Pathol* 2001, 159:579-590

44. Ridler T, Calvard S: Picture thresholding using an iterative selection method., *IEEE Trans on Systems Man and Cybernetics* 1978, SMC 8:630-632 45. Russ JC: The image processing handbook. Edited by Boca Raton, Fla., CRC Press, 2002, 732 p. p

46. Altstock RT, Stein GY, Resau JH, Tsarfaty I: Algorithms for quantitation of protein expression variation in normal versus tumor tissue as a prognostic factor in cancer: Met oncogene expression, and breast cancer as a model, *Cytometry* 2000, 41:155-165

47. Knudsen BS, Gmyrek GA, Inra J, Scherr DS, Vaughan ED, Nanus DM, Kattan MW, Gerald WL, Vande Woude GF: High expression of the Met receptor in prostate cancer metastasis to bone, *Urology* 2002, 60:1113-1117

48. Humphrey PA, Zhu X, Zamegar R, Swanson PE, Ratliff TL, Vollmer RT, Day ML: Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma, *Am J Pathol* 1995, 147:386-396

49. van Leenders G, van Balken B, Aalders T, Hulsbergen-van de Kaa C, Ruiter D, Schalken J: Intermediate cells in normal and malignant prostate epithelium express c-MET: implications for prostate cancer invasion, *Prostate* 2002, 51:98-107

50. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR: Antigen retrieval techniques: current perspectives, *J Histochem Cytochem* 2001, 49:931-937

51. Pozner-Moulis S, Pappas DJ, Rimm DL: Met, the hepatocyte growth factor receptor, localizes to the nucleus in cells at low density, *Cancer Res* 2006, 66:7976-7982

52. Fischer U, Muller HW, Sattler HP, Feiden K, Zang KD, Meese E: Amplification of the MET gene in glioma, *Genes Chromosomes Cancer* 1995, 12:63-65

53. Moon YW, Weil RJ, Pack SD, Park WS, Pak E, Pham T, Karkera JD, Kim HK, Vortmeyer AO, Fuller BG, Zhuang Z: Missense mutation of the MET gene detected in human glioma, *Mod Pathol* 2000, 13:973-977

54. Sawada K, Radjabi AR, Shinomiya N, Kistner E, Kenny H, Becker AR, Turkyilmaz MA, Salgia R, Yamada SD, Vande Woude GF, Tretiakova MS, Lengyel E: c-Met overexpression is a prognostic factor in ovarian cancer and an effective target for inhibition of peritoneal dissemination and invasion, *Cancer Res* 2007, 67:1670-1679

Listado de secuencias

<110> Van Andel Research Institute Cao, Boliang

5 <120> Anticuerpo monoclonal que se une Met en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina, y métodos relacionados

<130> VAN67 FP335WO

10 <150> US11/845023
<151> 2007-08-24

<160> 1

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1390

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

25

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
 165 170 175
 Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
 180 185 190
 Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
 195 200 205
 His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
 210 215 220
 Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
 225 230 235 240
 Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
 245 250 255
 Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
 260 265 270
 Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
 275 280 285
 His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
 290 295 300
 Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
 305 310 315 320
 Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
 325 330 335
 Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
 340 345 350
 Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
 355 360 365
 Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
 370 375 380
 Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
 385 390 395 400
 Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
 405 410 415

Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
 420 425 430
 Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly
 435 440 445
 Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
 450 455 460
 Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
 465 470 475 480
 Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu
 485 490 495
 Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
 500 505 510
 Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
 515 520 525
 Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
 530 535 540
 Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
 545 550 555 560
 Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu
 565 570 575
 Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg
 580 585 590
 Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu
 595 600 605
 Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys
 610 615 620
 Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile
 625 630 635 640
 Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
 645 650 655
 Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly

660					665					670					
Thr	Leu	Leu	Thr	Leu	Thr	Gly	Asn	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Asn	Ser	Arg
		675					680					685			
His	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Lys	Thr	Cys	Thr	Leu	Lys	Ser	Val	Ser	Asn
	690					695					700				
Ser	Ile	Leu	Glu	Cys	Tyr	Thr	Pro	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Thr	Glu	Phe
705					710					715					720
Ala	Val	Lys	Leu	Lys	Ile	Asp	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Thr	Ser	Ile	Phe
				725					730					735	
Ser	Tyr	Arg	Glu	Asp	Pro	Ile	Val	Tyr	Glu	Ile	His	Pro	Thr	Lys	Ser
			740					745					750		
Phe	Ile	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile	Thr	Gly	Val	Gly	Lys	Asn	Leu	Asn
		755					760					765			
Ser	Val	Ser	Val	Pro	Arg	Met	Val	Ile	Asn	Val	His	Glu	Ala	Gly	Arg
	770					775					780				
Asn	Phe	Thr	Val	Ala	Cys	Gln	His	Arg	Ser	Asn	Ser	Glu	Ile	Ile	Cys
785					790					795					800
Cys	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Gln	Gln	Leu	Asn	Leu	Gln	Leu	Pro	Leu	Lys
				805					810					815	
Thr	Lys	Ala	Phe	Phe	Met	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu	Ser	Lys	Tyr	Phe	Asp
			820					825					830		
Leu	Ile	Tyr	Val	His	Asn	Pro	Val	Phe	Lys	Pro	Phe	Glu	Lys	Pro	Val
		835					840					845			
Met	Ile	Ser	Met	Gly	Asn	Glu	Asn	Val	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Asn	Asp
	850					855					860				
Ile	Asp	Pro	Glu	Ala	Val	Lys	Gly	Glu	Val	Leu	Lys	Val	Gly	Asn	Lys
865					870					875					880
Ser	Cys	Glu	Asn	Ile	His	Leu	His	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Cys	Thr	Val
				885					890					895	
Pro	Asn	Asp	Leu	Leu	Lys	Leu	Asn	Ser	Glu	Leu	Asn	Ile	Glu	Trp	Lys
			900					905					910		

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr	Met	Lys	His	Gly	Asp	Leu	Arg	Asn	Phe	Ile	Arg	Asn	Glu	Thr
	1160					1165					1170			
His	Asn	Pro	Thr	Val	Lys	Asp	Leu	Ile	Gly	Phe	Gly	Leu	Gln	Val
	1175					1180					1185			
Ala	Lys	Gly	Met	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ser	Lys	Lys	Phe	Val	His	Arg
	1190					1195					1200			
Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	Met	Leu	Asp	Glu	Lys	Phe	Thr	Val
	1205					1210					1215			
Lys	Val	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Asp	Met	Tyr	Asp	Lys	Glu
	1220					1225					1230			
Tyr	Tyr	Ser	Val	His	Asn	Lys	Thr	Gly	Ala	Lys	Leu	Pro	Val	Lys
	1235					1240					1245			
Trp	Met	Ala	Leu	Glu	Ser	Leu	Gln	Thr	Gln	Lys	Phe	Thr	Thr	Lys
	1250					1255					1260			
Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Leu	Leu	Trp	Glu	Leu	Met	Thr
	1265					1270					1275			
Arg	Gly	Ala	Pro	Pro	Tyr	Pro	Asp	Val	Asn	Thr	Phe	Asp	Ile	Thr
	1280					1285					1290			
Val	Tyr	Leu	Leu	Gln	Gly	Arg	Arg	Leu	Leu	Gln	Pro	Glu	Tyr	Cys
	1295					1300					1305			
Pro	Asp	Pro	Leu	Tyr	Glu	Val	Met	Leu	Lys	Cys	Trp	His	Pro	Lys
	1310					1315					1320			
Ala	Glu	Met	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Glu	Leu	Val	Ser	Arg	Ile	Ser
	1325					1330					1335			
Ala	Ile	Phe	Ser	Thr	Phe	Ile	Gly	Glu	His	Tyr	Val	His	Val	Asn
	1340					1345					1350			
Ala	Thr	Tyr	Val	Asn	Val	Lys	Cys	Val	Ala	Pro	Tyr	Pro	Ser	Leu
	1355					1360					1365			
Leu	Ser	Ser	Glu	Asp	Asn	Ala	Asp	Asp	Glu	Val	Asp	Thr	Arg	Pro
	1370					1375					1380			
Ala	Ser	Phe	Trp	Glu	Thr	Ser								
	1385					1390								

REIVINDIACACIONES

1. Anticuerpo monoclonal anti-Met producido por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection bajo el número de registro PTA-7680, o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo.
2. Anticuerpo anti-Met, o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, que se une al mismo epítipo que el epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection bajo el número de registro PTA-7680, en el que el epítipo está dentro del polipéptido DVLPEFR en los residuos de aminoácidos 236-242 de la proteína Met humana dentro de la secuencia SEC ID N°: 1, o el epítipo está dentro del polipéptido DVLP en los residuos de aminoácidos 236-239 de la SEC ID N°: 1.
3. Anticuerpo anti-Met que se une a un polipéptido que consiste en los aminoácidos identificados en la SEC ID N° 1 como 236-239, o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo.
4. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo se liga a un resto detectable.
5. Composición que comprende el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión al antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y opcionalmente un portador.
6. Kit, que comprende:
 - (a) un primer recipiente que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,
 - (b) un segundo recipiente que comprende un portador, y
 - (c) las instrucciones para utilizar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para detectar Met, diagnosticar, pronosticar, o evaluar un agente inhibidor de Met; y, opcionalmente, uno o más de
 - (d) un segundo anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo; segundo anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une al anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo del primer recipiente, o
 - (e) un agente inhibidor de Met.
7. Método para detectar la presencia de Met en una muestra biológica, muestra de la que se sospecha que expresa Met, que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar una muestra de la que se sospecha que expresa Met obtenida de un paciente,
 - (b) proporcionar la composición de la reivindicación 5
 - (c) poner en contacto la muestra con la composición de la reivindicación 5, y
 - (d) detectar la presencia de Met en la muestra.
8. Método para diagnosticar o pronosticar una enfermedad relacionada con Met en un paciente que tiene o del que se sospecha que tiene una enfermedad relacionada con Met, que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar la composición de la reivindicación 5,
 - (b) poner en contacto un tejido o una muestra biológica obtenida de dicho paciente con la composición de la reivindicación 5,
 - (c) determinar el nivel de expresión de Met en el tejido o en la muestra, y
 - (d) comparar el nivel de expresión con un control adecuado.
9. Método de la reivindicación 8 en el que la enfermedad relacionada con Met es el cáncer, tal como el cáncer de ovario.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en el que el tejido o la muestra biológica se ha fijado en una solución de formaldehído.
11. Método para determinar la eficacia de un agente inhibidor de Met, que comprende las etapas:
 - (a) proporcionar un primer tejido o muestra biológica obtenida de un paciente que tiene un cáncer relacionado con Met antes del tratamiento con el agente inhibidor de Met;
 - (b) proporcionar la composición de la reivindicación 5;
 - (c) poner en contacto el primer tejido o muestra biológica y un tejido o muestra post-tratamiento, obtenida después de tratar al paciente con un agente inhibidor de Met, con la composición de la reivindicación 5;
 - (d) determinar el nivel de expresión de Met en cada uno del primer tejido o muestra biológica y el tejido o muestra post-tratamiento; y

(e) comparar el nivel de expresión de Met del primer tejido o muestra biológica con el nivel de expresión de Met del tejido o muestra post-tratamiento para determinar la eficacia de dicho agente inhibidor de Met, en el que opcionalmente cada uno del primer tejido o muestra biológica y el tejido o muestra post-tratamiento se ha fijado en una solución de formaldehído.

- 5
12. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de la reivindicación 5 para su uso en un método de diagnóstico llevado a cabo en el cuerpo humano o de un animal.
- 10
13. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de la reivindicación 5 para su uso en un método de diagnóstico de un trastorno relacionado con Met.
14. Línea celular de hibridoma depositada en la American Type Culture Collection bajo el número de registro PTA-7680.

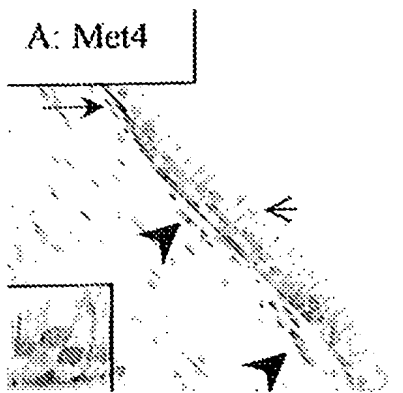


FIG. 1A

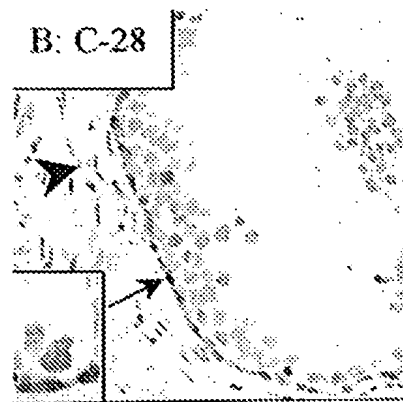


FIG. 1B

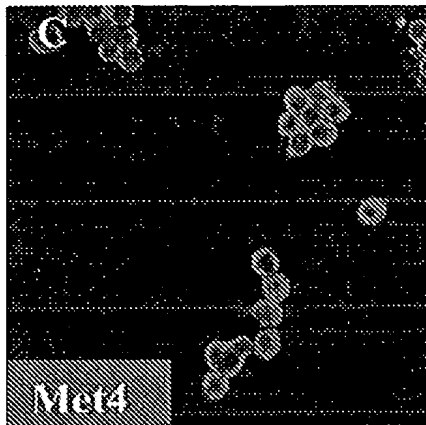


FIG. 1C

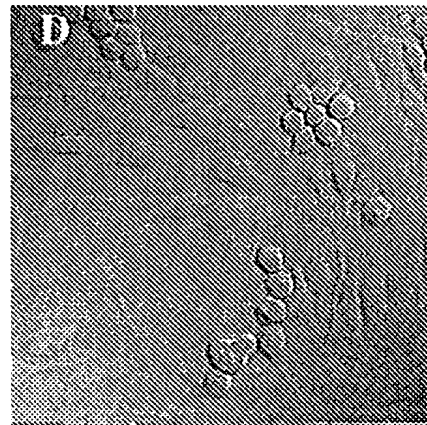


FIG. 1D

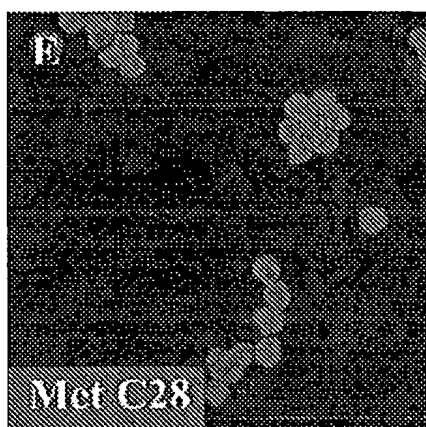


FIG. 1E

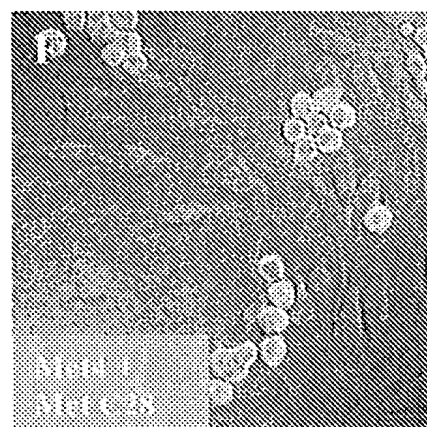
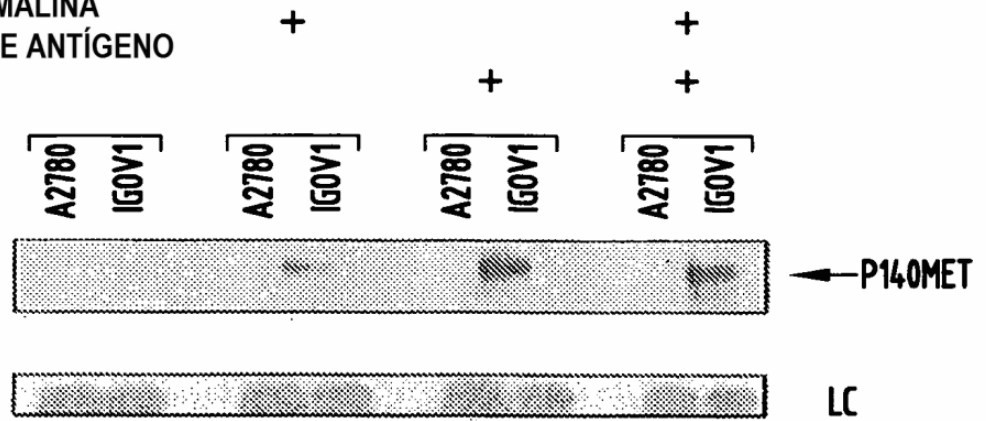


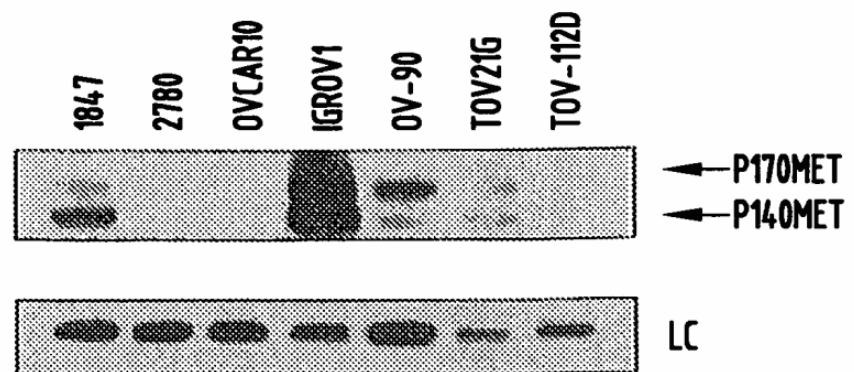
FIG. 1F

FIJACIÓN EN FORMALINA
RECUPERACIÓN DE ANTÍGENO



TW : MET 4

FIG. 2



TW : MET C-28

FIG. 3A

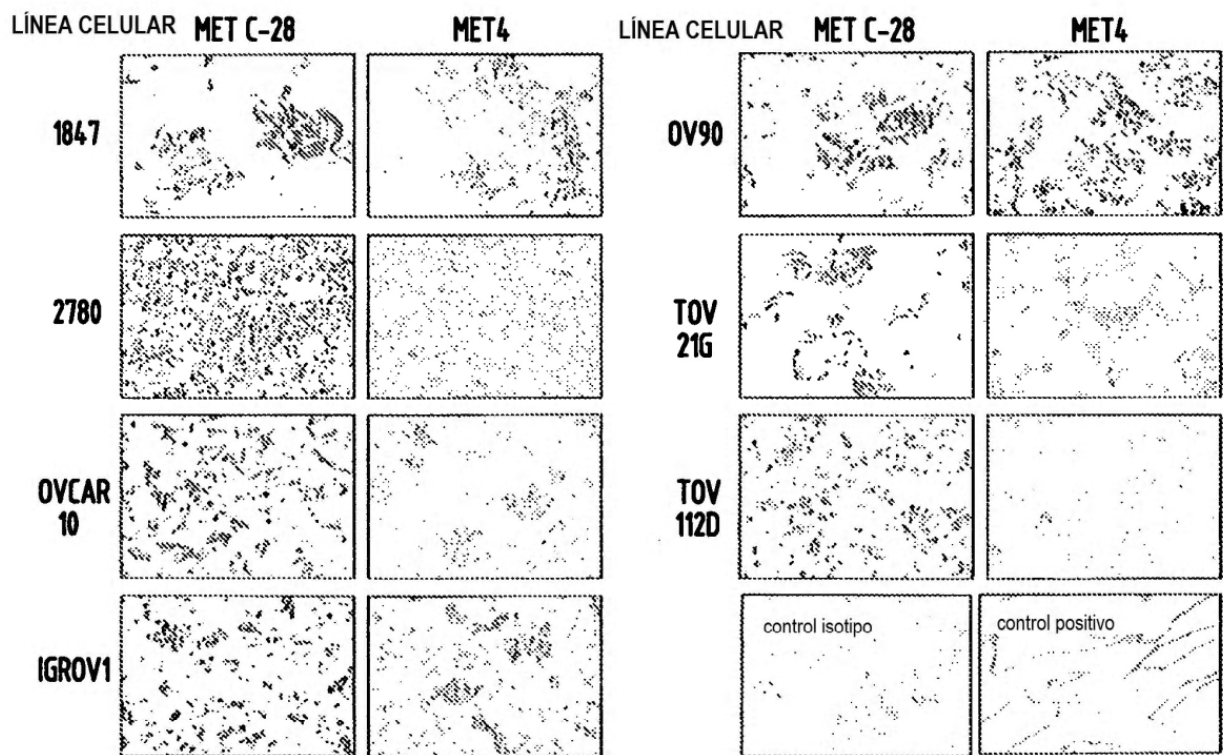


FIG. 3B

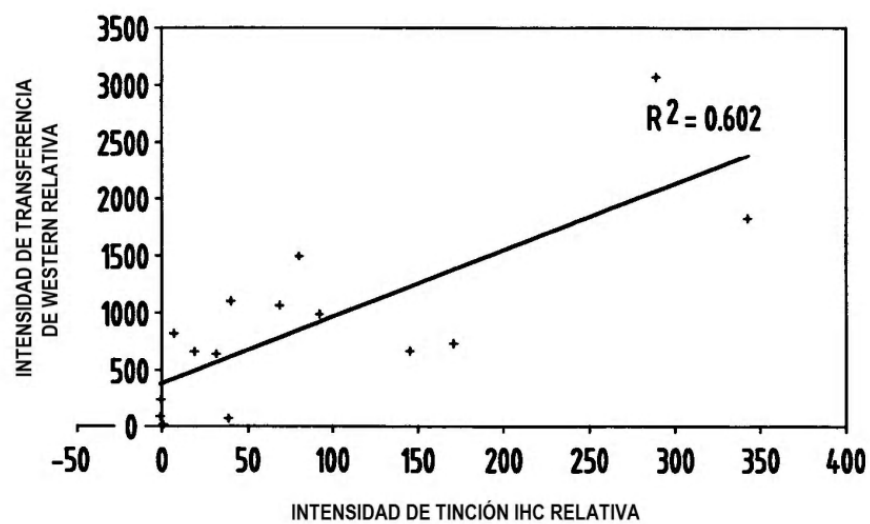


FIG. 3C

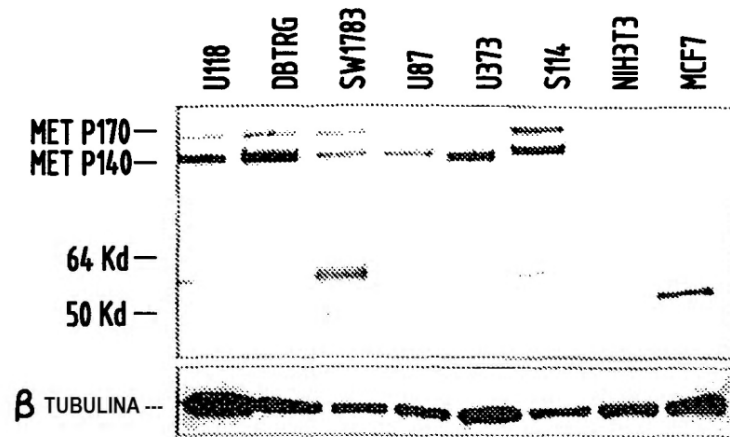


FIG. 4A

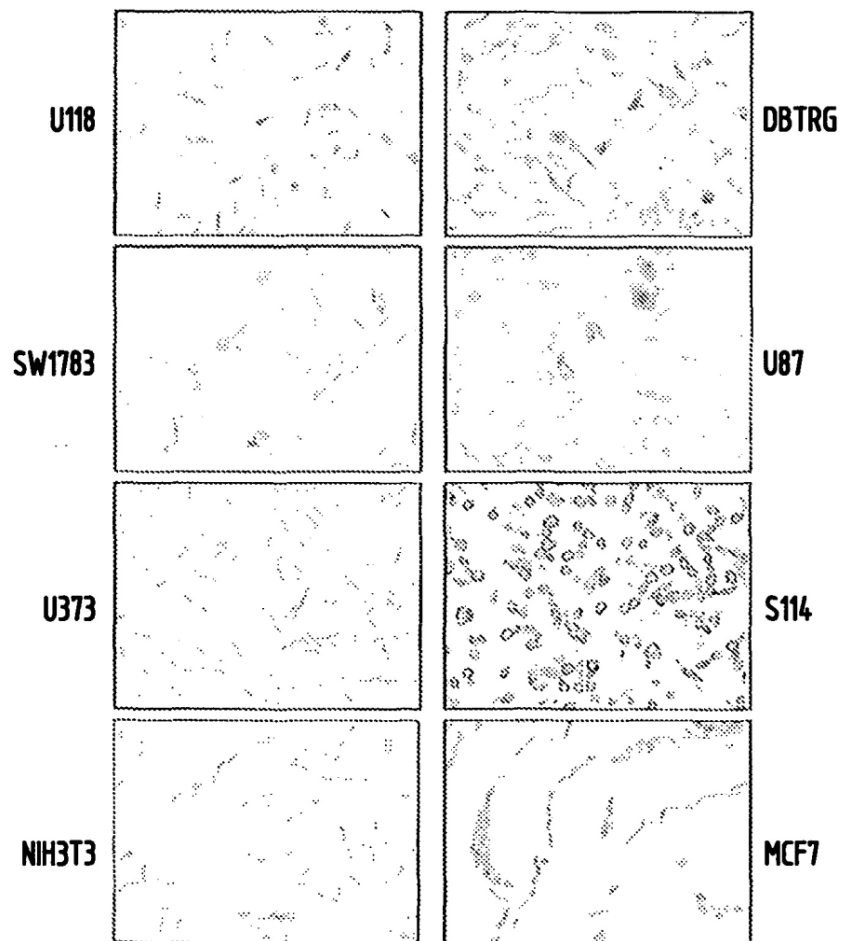


FIG. 4B

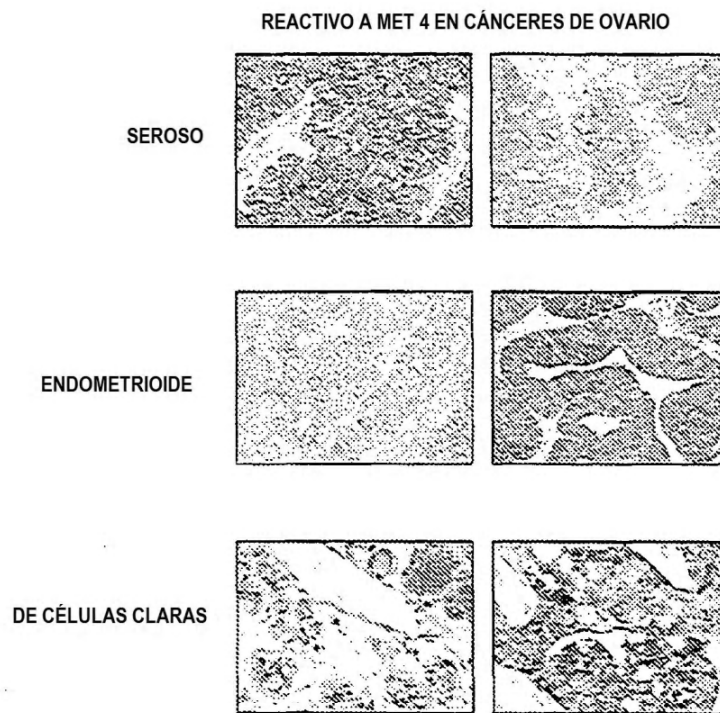


FIG. 5A

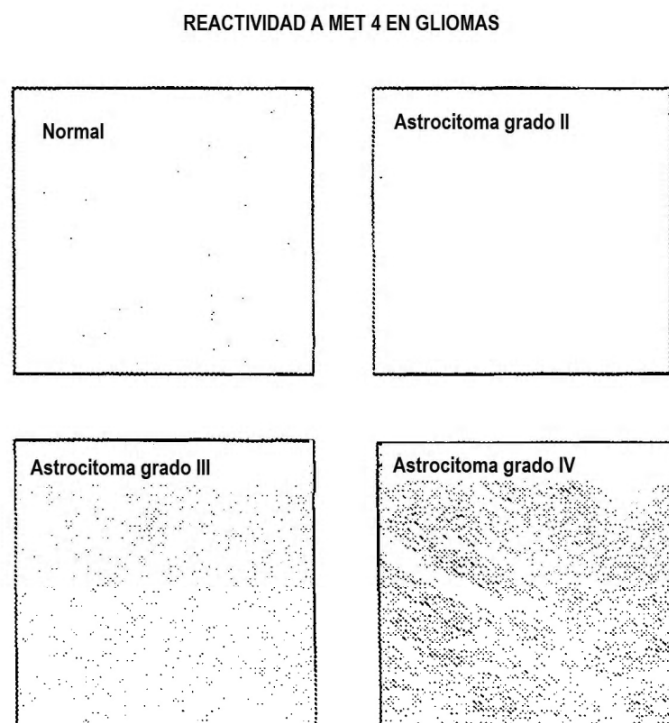


FIG. 5B

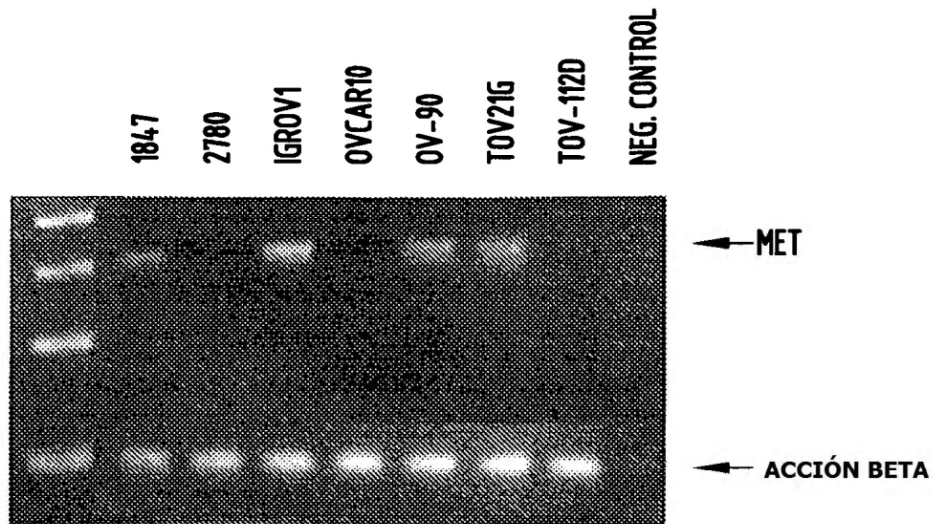


FIG. 6

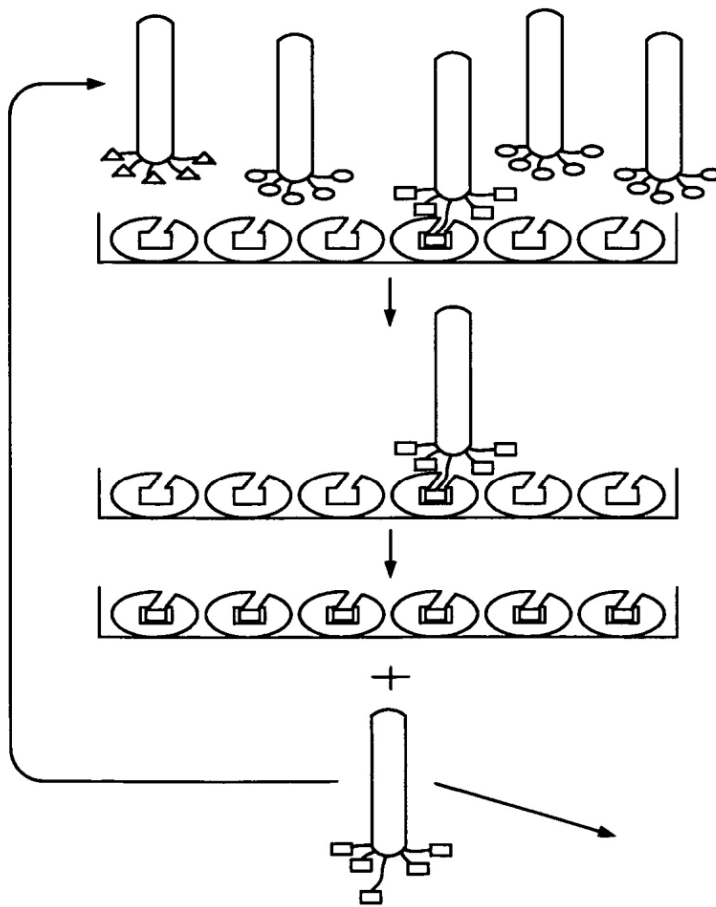


FIG. 7

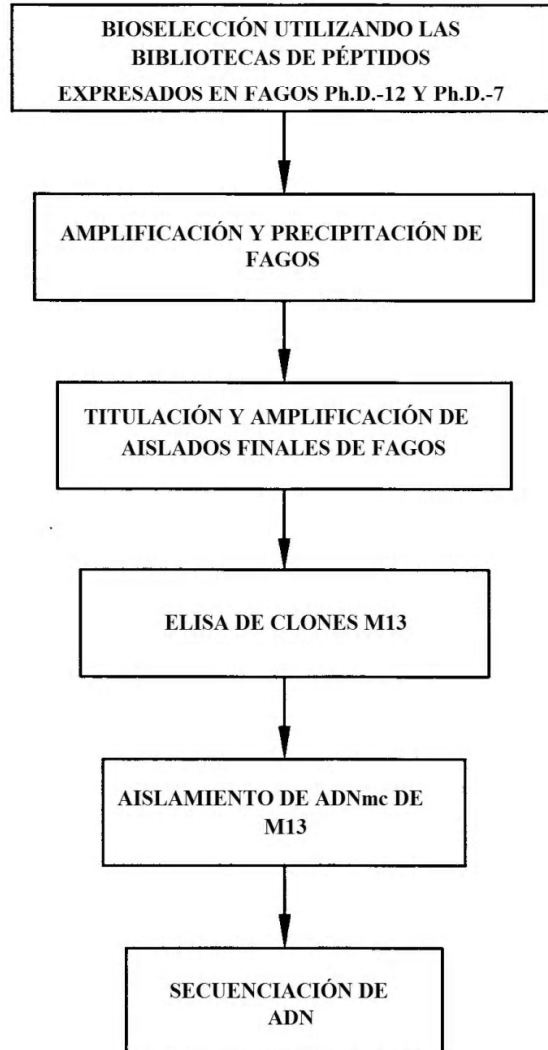


FIG. 8

RESULTADOS DE ELISA DE CLONES DE FAGOS ESPECÍFICOS PARA MET4

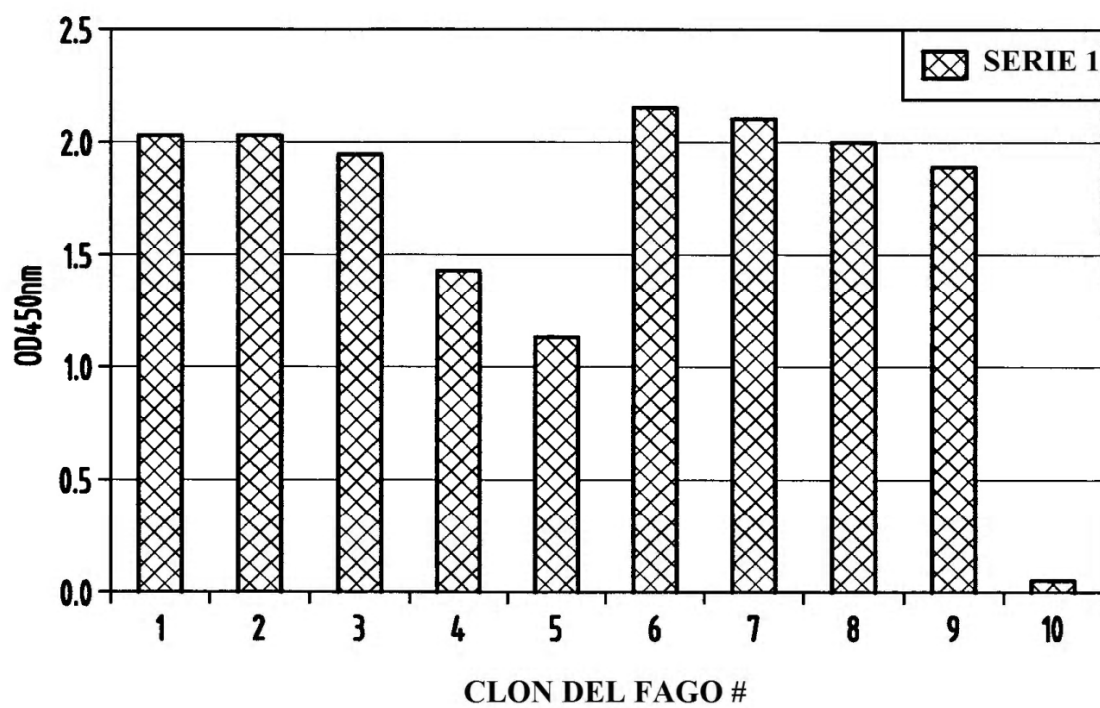


FIG. 9

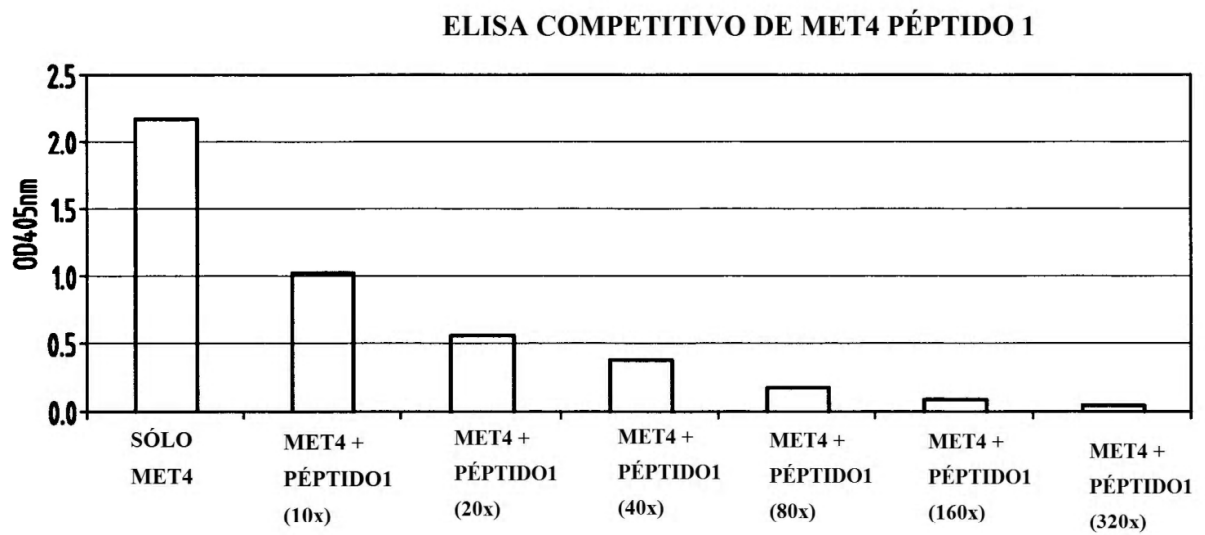


FIG. 10A

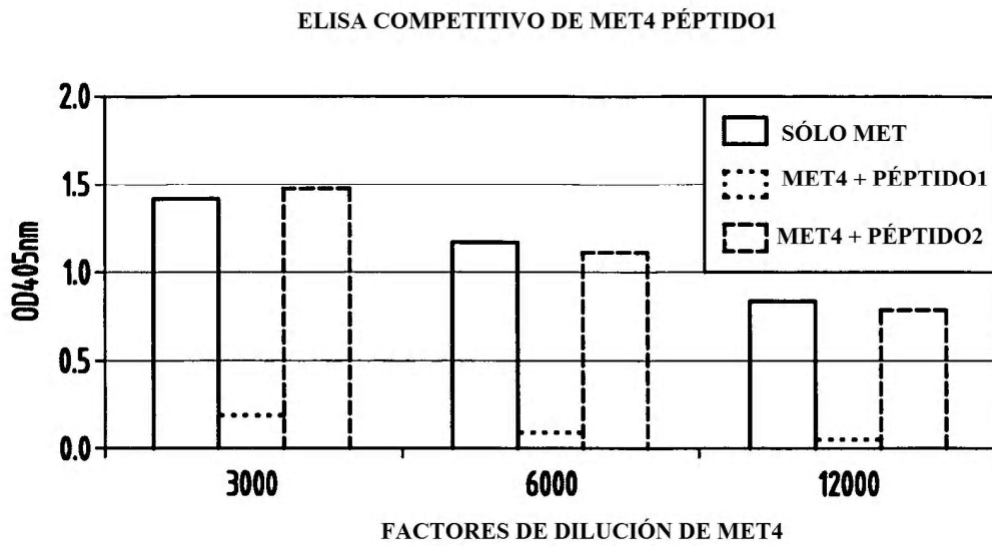


FIG. 10B

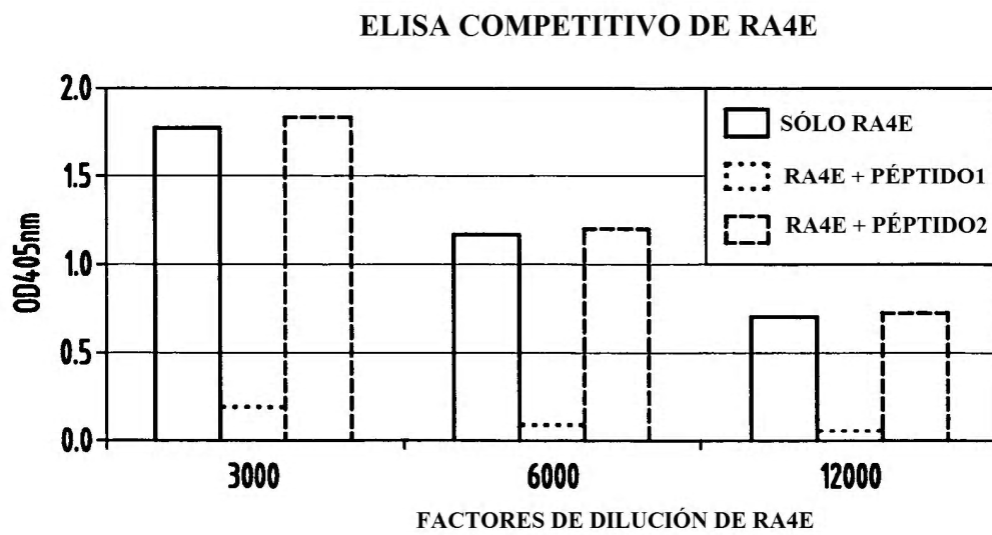


FIG. 10C

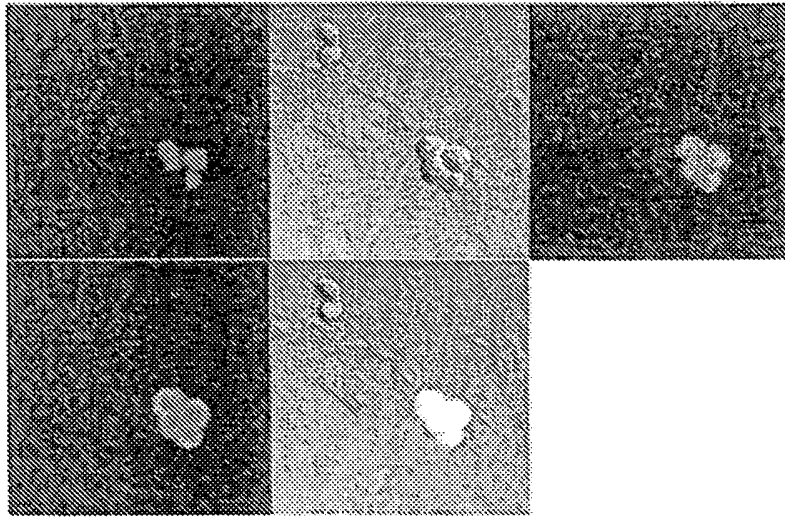


FIG. 11A

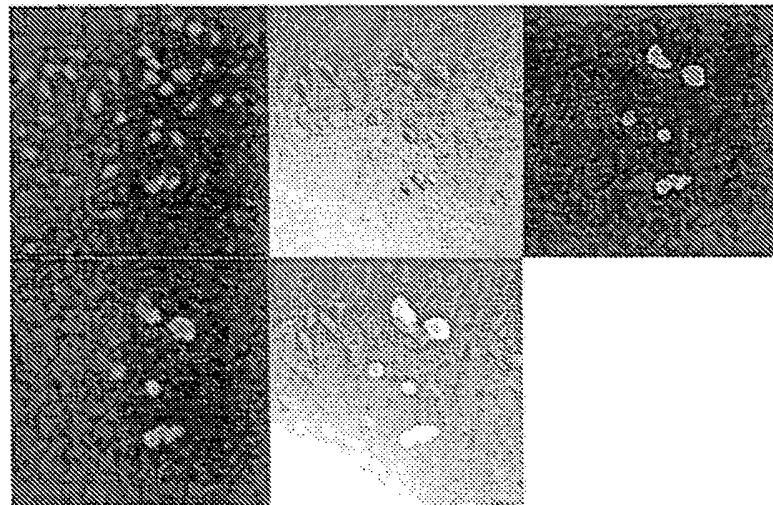


FIG. 11B

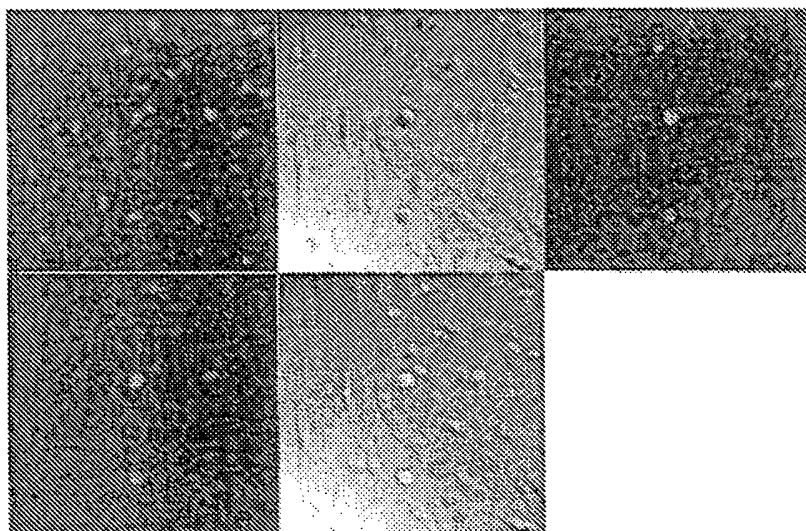


FIG. 11C