



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 102012006063-9 B1

(22) Data do Depósito: 16/03/2012

(45) Data de Concessão: 07/03/2023

(54) Título: INIBIDOR DE MET PARA USO EM AUMENTAR A EFICIÊNCIA DE RADIOTERAPIA E SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO

(51) Int.Cl.: C07K 16/30; C07K 16/40; A61K 39/395; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 18/03/2011 EP 11158861.2.

(73) Titular(es): VERTICAL BIO AG.

(72) Inventor(es): CARLA BOCCACCIO; FIORELLA PETRONZELLI; RITA DE SANTIS; PAOLO MARIA COMOGLIO.

(57) Resumo: INIBIDOR DE MET PARA USO NO TRATAMENTO DE UM PACIENTE SOFRENDO DE UM TUMOR, E, SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO. É fornecido o inibidor de Met, e/ou sequência de nucleotídeos que codifica um inibidor de Met, para uso no tratamento de pacientes que sofrem de um câncer para reduzir e/ou revogar a resistência do paciente à radioterapia, em que o inibidor de Met é selecionado entre: i) um anticorpo monoclonal anti-Met, ii) um anticorpo engenheiro geneticamente contendo as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) do anticorpo monoclonal anti-Met, e ii) um fragmento de (i) ou (ii) contendo as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) do anticorpo monoclonal anti-Met, ou combinação dos mesmos.

“INIBIDOR DE MET PARA USO EM AUMENTAR A EFICIÊNCIA DE RADIOTERAPIA E SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO”

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente revelação diz respeito ao uso de inibidores de MET para melhorar a eficiência de radioterapia em pacientes que sofrem de cânceres.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0002] Embora seja satisfatoriamente empregada para tratar pacientes com câncer, a radioterapia pode não conseguir revogar o tumor que reincide com um fenótipo mais agressivo. De maneira consistente, um efeito pró-metastático paradoxal de radiação ionizante (IR) foi revelado por estudos clássicos em modelos animais. A progressão do tumor após a radioterapia pode resultar da seleção positiva da subpopulação de “célula tronco tumoral”, que é intrinsecamente radio-resistente. Entretanto, evidências contundentes indicam que, à parte da seleção, a IR promove um fenótipo adaptativo apontado para a regeneração tecidual, que pode resultar em comportamento metastático. Este fenótipo é definido como a resposta “estresse e recuperação” ao dano do DNA, que ocorre tanto em uma única célula quanto no nível tecidual. Em células únicas, a detecção do dano do DNA elicit mecanismos moleculares específicos, administrados principalmente pelo eixo ATM-p53, que bloqueiam a replicação e ativam o reparo do DNA. Se o dano for irreversível, uma célula normal é programada para executar a apoptose, ou para hibernar sua capacidade proliferativa por meio da senescência. Entretanto, após a morte de células mutantes, os tecidos têm que reparar um número e padrão adequados de células de maneira a reparar a estrutura e função originais. Assim, a regeneração (ou “cicatrização de ferida”) é iniciada pelas células que sobrevivem, tanto normais quanto neoplásicas. Da maneira observada *in vitro*, este processo inclui etapas tais como desprendimento da borda da ferida, aquisição de um fenótipo de fibroblasto, migração para a área marcada e, possivelmente, proliferação. O programa completo tem sido referido como “transição epitelial-mesenquimal” (EMT), uma terminologia que destaca as características morfológicas. Mais recentemente, este programa também foi definido como “crescimento invasivo” (IG), uma

terminologia que enfatiza aspectos funcionais relevantes para o câncer. Aceita-se amplamente agora que EMT/IG é um programa fisiológico para o desenvolvimento e regeneração do tecido, que é usurpado por células cancerosas para realizar invasão e metástase. EMT/IG é ativado em células cancerosas (a) em alguns casos, em função de lesões genéticas que auxiliam a seleção clonal; (b) mais frequentemente, em função de uma resposta adaptativa às condições ambientais adversas.

[0003] Assim, EMT/IG é um programa genético finalmente controlado por poucos fatores de transcrição específicos, e administrado por um grupo de sinais extracelulares. O último inclui fatores de espalhamento, tais como fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e proteína estimuladora de macrófago (MSP), que se ligam aos fatores de tirosina quinase que pertencem à família Met.

OBJETIVO E SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0004] Portanto, a necessidade é procurar melhores soluções para melhorar a eficiência de radioterapia em pacientes que sofrem de tumores.

[0005] O objetivo desta revelação é fornecer tais melhores soluções.

[0006] De acordo com a invenção, o objetivo anterior é atingido graças ao assunto em questão lembrado especificamente nas reivindicações subsequentes, em que entende-se que formam uma parte integral desta revelação.

[0007] Uma modalidade da invenção fornece o uso de um inibidor de Met no tratamento de um paciente que sofre de um tumor, preferivelmente um tumor que apresenta uma via de Met desregulada, em que o inibidor de Met é selecionado de:

- i) um anticorpo monoclonal anti-Met,
- ii) um anticorpo engenheirado geneticamente contendo as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) do anticorpo monoclonal anti-Met, e
- iii) um fragmento de (i) ou (ii) contendo as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) do anticorpo monoclonal anti-Met, ou combinações destes, em que o inibidor de Met é capaz de induzir infra-regulação do receptor codificado pelo gene MET e reduz e/ou anula a resistência do paciente à radioterapia.

[0008] Em uma modalidade preferida, o anticorpo monoclonal anti-Met é o anticorpo monoclonal anti-Met DN30 produzido pela linhagem celular de hibridoma ICLC PD 05006.

[0009] Em uma modalidade preferida adicional, as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) contidas a) no anticorpo engenheirado geneticamente, ou b) nos fragmentos do anticorpo monoclonal anti-Met ou do anticorpo engenheirado geneticamente, são as CDRs de anticorpo monoclonal anti-Met DN30 cujas sequências de aminoácidos são apresentadas em SEQ ID No.: 12 a 14 e 20 a 22.

[0010] Uma outra modalidade da presente revelação diz respeito a uma sequência de nucleotídeos que codifica um inibidor de Met para uso no tratamento (por exemplo, por terapia de gene) de um paciente que sofre de um tumor, preferivelmente um tumor que apresenta uma via de Met desregulada, o dito inibidor de Met sendo selecionado de:

- i) um anticorpo monoclonal anti-Met,
- ii) um anticorpo engenheirado geneticamente contendo as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) do anticorpo monoclonal anti-Met, e
- iii) um fragmento de (i) ou (ii) contendo as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) do anticorpo monoclonal anti-Met, ou combinações destes,

em que o dito inibidor de Met é capaz de induzir a infra-regulação do receptor codificado pelo gene MET e reduz e/ou anula a resistência do paciente à radioterapia.

[0011] Em uma modalidade preferida, o anticorpo monoclonal anti-Met é o anticorpo monoclonal anti-Met DN30 produzido pela linhagem celular de hibridoma ICLC PD 05006.

[0012] Em uma modalidade preferida, as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) contidas nas sequências de nucleotídeos que codificam a) o anticorpo engenheirado geneticamente, ou b) os fragmentos do anticorpo monoclonal anti-Met ou do anticorpo engenheirado geneticamente, são as CDRs de

anticorpo monoclonal anti-Met DN30 cujas sequências de aminoácidos são apresentadas em SEQ ID No.: 12 a 14 e 20 a 22.

[0013] De acordo com uma modalidade preferida, o inibidor de Met é para administração i) na forma de proteína solúvel por injeção ou infusão ou ii) por meio de um vetor para administração sistêmica ou intra-tumor.

[0014] De acordo com uma modalidade preferida adicional, o inibidor de Met está na forma de um fragmento Fab opcionalmente conjugado com pelo menos uma molécula de estabilização, em que a molécula de estabilização é selecionada de polietilenoglicol, domínio de ligação de albumina, albumina.

[0015] A presente revelação descreve que a irradiação supra-regula a expressão de *MET* (oncogene conhecido por direcionar o “crescimento invasivo” de câncer), que por sua vez promove a invasão celular e protege as células da apoptose induzida por radiação. Assim, a anulação ou inibição da expressão *MET* de sua atividade quinase por compostos específicos, isto é, inibidores específicos de Met, promove apoptose e neutraliza a invasividade induzida por radiação, melhorando assim a eficiência de radioterapia.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

[0016] A invenção será agora descrita, apenas a título de exemplo, com referência às figuras em anexo, em que:

- A Figura 1 mostra que a IR induz a transcrição de *MET*.

[0017] a mostra a proteína Met em MDA-MB-435S nos pontos de tempo indicados após irradiação (10 Gy). ctrl mostra Met no tempo zero. b mostra a proteína Met em MDA-MB-435S 12 horas após irradiação (1-10 Gy). c mostra o transcrito de *MET* em MDA-MB-435S nos pontos de tempo indicados após irradiação (10 Gy). d mostra a atividade da luciferase direcionada pelo promotor *MET* (construto básico, sem promotor) em MDA-MB-231 nos pontos de tempo indicados após irradiação (10 Gy; ctrl mostra células não irradiadas). Colunas: média de análise em triplicata de dois experimentos independentes \pm s.e.m. (* $p < 0,05$, $n = 6$, teste-*t* pareado). a.u. significa unidades arbitrárias.

- A figura 2 mostra que a transcrição de *MET* induzida por IR exige NF- κ B.

[0018] a mostra o acúmulo de proteína nuclear em MDA-MB-435S analisado nos pontos de tempo indicados após irradiação (10 Gy), ou após 24 horas de cultura em hipóxia (O₂ 1%). ctrl mostra células não irradiadas no tempo zero. b mostra imunoprecipitação de cromatina em MDA-MB-231 irradiada (10 Gy; ctrl mostra células não irradiadas). As colunas representam a razão entre a imunoprecipitação de anti-p65/RelA e IgG não específica de cada sequência de ligação NF-κB (κB1 ou κB2) no promotor *MET* (media ± s.e.m. de análise em triplicata). O promotor *NFKBIA* (IκBα) foi usado como controle positivo. c mostra a atividade do promotor *MET* em MDA-MB-231, silenciado pela expressão de p65/RelA (siRELA; siCTRL, controle) e irradiado (10 Gy; ctrl mostra células não irradiadas). As colunas representam a razão entre o promotor *MET* direcionado e a expressão da luciferase sem promotor (básica) (média de análise em triplicata em três experimentos independentes ± s.e.m). Inserção: proteína p65/RelA após a transfecção de RNAsi. d mostra o acúmulo de proteína Met em MDA-MB-435S silenciada pela expressão de p65/RelA (siRELA; siCTRL, controle), nos pontos de tempo indicados após irradiação (ctrl mostra células não irradiadas no tempo zero).

- A figura 3 mostra que a expressão de *MET* induzida por IR exige a ativação de ATM quinase.

[0019] Mostra a expressão da proteína Met, fosforilação de Chk2 (p-Chk2) e translocação nuclear de p65/RelA em MDA-MB-435S tratada com o inibidor CGK733 de ATM quinase, e extraída nos pontos de tempo indicados após irradiação. ctrl mostra as células não irradiadas no tempo zero.

- A figura 4 mostra que o crescimento invasivo induzido por IR exige Met.

[0020] a mostra a invasão da membrana basal por MDA-MB-231 irradiada ou U-251 (10 Gy; ctrl mostra o controle). Micrografias de filtros Transwell (10X). b mostra morfogênese por ramificação induzida por Met aberrante em MDA-MB-435S irradiada (10 Gy; ctrl, controle), cultivada com ou sem (-) as concentrações indicadas de HGF. Escala gráfica: 100 μm.

- A figura 5 mostra que a inibição de Met sensibiliza células para apoptose induzida por IR e captura proliferativa.

[0021] Mostra a viabilidade de U-251 irradiada com 10 Gy e/ou cultivada na presença do fragmento Fab do anticorpo DN30 anti-Met, por 48 horas (veículo: células não irradiadas). Colunas: média de análise em triplicata de três experimentos independentes \pm s.e.m. (* $p < 0,05$, viabilidade significativamente reduzida com relação tanto a Fab-DN30 quanto 10 Gy sozinho, $n = 9$, teste- t pareado). Colunas: percentual de células que geram clones (média de análise em triplicata de dois experimentos independentes \pm s.e.m., * $p < 0,05$, $n = 6$, teste- t pareado).

- A figura 6 mostra que IR induz a fosforilação de Met.

[0022] Mostra a fosforilação de Met em MDA-MB-231 tratada com HGF (50 nM) e/ou por IR (10 Gy). As células foram imunoprecipitadas com anticorpos anti-Met nos pontos de tempo indicados e analisadas por Western blot com anticorpos anti-fosfo-Tyr (p-Tyr). Met foi mostrada como controle de imunoprecipitação de proteína. ctrl mostra células tratadas com o controle negativo HGF (ver métodos).

- A figura 7 mostra o alinhamento do promotor *MET* de camundongo e de humano.

[0023] O promotor *MET* de humano (número de acesso ao GenBank: AF046925) foi analisado com o software TRANSFAC 7.0 (Biobase Biological Database GmbH, Wolfenbuttel, Alemanha) com relação à identificação de sítios de ligação do fator de transcrição. Dois sítios de ligação NF- κ B putativos (κ B1 e κ B2) foram observados. O alinhamento do promotor *MET* de humano e de camundongo (Gene ID: 17295) mostra que o sítio κ B2 (-1149/-1136 na sequência de humano, retângulo) é altamente conservado entre as duas espécies.

- A figura 8 mostra a sequência de ácidos nucleicos (a) e aminoácidos (b) de cadeia pesada do anticorpo monoclonal DN30. As regiões CDR são sublinhadas tanto nas sequências de nucleotídeos quanto de aminoácidos.

- A figura 9 mostra a sequência de ácidos nucleicos (a) e aminoácidos (b) de cadeia leve do anticorpo monoclonal DN30. As regiões CDR são sublinhadas tanto nas sequências de nucleotídeos quanto de aminoácidos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES DA INVENÇÃO

[0024] A presente invenção será agora descrita em detalhes com relação a algumas modalidades preferidas por meio de exemplos não limitantes.

[0025] Na descrição a seguir, vários detalhes específicos são fornecidos para prover um entendimento completo das modalidades. As modalidades podem ser praticadas sem um ou mais dos detalhes específicos, ou com outros métodos, componentes, materiais, etc. Em outros exemplos, as estruturas, materiais ou operações bem conhecidos não são mostrados ou descritos em detalhe para evitar os aspectos não esclarecidos das modalidades.

[0026] Os títulos aqui fornecidos são apenas para conveniência e não interpretam o escopo ou o significado das modalidades.

[0027] Além dos alvos de dano celular, a radiação ionizante (principalmente por meio da geração de espécies de oxigênio reativo) sintoniza a atividade de moléculas regulatórias que controlam a resposta biológica de estresse e recuperação.

[0028] A supra-regulação transcricional do oncogene *MET* surge como um evento importante nesta resposta, resultando na execução de um programa de pró-sobrevivência e regeneração que neutraliza o dano induzido por radiação. Esta revelação mostra que a supra-regulação de *MET* induzida por IR é controlada por uma via de transdução de sinal elicitada pela proteína quinase ATM após a detecção das lesões do DNA. Esta via envolve a exportação nuclear da ATM quinase e a liberação do fator de transcrição NF-κB a partir da inibição. Notavelmente, sabe-se que a ativação de NF-κB por dano no DNA desempenha um papel chave na resposta de defesa contra a radiação, já que NF-κB é um regulador proeminente de genes anti-apoptóticos. Propõe-se que a sobrevivência celular promovida por NF-κB seja muito eficiente com relação a induzir a “resistência adaptativa” de células cancerosas à radioterapia. Os presentes inventores mostram agora que a resposta adaptativa à radiação mantida por NF-κB envolve crucialmente o proto-oncogene *MET*.

[0029] A indução de *MET* por IR é um evento transcricional bifásico mediado pela ligação de NF-κB aos dois elementos de resposta específica κB localizados no promotor *MET*. A primeira resposta transcricional, que ocorre 1-2 horas após a irradiação, provavelmente depende da ativação de NF-κB pela via intrínseca

direcionada pelo sensor ATM de dano ao DNA. De maneira concebível, a superexpressão de Met induzida por IR é, por si, suficiente para eliciar o sinal de transdução na presença de concentrações fisiológicas do HGF ligante ubíquo, da maneira mostrada no caso de superexpressão de Met induzida por hipóxia. A supra-regulação de *MET* posterior é mantida, prolongada por 24 horas, também é provavelmente para ser apoiada por múltiplas vias de sinalização extrínseca que interferem em NF-κB. De fato, a irradiação promove a expressão de citocinas, incluindo TNF-α, IL-1 e IL-10 que por um lado são alvos de NF-κB, e por outro lado estimulam a atividade transcricional de NF-κB. Os presentes inventores consideram que, em tecidos vivos, a irradiação induz alças autócrinas/parácrinas que repercute em NF-κB que propaga ondas de sinais de sobrevivência por todo o tecido danificado.

[0030] Notavelmente, sabe-se que a resposta transcricional à NF-κB inclui, além dos genes de pró-sobrevivência, as moléculas responsáveis por EMT/IG. A execução combinada de programas genéticos de pró-sobrevivência e EMT/IG age como uma faca de dois gumes: em tecidos normais, estes programas resultam em sobrevivência e regeneração após o dano; em células cancerosas, eles adotam a progressão para malignidade.

[0031] O proto-oncogene *MET* reúne os critérios para ser um alvo decisivo de NF-κB, exigido para administrar tanto o lado explicado quanto o não explicado da resposta de estresse e recuperação. Como é mostrado na presente revelação, por um lado a superexpressão de Met induzida por IR possibilita que as células cicatrizem as feridas em monocamadas. Por outro lado, IR estimula as células a atravessar as membranas basais, uma marca típica de tumores malignos. De maneira ainda mais impressionante, relata-se que a IR transforma o processo fisiológico de morfogênese por ramificação induzida por Met em disseminação de célula desorganizada em toda uma matriz tridimensional. Em todos os casos, embora vários genes alvos de NF-κB sejam expressos em células irradiadas, por meio da redução de *MET* ou inibição funcional, os presentes inventores mostram que Met é exigido tanto para o crescimento invasivo fisiológico (cicatrização de

ferida) quanto para crescimento invasivo maligno (invasividade). A agressividade relatada de tumores reincidentes após a irradiação, assim, pode envolver a ativação do programa EMT/IG em um controle rigoroso do oncogene *MET*.

[0032] A observação de que Met está implicada na resposta anti-apoptótica, regenerativa e invasiva à IR apresenta importantes consequências terapêuticas: a combinação de radioterapia com inibição de Met radiosensibiliza as células cancerosas, prevenindo ao mesmo tempo os efeitos colaterais pró-invasivos. De fato, a presente revelação mostra que a inibição de Met prejudica significativamente a sobrevivência celular e a capacidade clonogênica após a exposição a doses terapêuticas de IR. De maneira mais importante, sendo expressa no compartimento tronco/progenitor de vários tecidos normais, *MET* é expressa de maneira concebível também em células tronco tumorais, que frequentemente derivam da transformação direta de células tronco normais ou progenitores proliferativos. A expressão e ativação de Met induzidas por IR sustentam a radio-resistência de célula (tronco) cancerosa e a capacidade invasiva, aumentando assim a probabilidade de sua seleção e disseminação positiva.

[0033] Portanto, a inibição de Met (por meio da administração do inibidor de Met na forma de proteína solúvel ou por terapia de gene, isto é, administração de um vetor que codifica o inibidor de Met da maneira definida a seguir) em combinação com terapias convencionais, isto é, radioterapia, é uma estratégia adicional para erradicar o câncer.

[0034] Na presente revelação, a expressão “inibidor de Met” significa um anticorpo monoclonal anti-Met, derivados e/ou fragmentos deste, capazes de induzir a infra-regulação do receptor codificado pelo gene *MET*. Em uma modalidade preferida, o “inibidor de Met” é anticorpo monoclonal anti-Met DN30, derivados e/ou fragmentos destes, que são capazes de induzir infra-regulação do receptor codificado pelo gene *MET*

[0035] A expressão “derivado de anticorpo” significa uma molécula contendo as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) do anticorpo, tal como

um anticorpo engenheirado geneticamente ou humanizado contendo as CDRs do anticorpo, ou um peptídeo contendo as CDRs do anticorpo.

[0036] A expressão “fragmento de anticorpo” significa um fragmento selecionado dos fragmentos Fv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ de i) o anticorpo monoclonal anti-Met, e ii) o anticorpo engenheirado geneticamente ou humanizado contendo as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) do anticorpo monoclonal anti-Met.

[0037] A partir de um ponto de vista farmacológico, o emprego de um fragmento Fab apresenta tanto vantagens quanto desvantagens. As moléculas Fab podem ser facilmente produzidas usando sistemas de expressão simples, incluindo eucariotos e procariotos inferiores (Chambers RS. *Curr Opin Chem Biol* 2005 9:46-50). As moléculas Fab também são menos imunogênicas, comparadas aos anticorpos completos, e seu peso molecular mais baixo melhora a penetração tecidual.

[0038] Um problema no uso de fragmentos Fab na clínica diz respeito à curta meia vida plasmática de fragmentos Fab, que é em virtude da maior depuração renal. Isto pode ser evitado pela administração local da molécula Fab no sítio do tumor. Para as aplicações terapêuticas que exigem distribuição sistêmica e tratamento prolongado, as ações que objetivam aumentar a meia vida de Fab são necessárias. A fim de conseguir uma maior meia vida de Fab, uma forma estabilizada de Fab obtida por conjugação com uma molécula de estabilização (que não modifica as propriedades de ligação de antígeno do fragmento Fab) foi obtida.

[0039] Embora a peguilação seja a técnica mais consolidada (Chapman AP. *Adv Drug Deliv Rev* 2002 54:531-545.), a peguilação não é apenas a possibilidade para implementar a estabilidade de proteínas terapêuticas.

[0040] Alternativamente à modificação química, as moléculas Fab recombinantes podem ser modificadas, no nível de sequência primária de nucleotídeos, para incorporar as sequências que codificam peptídeos ou domínios capazes de se ligar com alta afinidade à albumina sérica (Dennis MS, et al., *J Biol Chem* 2002 277:35035-35043; Stork R, et al. *Protein Eng Des Sel* 2007 20:569-576),

ou podem ser geradas como uma molécula quimérica na qual uma das cadeias que codificam a Fab é fundida em alinhamento com uma sequência que codifica uma proteína biologicamente ativa (por exemplo, albumina sérica (Subramanian GM, et al. *Nat Biotechnol* 2007 25:1411-1419)). O polietilenoglicol, domínio de ligação de albumina, albumina, ou qualquer outra sequência que não modifica as propriedades de ligação de antígeno do fragmento Fab, pode ser usada como moléculas de estabilização capazes de aumentar a meia vida plasmática *in vivo* do fragmento Fab.

[0041] O anticorpo monoclonal DN30 anti-cMet é produzido pela linhagem celular de hibridoma depositada pelo Advanced Biotechnology Center (ABC), Interlab Cell Line Collection (ICLC), S.S. Banca Cellule e Colture in GMP, Largo Rosanna Benzi 10, Genova, Itália, com número de acesso ICLC PD 05006.

[0042] Os tumores adequados para a administração de um inibidor de Met a fim de reduzir e/ou anular a resistência à radioterapia de acordo com a presente revelação incluem i) carcinomas, preferivelmente selecionados entre bexiga, mama, colangiocarcinoma, colorretal, endometrial, esôfago, gástrico, de cabeça e pescoço, rim, fígado, pulmão, nasofaríngeo, ovariano, pâncreas/vesícula biliar, próstata, tireóide, ii) sarcoma de tecido macio, preferivelmente selecionado entre sarcoma de Kaposi, leiomiossarcoma, MFH/Fibrossarcoma, iii) sarcoma músculo-esquelético, preferivelmente selecionado entre osteossarcoma, rabdomiossarcoma, sarcoma sinovial, iv) malignidade hematopoiética, preferivelmente selecionada entre leucemia mielóide aguda, leucemia de célula T do adulto, leucemia mielóide crônica, linfomas, mieloma múltiplo, v) outros neoplasmas preferivelmente selecionados entre tumores cerebrais, melanoma, mesotelioma, tumor de Wilms.

[0043] Todos estes tumores apresentam, de fato, uma “via Met desregulada”, em que esta expressão significa que estes tumores são caracterizados por uma sinalização de Met aberrante em virtude de pelo menos um de i) mutações de Met, ii) superexpressão da proteína Met, iii) amplificação do gene Met, iv) níveis elevados de HGF circulante.

[0044] Administração de inibidores de Met aos pacientes humanos

[0045] Os anticorpos anti-Met serão administrados por meio de regimes similares àqueles adotados para anticorpos que alvejam outro receptor de tirosina quinase envolvido em malignidades humanas (por exemplo, Trastuzumab, um anticorpo contra HER-2). Tipicamente, o anticorpo, ou um derivado ou fragmento deste, é administrado por infusão intravenosa com doses semanais variando entre 5-10 mg/kg, preferivelmente 4-8 mg/kg. Para a combinação com radioterapia, a administração dos anticorpos anti-Met iniciará uma semana, mais preferivelmente um dia, antes da irradiação e continuará até uma semana, preferivelmente até 6 a 48 horas, após o final da radioterapia.

[0046] As sequências de DNAC que codificam o anticorpo anti-Met, ou derivados ou fragmentos deste, também podem ser administradas aos pacientes humanos por meio de procedimentos de “terapia gênica”. A sequência de DNAC é clonada em um vetor de transdução de origem viral (lentiviral, retroviral, adenoviral, etc.) e montada em uma partícula viral, capaz de marcar especificamente o tumor ou as células associadas ao tumor, por meio de proteínas de ligação de superfície específica. A preparação da partícula viral é então produzida em um aparelho de grau GMP. Esta preparação pode ser tanto sistemicamente quanto intra-tumoralmente distribuída por meio de uma única ou múltiplas injeções. Os tecidos tumorais transduzidos pelo vetor viral expressarão as proteínas codificadas pelas sequências do anticorpo anti-Met, ou derivados ou fragmentos deste, fornecendo assim um circuito auto-inibidor.

[0047] A seguir, os dados experimentais são fornecidos; os experimentos foram conduzidos usando anticorpo monoclonal DN30, e/ou derivados e/ou fragmentos destes, a fim de fornecer uma descrição detalhada de algumas modalidades preferidas sem nenhum propósito limitante da presente invenção.

Materiais e métodos

[0048] Linhagens celulares e RNAsi. As linhagens celulares (A549, MDA-MB-231, LoVo, MDAMB-435S, U-87MG, U-251, PC3, SF295, DLD1, SK-N-SH) são provenientes de ATCC. Para a inibição da ATM quinase, as células foram pré-tratadas por 4 horas antes da irradiação e então mantidas na presença de CGK733

(10 μ M em DMSO). Os RNAssi que alvejam *RELA* (ON-TARGET e agrupamento SMART L-003533-00 *RELA* de humano, NM_021975, Dharmacon, 100 nM), ou RNAssi controle (ON-TARGET e agrupamento SMART, siCONTROL que não alveja RNAsi, Dharmacon) foram transfectados de maneira transiente.

[0049] As sequências de RNAsi foram da maneira a seguir.

[0050] “Agrupamento SMART L-003533-00 *RELA* de humano NM_021975” foi uma mistura 1:1:1:1 das sequências duplex a seguir:

(1) sentido: GGAUUGAGGAGAAACGUAAUU (SEQ ID No.:1),

reverso: 5'-NUUUCCUACAAGCUCGUGGGUU (SEQ ID No.:2),

(2) sentido: CCCACGAGCUUGUAGGAAAUU (SEQ ID No.:3),

reverso: 5'-NUUUCCUACAAGCUCGUGGGUU (SEQ ID No.:4),

(3) sentido: GGCUAUAACUCGCCUAGUGUU (SEQ ID No.:5),

reverso: 5'-NCACUAGGCGAGUUAUAGCCUU (SEQ ID No.:6),

(4) sentido: CCACACAACUGAGCCCAUGUU (SEQ ID No.:7),

reverso: 5'-NCAUGGGCUCAGUUGUGUGGUU (SEQ ID No.:8).

[0051] O agrupamento SMART, siCONTROL que não alveja RNAsi (uma única sequência duplex):

sentido: AUGUAUUGGCCUGUAUUAG (SEQ ID No.:9).

[0052] Produção de anticorpo DN30 e fragmento Fab DN30. O anticorpo monoclonal DN30 foi produzido da maneira descrita em Prat M. et al., 1998, J. Cell Sci 111:237–247, e depositado no Advanced Biotechnology Center, com número de acesso ICLC PD 05006. O fragmento Fab DN30 foi obtido por meio da digestão de papaína DN30 e purificação de afinidade (estojo de preparação de Fab Immunopure, Pierce).

[0053] A sequência de aminoácidos de cadeia pesada de DN30 é ilustrada na figura 8b e apresentada em SEQ ID No:10, a sequência de nucleotídeos de cadeia pesada de DN30 é ilustrada na figura 8a e apresentada em SEQ ID No.:11.

[0054] As sequências de aminoácidos que correspondem às regiões CDR de cadeia pesada de DN30 são as seguintes: CDR-H1: GYTFTSYW (SEQ ID NO.:12); CDR-H2: INPSSGRT (SEQ ID NO.:13); CDR-H3: ASRGY (SEQ ID NO.:14). As

sequências de nucleotídeos que correspondem às regiões CDR de cadeia pesada de DN30 são as seguintes: CDR-H1: GGCTACACCTTCACCAGTTACTGGA (SEQ ID NO.:15); CDR-H2: ATTAATCCTAGCAGCGGTCGTACT (SEQ ID NO.:16); CDR-H3: GCAAGTAGG (SEQ ID NO.:17).

[0055] A sequência de aminoácidos de cadeia leve de DN30 é ilustrada na figura 9b e apresentada em SEQ ID No:18, a sequência de nucleotídeos de cadeia leve de DN30 é ilustrada na figura 9a e apresentada em SEQ ID No.:19.

[0056] As sequências de aminoácidos que correspondem às regiões CDR de cadeia leve de DN30 são as seguintes: CDR-L1: QSVDYDGGSY (SEQ ID NO.:20); CDR-L2: AAS (SEQ ID NO.:21); CDR-L3: QQSYEDPLT (SEQ ID NO.:22). As sequências de nucleotídeos que correspondem às regiões CDR de cadeia leve de DN30 são as seguintes: CDR-L1: AAAGTGTTGATTATGATGGTGGTAGTTATAT (SEQ ID NO.:23); CDR-L2: GCTGCATCC (SEQ ID NO.:24); CDR-L3: CAGCAAAGTTATGAGGATCCGCTCACG (SEQ ID NO.:25).

[0057] Irradiação *in vitro*. Os raios-X foram emitidos por um acelerador de partícula linear (Clinac 600C/D, Varian) que funciona a 6 MV.

[0058] Western Blot. A expressão de proteína foi investigada em células confluentes irradiadas, exauridas de soro. Para o fracionamento em porções citoplasmáticas e nucleares, as células foram lavadas e incubadas no gelo por 10 minutos em “tampão A” (HEPES 10 mM pH 7,9, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, NP-40 0,5 %, ditiotretol 1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonila 1 mM e um coquetel de inibidores de protease). Os sobrenadantes contendo os extratos citoplasmáticos foram separados por centrifugação. Os precipitados foram resuspensores em “tampão B” (HEPES 20 mM pH 7,9, KCl 400 mM, EDTA 1 mM, ditiotretol 1 mM, glicerol 10 %, fluoreto de fenilmetilsulfonila 1 mM e um coquetel de inibidores de protease) e incubados a 4 °C por 1 hora com mistura vigorosa. Os lisados nucleares resultantes foram clarificados por centrifugação de alta velocidade. As quantidades iguais de proteínas foram determinadas por SDS-PAGE e analisadas por Western blot com os anticorpos primários a seguir: Met anti-humano de camundongo (DL21 revelado em Prat et al., *Int. J. Cancer* 49, 323-328 (1991)), anti-p65/RelA de camundongo e anti-

HIF-1 α de camundongo (BD Biosciences), anti-fosfo-Ser276 de coelho e anticaspase-3 de coelho (sinalização celular), anti-fosfo-Chk2 de coelho (T68, R&D Systems). Anti-actina de cabra (C-11; Santa Cruz Biotechnology) e anti-lamina B de camundongo (Calbiochem) foram usados para controle de carga proteica citoplasmática ou nuclear igual, respectivamente. As imagens das manchas foram capturadas usando um formador de imagem molecular (GelDoc XR; Bio-Rad Laboratories). A análise densitométrica foi realizada com Quantity One 1-D (Bio-Rad Laboratories). Western blots mostraram ser representativos dos resultados obtidos em pelo menos três experimentos independentes.

[0059] Northern Blot. As células confluentes foram exauridas de soro por 48 horas e irradiadas. O RNA total foi determinado em gel de agarose-formaldeído 0,8 % e transferido para membranas de náilon (Amersham), de acordo com procedimentos padrões. A sonda de *MET* contendo a sequência codificante completa (número de acesso ao GenBank J02958) foi obtida a partir do plasmídeo pCEV-MET (ver Michieli et al., *Oncogene* 18, 5221-5231 (1999)), e marcada com [α - 32 P]dCTP (Megaprime, Amersham). A hibridização foi realizada a 42 °C por 16 horas na presença de formamida 50 %. As membranas de náilon foram lavadas duas vezes com SSC 2X-SDS 0,1 %, e duas vezes com SSC 0,1X-SDS 0,1 % a 42 °C, e auto-radiografadas.

[0060] Detecção de ROS. A geração de ROS intracelular foi avaliada usando diacetato de 5-(e 6)-carboxi-2'-7'-diclorofluoresceína (carboxi-H₂DCFDA, Molecular Probes) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 96 poços pretas (3 x 10⁴ células/poço) 24 horas antes do tratamento (IR: 10 Gy; H₂O₂: 100 μ M como controle). As células foram incubadas na presença de carboxi-H₂DCFDA (10 μ M) em DMEM sem vermelho de fenol por 1 hora a 37 °C. As células foram lavadas, incubadas por mais 30 minutos em DMEM sem vermelho de fenol sem carboxi-H₂DCFDA, e então irradiadas. A geração de ROS foi medida 15 minutos após a irradiação usando um leitor de placa de fluorescência (λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 535 nm) (DTX 880 Multimode Detector).

[0061] Imunoprecipitação de cromatina (ChIP). 4×10^7 células foram usadas para 10 ChIPs tanto para células irradiadas quanto controle. Após a irradiação (10 Gy), as células foram fixas em formaldeído 1% por 15 minutos em temperatura ambiente, e a reação parou com glicina (0,125 M). As células fixas foram lavadas, coletadas em PBS gelado suplementado com um coquetel de inibidores de protease e centrifugadas. A fração citoplasmática foi extraída da maneira anterior e descartada, e os núcleos foram precipitados e ressuspensos em 1 mL de SDS-tampão de lise (SDS 1%, EDTA 1 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8, e um coquetel de inibidores de protease). Os núcleos foram então rompidos por sonicação, rendendo fragmentos de DNA com um tamanho de volume de 400-1000 bp. Os restos celulares foram clarificados por centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes contendo a preparação de cromatina foram diluídos com tampão de diluição 10X (SDS 0,01 %, Triton X-100 1,1 %, EDTA 1,2 mM, Tris-HCl 16,7 mM pH 8, NaCl 167 mM). A cromatina foi então pré-clarificada por 1 hora a 4 °C adicionando a proteína G-sefarose (Amersham, lama em gel a 50 % suplementada com 0,2 mg/mL de DNA de espermatozoário de salmão, BSA 0,1 % e NaN_3 0,05 %). As microesferas foram precipitadas por uma breve centrifugação a 4.000 rpm a 4 °C e os sobrenadantes foram coletados. 3 % da preparação de cromatina foram usados como entrada para normalização de ChIP. A ChIP foi realizada por toda a noite a 4 °C com 4 µg de anticorpos (anti-p65/RelA, Santa Cruz; IgG total de camundongo, Chemicon), seguida por incubação com 50 µL de microesferas de proteína G-sefarose por 3 horas. As microesferas foram lavadas sequencialmente em uma plataforma de rotação a 4 °C com as soluções a seguir (10 min/cada): duas vezes com tampão com pouca concentração de sal (SDS 0,1 %, Triton X-100 1 %, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM), duas vezes com tampão com alta concentração de sal (SDS 0,1 %, Triton X-100 1 %, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM), uma vez com tampão LiCl (LiCl 0,25 M, ácido desoxicólico 1 %, NP-40 0,5 %, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8), e duas vezes com TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). As ChIPs foram eluídas duas vezes em EB (SDS 1 %, NaHCO_3 0,1 M) e mantidas por toda a noite a 65 °C para reservar a reticulação de

formaldeído. O tratamento com RNase (50 µg/mL, 37 °C por 30 minutos) e Proteinase-K (500 µg/mL, 45 °C por 2 horas) foi realizado. Cada amostra foi purificada por extração com fenol/clorofórmio e finalmente ressuspensa em 40 µL de água estéril. 2 µL de cada amostra foram usados como molde para PCR em tempo real com a mistura principal de PCR SYBR GREEN (Applied Biosystems) no sistema de detecção de sequência ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems). Os oligonucleotídeos iniciadores usados foram os seguintes:

- NFKBIA (sentido: GAACCCAGCTCAGGGTTTAG - SEQ ID No.:26; reverso: GGGAATTTCCAAGCCAGTCA - SEQ ID No.:27);
- κB1 (sentido: AGGCCCAGTGCCTTATTACCA - SEQ ID No.:28; reverso: GCGGCCTGACTGGAGATTT - SEQ ID No.:29);
- κB2 (sentido: GGGACTCAGTTTCTTTACCTGCAA - SEQ ID No.:30; reverso: GGGACTCAGTTTCTTTACCTGCAA - SEQ ID No.:31).

[0062] Ensaio de cicatrização de feridas. As células foram crescidas para confluência em placas de 24 poços, exauridas por 24 horas, e estriadas com uma ponteira de plástico. O meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo FBS 1 % e o veículo sozinho (DMSO), e imediatamente irradiado. Após 24 horas, as células foram fixas com glutaraldeído a 11 % (Sigma) e coradas com cristal violeta. As imagens foram adquiridas com uma câmera fotográfica Leica (Leica DFC320, Leica) conectada a um microscópio de luz invertida (DM IRB, Leica). As imagens são representativas dos resultados obtidos em pelo menos três experimentos independentes.

[0063] Ensaio com membrana Transwell. A invasão celular foi medida em câmaras Transwell™ (BD Falcon). As células MDA-MB-231 e MDA-MB-435S (5×10^5 /membrana transwell) foram semeadas nos lados superiores dos filtros revestidos com 20 µg/cm² de membrana basal Matrigel reconstituída (Collaborative Research). U-251 (10^4 / membrana transwell) foram semeadas nos filtros revestidos com 50 µg/cm². O meio de cultura suplementado com FBS 1 % foi adicionado em ambas as câmaras. 1 hora após a semeadura, as células foram irradiadas (10 Gy) e incubadas a 37 °C por 24 horas. As células no lado superior do filtro foram removidas

mecanicamente, e aquelas que migraram para o lado inferior foram fixas, coradas e fotografadas da maneira anterior. Para a quantificação da invasão celular, dez campos por condição experimental foram selecionados aleatoriamente e micrografados da maneira anterior com uma objetiva de 10X. A análise morfométrica foi realizada usando o software MetaMorph 7.1. As imagens são representativas de pelo menos três experimentos independentes.

[0064] Ensaio de morfogênese por ramificação. Os esferóides de MDA-MB-435S foram pré-formados por ressuspensão de célula simples em 240 mg/mL de metilcelulose (Sigma) e cultivados em placas de 96 poços não aderentes (Greiner) por 24 horas. Os esferóides foram transferidos para uma matriz contendo 1,3 mg/mL de colágeno tipo I da cauda de rato (BD Biosciences), FBS 10 % e 240 mg/mL de metilcelulose. Após 24 horas, as células foram irradiadas e/ou cultivadas na presença de HGF por 7 dias. O HGF foi obtido como uma proteína recombinante de baculovírus em células SF9. O meio condicionado a partir de células não infectadas foi usado como controle negativo. As imagens são representativas dos resultados obtidos em três experimentos independentes.

[0065] Ensaio de viabilidade celular com Fab DN30. 10^3 células foram semeadas em placas de 96 poços e crescidas por 24 horas. O meio de cultura foi substituído com meio contendo FBS 1 % e Fab DN30 (28 µg/mL), ou o veículo sozinho (PBS). Após 24 horas, as células foram irradiadas (10 Gy). A viabilidade celular foi avaliada da maneira anterior.

Resultados

[0066] A IR induz a transcrição de *MET*

[0067] Os presentes inventores mostraram previamente que o proto-oncogene *MET* é regulado transcricionalmente por sinais extra e intracelulares específicos, incluindo fatores de crescimento e o sensor de oxigênio. Investiga-se aqui a modulação da expressão de Met por exposição a doses terapêuticas de IR (até 10 Gy).

[0068] Em dez linhagens celulares, derivadas a partir dos tecidos neoplásicos de diferentes tipos histológicos (carcinomas de mama, pulmão, próstata e cólon;

melanoma; glioblastoma; neuroblastoma), observou-se que o nível da proteína Met foi significativamente maior 24 horas após a irradiação. Em linhagens celulares representativas (tais como MDA-MB-435S e MDA-MB-231) a duração detalhada dos experimentos revelou um perfil bifásico do acúmulo de proteína Met. Isto é caracterizado por um pico inicial da indução de Met (~cinco vezes) em torno de 1-2 horas, seguido por um pico tardio similar ou um platô, que aparece em 6 horas e diminui 24 horas após a irradiação (Fig. 1a). Os experimentos dose-resposta mostraram que a indução de Met começa após 1 Gy e atinge um platô em 5 Gy (Fig. 1b). Em células irradiadas, o acúmulo de RNAm de *MET* e a ativação do promotor de *MET* de tamanho completo também foram observadas (Fig. 1c-d), indicando que a superexpressão de *MET* induzida por IR envolve um mecanismo transcricional. De maneira interessante, em MDA-MB-231, uma autofosforilação de Met transiente e independente de ligante também foi detectada, ocorrendo em 10 minutos após a exposição a IR, (Fig. 6). A intensidade da fosforilação de Met induzida por IR foi comparável àquela elicitada por uma concentração não saturada de HGF (50 ng/mL). Entretanto, a cinética de fosforilação foi diferente, uma vez que o pico induzido por IR foi atingido após 10 minutos, enquanto o pico induzido por HGF foi atingido após 30 minutos. A estimulação concomitante por IR e HGF não foi sinérgica (Fig. 6).

[0069] A transcrição de *MET* induzida por IR exige NF-κB

[0070] A IR é conhecida por modular poucos fatores de transcrição, incluindo NF-κB. Dessa maneira, o perfil de expressão do genoma completo mostrou que, nas linhagens celulares examinada, a IR induz uma resposta à NF-κB inicial proeminente. Por exemplo, em MDA-MB-231, 9 dos 33 genes modulados 1 hora após a irradiação são alvos de NF-κB, exibindo uma frequência ~20 vezes maior que a esperada. Além do mais, em experimentos de séries temporais com as células MDA-MB-231, MDA-MB-435S ou U-251, a IR (10 Gy) induziu o acúmulo nuclear rápido (em 30 minutos) e persistente (até 24 horas) da subunidade p65/RelA de NF-κB, uma marca da ativação de NF-κB (Fig. 2a). Além do mais, em pontos de tempo iniciais após irradiação, p65/RelA nuclear foi fosforilada transientemente em Ser²⁷⁶

(Fig. 2a). Sabe-se que esta fosforilação é induzida por espécies de oxigênio reativo (ROS) por meio da proteína quinase A, e promove a interação de p65/RelA com o co-ativador transcricional CBP/p300, que é exigido para a supra-regulação de um subconjunto de genes alvo iniciais. Estes dados indicam que a IR promove a ativação funcional de NF- κ B, por meio do acúmulo nuclear e fosforilação transiente inicial da subunidade p65/RelA.

[0071] No promotor humano *MET*, dois sítios de ligação putativos NF- κ B, κ B1, localizado em -1349/-1340 bp, e κ B2, localizado em -1149/-1136 bp com relação ao sítio inicial de transcrição da sequência (número de acesso ao GenBank AF046925), foram identificados por meio de análise *in silico*. De maneira interessante, o sítio κ B2 é altamente conservado no promotor *met* de camundongo (Fig. 7; sequência do promotor *met* de camundongo (*Mus musculus*) apresentada em SEQ ID No.:32 e sequência do promotor *met* de humano (*Homo sapiens*) apresentada em SEQ ID No.:33). Os experimentos de imunoprecipitação de cromatina mostraram que a associação de p65/RelA em cada sítio foi significativamente maior nas células expostas a 10 Gy (Fig. 2b), indicando que *MET* é transcricionalmente controlada por NF- κ B em células irradiadas. Estes achados incentivaram os presentes inventores a investigar se NF- κ B é uma exigência absoluta para a indução de *MET* por IR. Como p65/RelA está envolvida na formação de cada um dos vários heterodímeros de NF- κ B, sendo assim essenciais para a atividade transcricional completa direcionada por NF- κ B, a expressão de p65/RelA foi anulada por meio de RNA de interferência. Em MDA-MB-231 ou MDA-MB-435S tratada com RNAsi contra p65/RelA (agrupamento SMART L-003533-00 RELA de humano, SEQ ID No.: 1 a 8), a IR pode não mais induzir a atividade do promotor *MET* de tamanho total (Fig. 2c), nem o acúmulo da proteína Met. Obtidos juntos, estes dados fornecem evidências convincentes de que a supra-regulação de *MET* induzida por IR exige a ativação do fator de transcrição NF- κ B.

[0072] O envolvimento do fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1) na transcrição de *MET* induzida por IR também foi considerado, uma vez que (a) HIF-1 mostrou ser ativado em células irradiadas em função da formação de ROS, e (b) HIF-1 é um

regulador proeminente da expressão de *MET*. Entretanto, a relevância de HIF-1 foi mínima, da maneira mostrada por abordagens complementares. Primeiro, em MDA-MB-231 e MDA-MB-435S, a IR não induziu a translocação nuclear da subunidade HIF-1 α , o que é a marca da ativação de HIF-1, o contrário do que é observado quando as células foram cultivadas em baixa concentração de oxigênio (Fig. 2a). A ausência da ativação de HIF-1 não foi em virtude da produção fraca de ROS em células irradiadas, uma vez que ROS aumentaram em $25 \pm 3,5$ % em média, 15 minutos após a exposição a 10 Gy. Isto foi estimado por corresponder a uma média de 80 % da indução de ROS em 2-5 minutos após a irradiação, de acordo com as observações prévias em linhagens celulares expostas a 1-10 Gy. Além do mais, observou-se que a IR pode não ativar o assim denominado promotor *MET* “mínimo”, incluindo os dois elementos funcionais responsivos à hipóxia (HRE) e o sítio Ap-1, que são responsáveis pela supra-regulação de *MET* induzida por hipóxia. Obtidos juntos, estes dados indicam que HIF-1 não está envolvido na supra-regulação de *MET* por IR. Entretanto, observou-se que a hipóxia induziu a translocação nuclear de p65/RelA e a fosforilação de serina (Fig. 2a). Finalmente, o envolvimento do fator de transcrição p53, um alvo de IR proeminente, foi igualmente eliminado. De fato, MDA-MB-435S e MDA-MB-231 (duas linhagens celulares que exibem a maior indução de *MET* por IR) carregam p53 que inativa mutações (G266E e R280K, respectivamente). Além do mais, diferente do promotor de camundongo, o promotor *MET* de humano não é supra-regulado pelas formas constitutivamente ativas de p53.

[0073] A expressão de *MET* induzida por IR é mediada por ativação da ATM quinase

[0074] NF- κ B é um cruzamento de várias vias iniciadas tanto por sinais extracelulares quanto intracelulares. Os últimos incluem aqueles elicitados por proteína quinase ATM após a detecção de dano ao DNA. Para investigar se a indução de *MET* por IR depende da ativação da ATM quinase, MDA-MB-435S ou MDA-MB-231 foram tratadas com 10 μ M do inibidor CGK733 de molécula pequena específica. Nos experimentos de séries temporais, CGK733 preveniu a fosforilação induzida por IR do substrato Chk2 de ATM específico, bem como a translocação

nuclear de p65/RelA e superexpressão de proteína Met. Estes dados indicam que a ATM quinase é exigida para a supra-regulação de *MET* induzida por IR (Fig. 3).

[0075] O crescimento invasivo induzido por IR exige Met

[0076] A superexpressão de Met não implica na ativação de quinase na ausência do ligante de HGF extracelular. Entretanto, ela implica em um aumento significativo na atividade de sinalização dependente de ligante (isto é, sensibilização). Isto tem sido observado em células onde a hipóxia supra-regulou a expressão de Met em um nível comparável, ou menor que, àquele induzido por irradiação.

[0077] Os presentes inventores investigaram assim se a superexpressão de Met induzida por IR poderia eliciar ou potencializar as respostas biológicas dependentes de Met. Estas incluem os lados fisiológicos e patológicos do crescimento invasivo. No ensaio de cicatrização de feridas, que avalia a capacidade da célula regenerar tecidos lesados (isto é, crescimento invasivo fisiológico), a MDA-MB-231 foi irradiada, bem como MDA-MB-435S, realizado espontaneamente no programa de cicatrização desprendendo-se da borda da ferida e migrando para toda a área lesada. Esta resposta, monitorada por 24 horas, foi sobreposta com aquela estimulada por HGF, que também é conhecida como “fator de espalhamento”, uma vez que promove a dissociação e motilidade celular. Entretanto, a resposta de cicatrização elicitada por IR não foi em virtude da indução de uma alça autócrina de HGF, já que as células irradiadas não expressaram HGF da maneira avaliada por PCR quantitativa. Os presentes inventores concluíram que a superexpressão de Met induzida por IR sensibiliza as células em uma quantidade pequena de HGF presente no meio de cultura, que foi suprido com soro 1 %. Esta condição provavelmente mimetiza a presença fisiológica de HGF *in vivo*, que é inserido de maneira ubíqua nas matrizes extracelulares.

[0078] As células irradiadas foram então avaliadas em ensaios com membrana Transwell que mede a capacidade de trespassar uma membrana basal artificial *in vitro*, que está muito relacionada com a invasividade *in vivo*, isto é, o crescimento invasivo maligno. De fato, as células irradiadas (tal como MDA-MB-231,

MDA-MB-435S ou U-251) atravessaram de maneira espontânea a membrana basal Transwell na presença de uma concentração sérica baixa (1 %) (Fig. 4a), mimetizando novamente o comportamento despertado por HGF.

[0079] A IR transforma a morfogênese induzida por Met em um processo invasivo

[0080] A morfogênese por ramificação é um processo fisiológico complexo, induzido por HGF de maneira a gerar órgãos tridimensionais durante o desenvolvimento. Este programa de multi-etapas implica na migração celular, proliferação e reorganização espacial, finalizando com a geração de túbulos ramificados ocos revestidos por células polarizadas. Algumas das linhagens celulares estudadas, tal como MDA-MB-435S, podem executar completamente a morfogênese pelo programa de ramificação *in vitro*.

[0081] A exposição a IR sensibilizou estas células em uma concentração sub-ideal de HGF exógeno (5 nM) que, sozinho, é incapaz de induzir a morfogênese por ramificação (Fig. 4b). De maneira importante, as células irradiadas estimuladas com HGF construíram túbulos com notáveis alterações estruturais, uma vez que as células se separaram da superfície abluminal e se espalharam na matriz ao redor (Fig. 4b). Este comportamento é retrospectivo do “espalhamento tridimensional” descrito como uma forma de morfogênese aberrante que ocorre em resposta ao TNF α . Conclui-se que doses terapêuticas de IR podem transformar a morfogênese fisiológica por ramificação em um processo pró-invasivo aberrante.

[0082] A inibição de Met sensibiliza as células em apoptose induzida por IR e captura proliferativa

[0083] Como parte do programa EMT/IG, Met emite sinais anti-apoptóticos fortes por meio da ativação mantida das vias à jusante, incluindo PI3-quinase/AKT. Os presentes inventores argumentaram assim que a supra-regulação de *MET* poderia prevenir a morte celular induzida por irradiação e que, ao contrário, a inibição de Met poderia aumentar a eficiência de radioterapia.

[0084] Uma menor viabilidade celular (até 75 %) foi observada em células irradiadas que foram mantidas na presença do fragmento Fab do anticorpo anti-Met

DN30, que é conhecido por induzir a infra-regulação de MET, inibindo assim a sinalização e as atividades biológicas de MET (Petrelli et al., PNAS 103: 5090-5, 2006) (Fig. 5).

[0085] Estes resultados indicam que a atividade de inibição de Met sensibiliza as células com relação à radioterapia, aumentando a morte celular e reduzindo a capacidade de recomeçar a proliferação após o tratamento.

[0086] Naturalmente, embora o princípio da invenção permaneça o mesmo, os detalhes da construção e as modalidades podem variar amplamente com relação ao que foi descrito e ilustrado apenas a título de exemplo, sem fugir do escopo da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Inibidor de Met para uso em aumentar a eficiência de radioterapia, reduzindo e/ou anulando a resistência do paciente à dita radioterapia, no tratamento de um paciente sofrendo de um tumor, caracterizado pelo fato de que o dito inibidor de Met é selecionado de:

i) anticorpo monoclonal anti-Met DN30,
ii) um anticorpo engenheirado geneticamente contendo as seis regiões de determinação de complementaridade (CDRs) do anticorpo monoclonal anti-Met DN30, ditas CDRs tendo as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID N°: 12 a 14, e 20 a 22, e

iii) um fragmento de (i) ou (ii) contendo as seis regiões de determinação de complementaridade (CDRs) do anticorpo monoclonal anti-Met DN30, ditas CDRs tendo as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID N°: 12 a 14 e 20 a 22,

em que o dito anticorpo monoclonal anti-Met DN30 é produzido pela linhagem de células hibridoma ICLC PD 05006,

em que o dito inibidor de Met é capaz de induzir a infra-regulação do receptor codificado pelo gene MET e neutraliza a invasividade do tumor induzida por radiação.

2. Sequência de nucleotídeos codificando um inibidor de Met para uso em aumentar a eficiência de radioterapia, reduzindo e/ou anulando a resistência do paciente à dita radioterapia, no tratamento de um paciente sofrendo de um tumor, caracterizada pelo fato de que o dito inibidor de Met é selecionado de:

i) anticorpo monoclonal anti-Met DN30,
ii) um anticorpo engenheirado geneticamente contendo as seis regiões de determinação de complementaridade (CDRs) do anticorpo monoclonal

anti-Met DN30, ditas CDRs tendo as sequências de nucleotídeos estabelecidas nas SEQ ID N°: 15 a 17, e 23 a 25, e

iii) um fragmento de (i) ou (ii) contendo as seis regiões de determinação de complementaridade (CDRs) do anticorpo monoclonal anti-Met DN30, ditas CDRs tendo as sequências de nucleotídeos estabelecidas nas SEQ ID N°: 15 a 17 e 23 a 25,

em que dito anticorpo monoclonal anti-Met DN30 é produzido pela linhagem de células hibridoma ICLC PD 05006,

em que o dito inibidor de Met é capaz de induzir a infra-regulação do receptor codificado pelo gene MET e neutraliza a invasividade do tumor induzida por radiação.

3. Inibidor de Met de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito inibidor de Met é para administração na forma de proteína solúvel por injeção ou infusão.

4. Sequência de nucleotídeos codificando dito inibidor de Met de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a dita sequência de nucleotídeos que codifica o dito inibidor de Met é para administração por meio de um vetor, em que o dito vetor está na forma de uma partícula.

5. Sequência de nucleotídeos que codifica o dito inibidor de Met de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o dito vetor é adequado para marcar o tumor ou células associadas ao tumor.

6. Sequência de nucleotídeos que codifica o dito inibidor de Met de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizada pelo fato de que o dito vetor é para administração sistêmica ou intra-tumor, preferivelmente por injeção.

7. Inibidor de Met ou sequência de nucleotídeos que codifica um inibidor de Met de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado

pelo fato de que o dito fragmento é um fragmento Fab, preferivelmente um fragmento Fab que compreende pelo menos uma molécula de estabilização.

8. Inibidor de Met ou sequência de nucleotídeos que codifica um inibidor de Met de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a dita pelo menos uma molécula de estabilização é selecionada de polietilenoglicol, domínio de ligação de albumina, albumina.

9. Inibidor de Met ou sequência de nucleotídeos que codifica um inibidor de Met de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o dito inibidor de Met e/ou a dita sequência de nucleotídeos que codifica o dito inibidor de Met é para administração pelo menos uma semana antes de submeter o dito paciente à radioterapia.

10. Inibidor de Met ou sequência de nucleotídeos que codifica um inibidor de Met de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o dito inibidor de Met e/ou a dita sequência de nucleotídeos que codifica o dito inibidor de Met é para administração um dia antes de submeter o dito paciente à radioterapia.

11. Inibidor de Met ou sequência de nucleotídeos que codifica um inibidor de Met de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o dito inibidor de Met e/ou a dita sequência de nucleotídeos que codifica o dito inibidor de Met é para administração até pelo menos uma semana, preferivelmente 6 a 48 horas, após o final da radioterapia.

12. Inibidor de Met ou sequência de nucleotídeos que codifica um inibidor de Met de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o dito tumor é selecionado entre um carcinoma, um sarcoma músculo-esquelético, um sarcoma de tecido mole, uma malignidade hematopoiética, um tumor cerebral, melanoma, mesotelioma, tumor de Wilms.

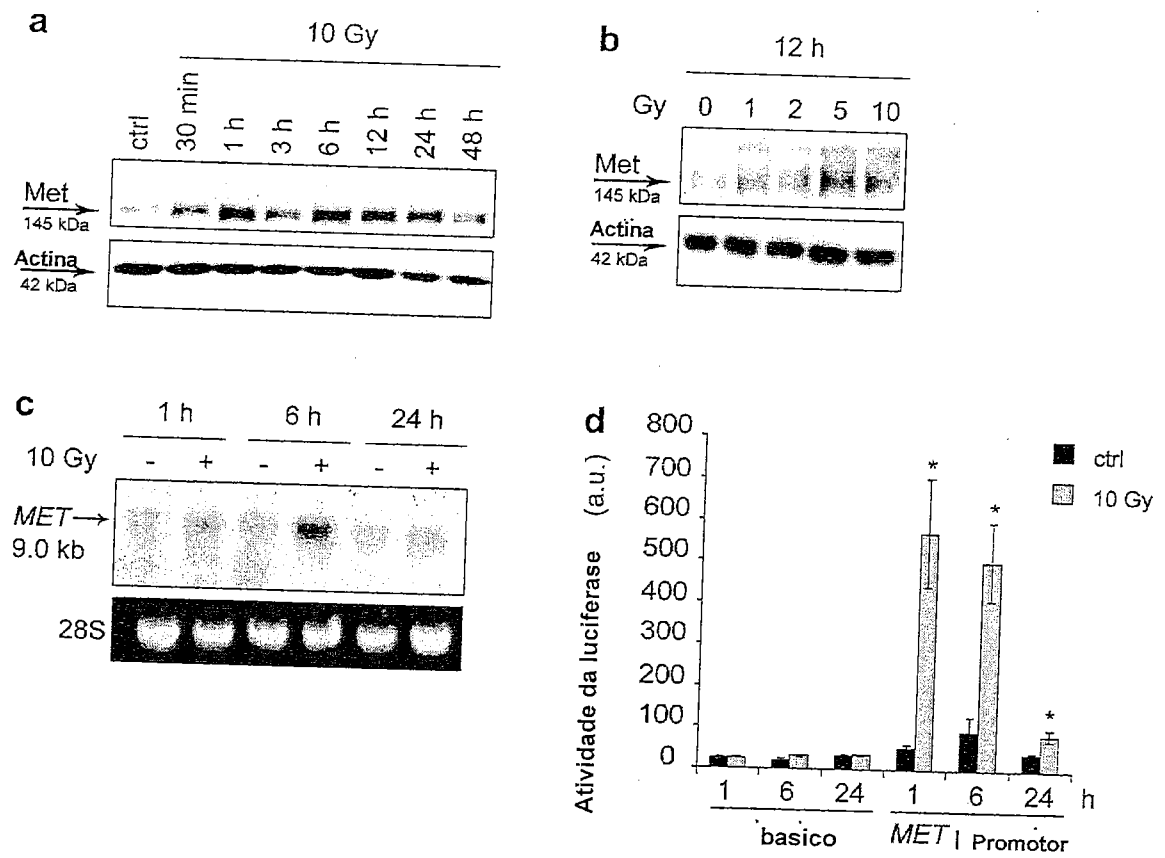


Figura 1

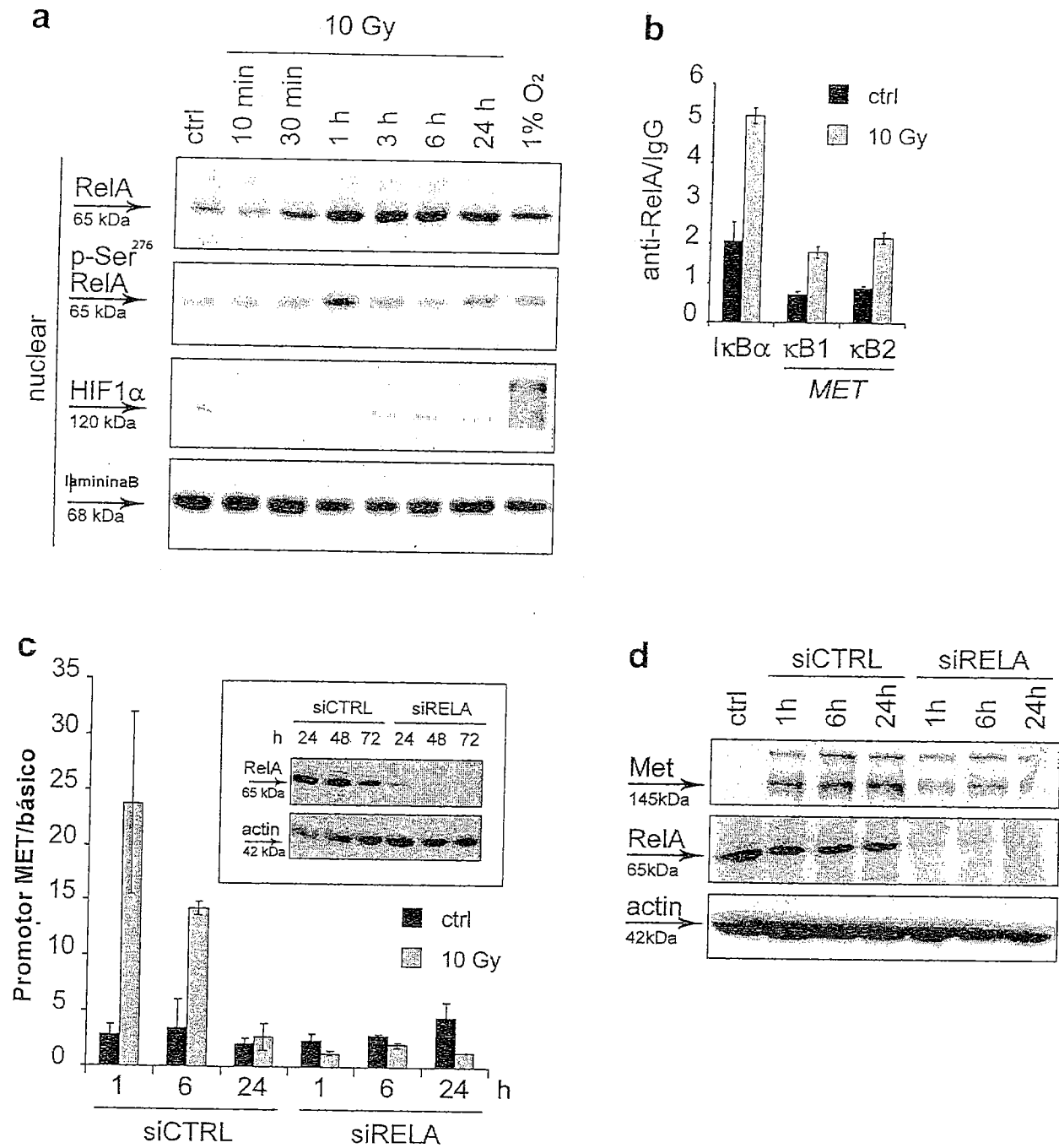


Figura 2

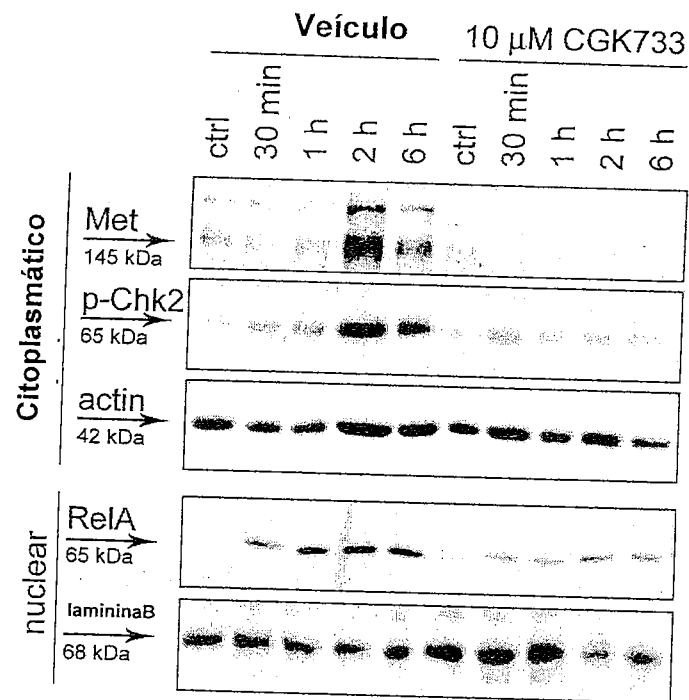


Figura 3

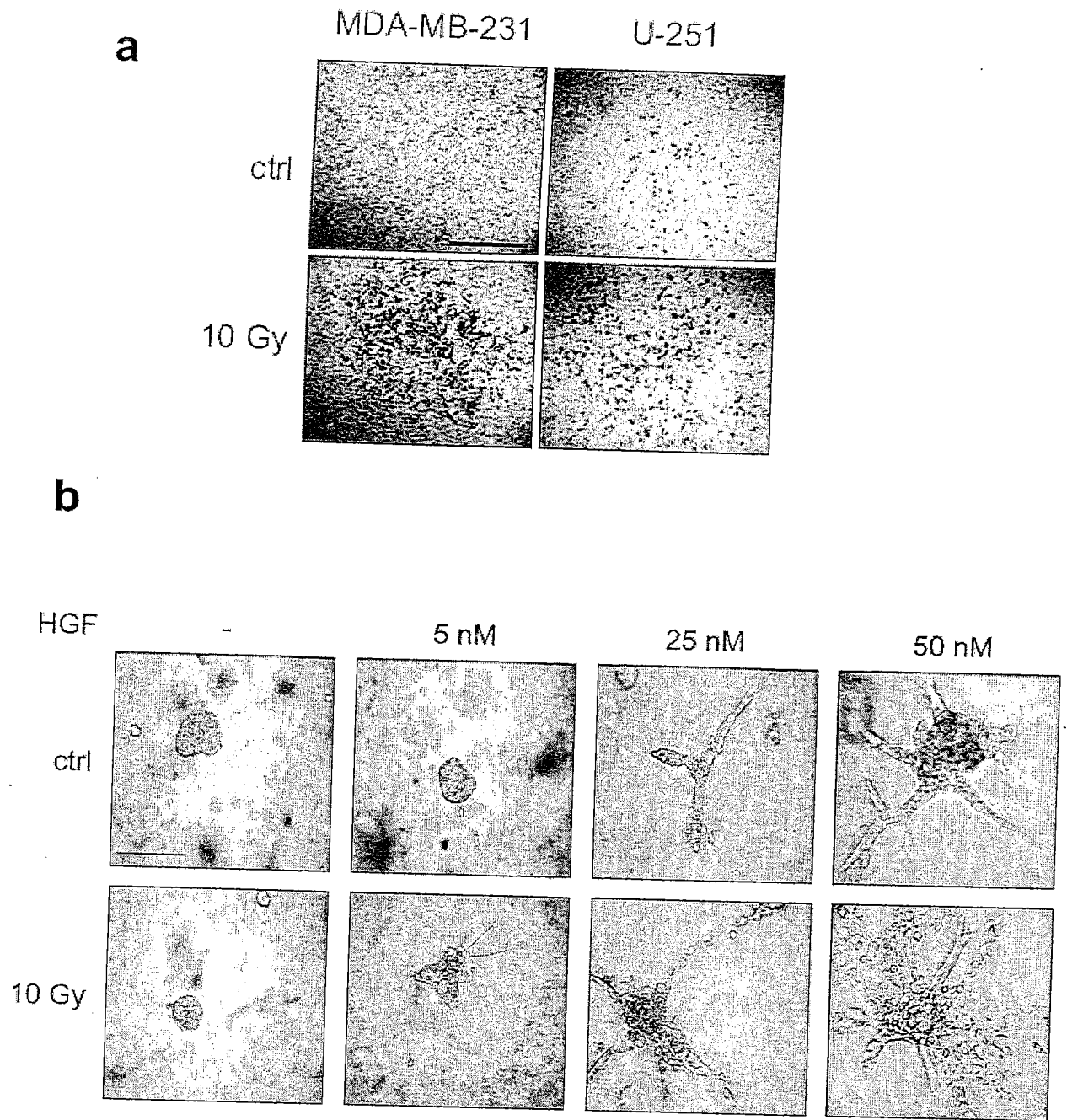


Figura 4

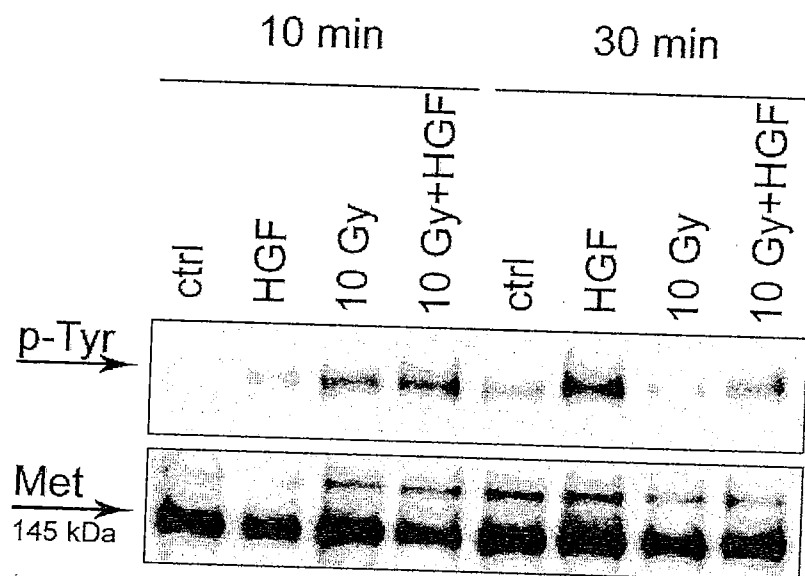
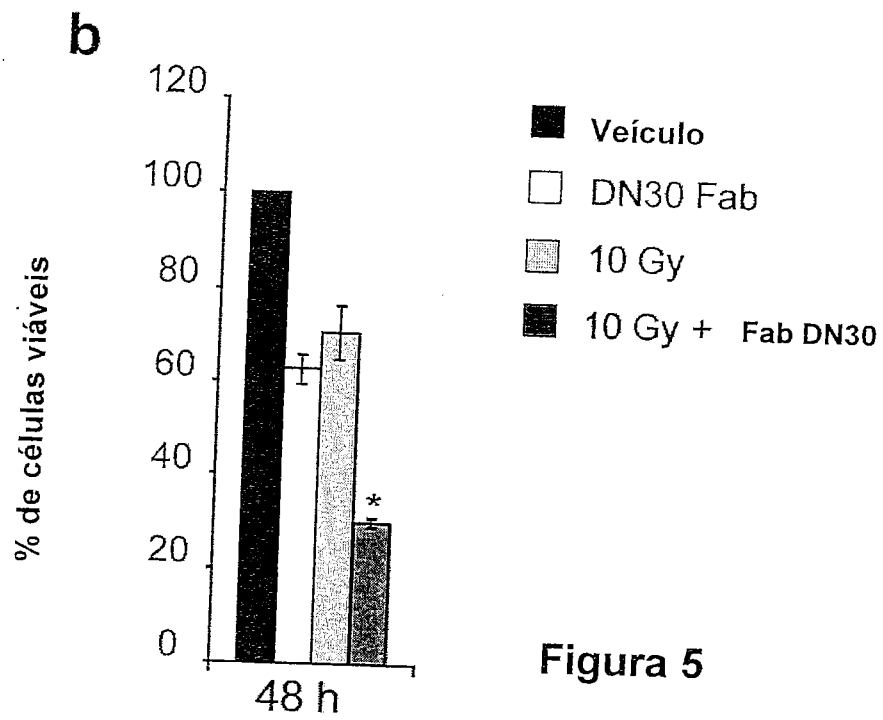


Figura 6

<i>Mus musculus</i>		-----
<i>Homo sapiens</i>	-1285	ATGGTGTGAAGGACACCTGACTGGGCTGAAAGCTAAGTTCTAACTTTGCC
<i>Mus musculus</i>	-714	-----CGTACGGGCT-GT
<i>Homo sapiens</i>	-1235	CCTCTTACTAACCAGCTATGTGACTCTCCTGGGAACCTTTTAGGGACTCAG
<i>Mus musculus</i>	-702	TTTATTCATCTGCAAAAT-GATTCCGTGCAGGCCTCCAAACTGTAATAG
<i>Homo sapiens</i>	-1185	TTTCTTTACCTGCAAAAT-GGTTCAATGCAAGACTTTAGTAACGTAATGG
<i>Mus musculus</i>	-653	GAACCTTCCTTTTCCATCAAACCTGAGGAGTGGTGAGGTAAACCGCTCTTG
<i>Homo sapiens</i>	-1087	GAACCTTCCTTTTCCATAAACTGGGGAATCAAGAGGTAATCTCTTTTGA

Figura 7

a) - SEQ ID No.:11

```

atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgg ccaactcccag      60
gtccaactgc agcagcctgg gactgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagctgtcc      120
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagt tactggatac actgggtgaa gcagaggcct      180
ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctagca gcggtcgtac taactacaac      240
gagaaattca agaacaaggt cacagtgact gtagacaaat cttccaccac agcctacatg      300
caactcagca acctgacato tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag taggggctac      360
tggggccaaag gcaccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacagcccc atcggctctat      420
ccactggccc ctgtgtgtgg aaatacaact ggctcctcgg tgactotagg atgcctggtc      480
aagggttatt tccctgagcc agtgaccttg acctggaact ctggatccct gtccagtggc      540
gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct gacotctaca ccctcagcag ctcaagtgact      600
gtaacctcga gcacctggcc cagccagtcc atcacctgca atgtggccca cccggcaagc      660
agcaccaagg tggacaagaa aattgagccc agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca      720
tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttgggt ggaccatccg tcttcatctt cctccaaaag      780
atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc cccatagtca catgtgtggt ggtggatgtg      840
agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca      900
gctcagacac aaacccatag agaggattac aacagtactc tccgggtggt cagtgccttc      960
cccatccagc accaggactg gatgagtggc aaggagtcca aatgcaaggt caacaacaaa      1020
gacctcccag cgcccatcga gagaaccatc tcaaaaccca aagggtcagt aagagctcca      1080
caggtatatg tcttgccctc accagaagaa gagatgacta agaaacaggt cactctgacc      1140
tgcatggtca cagacttcat gcctgaagac atttacgtgg agtggaccaa caacgggaaa      1200
acagagctaa actacaagaa cactgaacca gtccctggact ctgatgggtc ttacttcatg      1260
tacagcaagc tgagagtgga aaagaagaac tgggtggaaa gaaatagcta ctctgtttca      1320
gtggtccacg agggctctgca caatcaccac acgactaaga gottctcccg gactccgggt      1380
aatga

```

1386

b) - SEQ ID No.:10

MGWSYIILFLVATATDGHSQVQLQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWIHWVKQRPGQGLEWIGEINPSSGRTN
 YNEKFKNKVTVTVDKSSTTAYMQLSNLTSEDSAVYYCCASRGYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGNTTGSSVTL
 GCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPT
 IKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLISLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDYNS
 TLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPED
 IYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

Figura 8

a) - SEQ ID No.:19

atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60
 gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 120
 atctcctgca aggcagcca aagtgttgat tatgatggg gtagttatat gagggtgttc 180
 caacagagac caggacagcc acccaaaactc ctcatctctg ctgcatccaa tctagaatct 240
 gggatcccag ccaggtttag tggcagtggc tctgggacag acttcaccct caatatccat 300
 cctgtggagg aggaggatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagttatga ggatccgctc 360
acgttcgggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 420
 atcttccac catccagtga gcagttaaca tctggagggtg cctcagtcgt gtgcttcttg 480
 aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540
 aatggcgtcc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc 600
 agcaccctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660
 actcacaaga catctacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttag 717

b) - SEQ ID No.:18

METDTILLWVLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSV~~VDYD~~GGSYMSWFQORPGQPPKLLISAASNL
 ESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDVATYYCQ~~QSYEDPLT~~FGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV
 VCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT~~LT~~KDEYERHNSYTCEATHK~~ST~~STSPIVKSFN
 RNEC

Figura 9