

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0707480-8 A2**

(22) Data de Depósito: 05/02/2007
(43) Data da Publicação: 03/05/2011
(RPI 2104)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/867
A61K 39/395
A61P 35/00
A61P 35/04
A61K 48/00
G01N 33/50
C07K 14/71
C12N 15/13
C07K 16/28

(54) Título: **USOS DE UM ANTICORPO MONOCLONAL, UM FRAGMENTO E/OU ANTICORPO GENETICAMENTE ENGENHEIRADO OU HUMANIZADO, DE UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E DE UM VETOR, PRODUTO, E, MÉTODO PARA TRIAR COMPOSTOS**

(30) Prioridade Unionista: 06/02/2006 EP 06101345.4

(73) Titular(es): Metheresis Translational Research S.A.

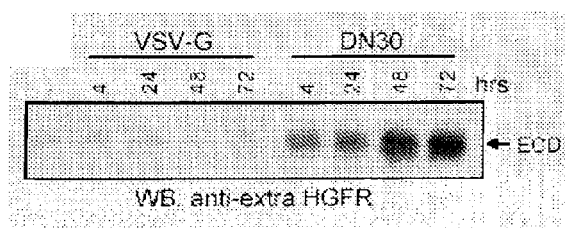
(72) Inventor(es): Paolo Maria Comoglio

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007051066 de 05/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/090807 de 16/08/2007

(57) Resumo: USOS DE UM ANTICORPO MONOCLONAL, UM FRAGMENTO E/OU ANTICORPO GENETICAMENTE ENGENHEIRADO OU HUMANIZADO, DE UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E DE UM VETOR, PRODUTO, E, MÉTODO PARA TRIAR COMPOSTOS Uso de um anticorpo monoclonal direcionado contra o domínio extracelular de fator de crescimento de hepatócito é descrito para a preparação de um medicamento para o tratamento de tumores e/ou metástases e de uma ferramenta de diagnóstico para detectar células neoplásicas bem como vetores compreendendo pelo menos uma porção da sequência de nucleotídeos codificadora do anticorpo monoclonal anti-Met e/ou pelo menos um fragmento do mesmo e pelo menos um inibidor de quinase.



USOS DE UM ANTICORPO MONOCLONAL, UM FRAGMENTO E/OU ANTICORPO GENETICAMENTE ENGENHEIRADO OU HUMANIZADO, DE UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E DE UM VETOR, PRODUTO, E, MÉTODO PARA TRIAR COMPOSTOS”

5 Campo da invenção

A presente invenção refere-se ao uso de um anticorpo monoclonal, fragmentos e/ou porções do mesmo, e ao uso de sequência de nucleotídeos codificadora de um anticorpo monoclonal, fragmentos e/ou porções do mesmo para a preparação de um medicamento para o tratamento
10 de tumores e metástases e dispositivos de diagnóstico para detectar células neoplásicas, quer in vivo, quer in vitro. Em particular, a presente invenção refere-se ao uso de um anticorpo monoclonal anti-Met direcionado contra o domínio extracelular receptor de fator de crescimento de hepatócito.

Fundamentos da invenção

15 Exploração científica de imunoterapia de câncer começou nos anos 1950s e a primeira aplicação baseou-se em anticorpos policlonais. Hoje, após mais do que cinco décadas, imunoterapia com anticorpos monoclonais continua a oferecer uma alternativa promissora para tratamento de câncer (1,2). Vários anticorpos selecionadores de receptores de tirosina quinase
20 (RTKs) em câncer são correntemente usados em prática clínica (3). O mecanismo de ação destes anticorpos é diferente em ocorrências diferentes, e - a despeito dos exemplos de aplicação bem sucedida - muitas vezes, é insatisfatoriamente entendido (4). Bevacizumab e Cetuximab selecionam VEGF-VEGFR e EGF-EGFR, respectivamente, e atuam por prevenção da
25 interação de ligante-receptor, (5,6). Herceptina é um anticorpo monoclonal específico para HER2, um membro da família EGFR. O mecanismo de ação subjacente à eficácia de Herceptina não está completamente claro mas tem sido mostrado que promove degradação de HER2, diminuindo assim os níveis de receptor na superfície de células de tumor (7).

O oncogene MET, codificador de receptor de tirosina quinase para Fator de Crescimento de Hepatócito (HGF), controla programas genéticos levando ao crescimento celular, invasão celular e proteção celular contra apoptose. Ativação desregulada de HGFR é crítica não apenas para a aquisição de propriedades tumorigênicas mas também para a realização do fenótipo invasivo (8). O papel de MET em tumores de humano emergiu de várias abordagens experimentais e foi inequivocamente aprovado pela descoberta de MET ativando mutações em formas herdadas de carcinomas. (9,10). Além disso, ativação constitutiva de HGFR é freqüente também em cânceres esporádicos e estudos disto e outros laboratórios têm mostrado que o oncogene MET é sobre-expressado em tumores de histotipos específicos ou é ativado através de mecanismos autócrinos. Além disso, o gene MET é amplificado em metástases hematogênicas de carcinomas colorretais (11). Interferência com ativação de Met está portanto se tornando uma abordagem desafiadora para impedir os processos tumorigênicos e metastásicos. Nos anos passados, várias estratégias têm sido propostas para bloquear a sinalização de HGFR, seleção de qualquer um o HGFR ou seu ligante. Estas abordagens incluem o uso de antagonistas de HGF, anticorpos neutralizadores de HGFs, iscas de HGFR, inibidores de sítio de ligação de ATP de molécula pequena de HGFR ou moléculas pequenas tais como geldanamicina, ribozimas e polipeptídeos de domínio SH2 (revisto em 12).

Sumário da invenção

A presente invenção é relacionada ao uso de um anticorpo monoclonal direcionado contra o domínio extracelular receptor de fator de crescimento de hepatócito (HGFR) no tratamento de tumores e/ou metástases em um indivíduo afetado por um tumor e em dispositivos de diagnóstico para detectar células neoplásicas, quer in vivo, quer in vitro.

O objetivo da presente invenção é, portanto, o uso de i) um anticorpo monoclonal anti-Met, ii) um fragmento contendo a região de

ligação de epítopo de um anticorpo monoclonal anti-Met e/ou iii) um anticorpo geneticamente engenheirado contendo a região de ligação de epítopo ou as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de um anticorpo monoclonal anti-Met para a preparação de um medicamento para o tratamento de tumores e metástases em um indivíduo sofrendo de um tumor e para dispositivos de diagnóstico para detectar células neoplásicas, quer in vivo, quer in vitro, no qual o anticorpo monoclonal anti-Met - chamado AntiMET-R - é produzido pela linhagem de célula 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 o número de acesso de ICLC PD 05006.

Outro objetivo da presente invenção é o uso de um vetor compreendendo pelo menos uma porção da seqüência de nucleotídeos codificadora da região de ligação de epítopo ou as CDRs do anticorpo monoclonal anti-Met produzido pela linhagem de célula de hibridoma ICLC PD 05006 para a preparação de um medicamento para o tratamento de tumores e metástases em um indivíduo afetado por um tumor.

Outro objetivo da presente invenção é o uso de i) do anticorpo monoclonal anti-Met, ii) um fragmento contendo a região de ligação de epítopo do anticorpo monoclonal anti-Met e/ou iii) um anticorpo geneticamente engenheirado contendo a região de ligação de epítopo ou as CDRs do anticorpo monoclonal anti-Met e pelo menos um inibidor de quinase como uma preparação combinada para uso simultâneo, separado ou seqüencial em terapia de tumor e/ou de metástases.

Outro objetivo da presente invenção é um método para triar compostos capazes de se ligarem em pelo menos uma porção do receptor de domínio extracelular de fator de crescimento de hepatócito (HGFR) para a identificação de compostos farmacologicamente ativos na prevenção e/ou tratamento de tumor e/ou metástases.

Outro objetivo da presente invenção é o uso do anticorpo AntiMET-R, fragmentos do mesmo e/ou anticorpos geneticamente engenheirados contendo a região de ligação de epítopo ou as CDRs do anticorpo AntiMET-R como ferramenta de diagnóstico para detectar células neoplásicas, quer in vivo, quer in vitro.

De acordo com a presente invenção, estes propósitos são alcançados por meio das reivindicações que seguem, que são parte integral do ensinamento técnico aqui proporcionado com respeito à invenção.

Breve descrição dos desenhos

- Figura 1. AntiMET-R prejudica ativação de HGFR e transdução de sinal. (A) Avaliação de ativação de HGFR. Células GTL16 foram expostas a AntiMET-R nos tempos indicados. HGFR foi imunoprecipitado dos lisados celulares e Western blots foram sondados com Abs indicados. Tratamento com AntiMET-R resultou em um decréscimo de ativação de receptor mais pronunciado do que regulação negativa de receptor, como indicado por quantificação de densidade de banda. (B) Análise de sinalização de HGFR. Células foram pré-tratadas quer com VSV-G quer com AntiMET-R e então estimuladas com HGF nos tempos indicados. Fosforilação Akt foi avaliada em lisados totais de célula. Como mostrado no painel superior, AntiMET-R reduziu ambas a ativação Akt basal e HGF-induzida.

- Figura 2. AntiMET-R inibe o fenótipo transformado de células de câncer in vitro. (A) Crescimento ancoragem-independente de células GTL16. Células pré-tratadas foram semeadas em ágar 0,5%. Células foram então mantidas na presença das quantidades indicadas de Abs AntiMET-R ou VSV-G e após 10 dias, colônias crescidas foram coradas. Crescimento ancoragem-independente foi drasticamente inibido até mesmo em doses baixas de AntiMET-R. (B) Ensaio de invasão. MDA-MB-435 β 4 foram pré-tratadas com os anticorpos indicados por 24 h antes da semeadura

em uma câmara Transwell revestida com matrigel. A câmara inferior foi cheia com DMEM FBS 2% + HGF 100ng/mL. Após 24 h, as células migradas foram coradas e contadas. Capacidade invasiva em resposta ao HGF é expressada como aumento de vezes comparado com as células não estimuladas. Como mostrado, tratamento com AntiMET-R reduziu significativamente a invasão de célula.

- Figura 3. AntiMET-R inibe o fenótipo transformado de células de câncer in vivo (A, B) Ensaio de tumorigênese. Camundongos nus foram injetados subcutaneamente com $1,5 \times 10^6$ células GTL16. Após surgimento de tumor, camundongos exibindo tumores de mesmo tamanho foram selecionados e então injetados in situ duas vezes por semana com 2 µg/g de quer VSV-G quer AntiMET-R. Volume de tumor foi medido em instantes de tempo diferentes (A). Como mostrado, AntiMET-R prejudicou o crescimento de tumor em camundongos nus enxertados com células de tumor de humano. Camundongos foram mortos após 8 semanas de tratamento e peso de tumor foi calculado (B). Em camundongos tratados com AntiMET-R, tumores foram significativamente menores do que em camundongos de controle ($p < 0,05$). (C) Avaliação de ativação de HGFR. Seções de tumor de camundongos tratados com VSV-G (painel A), ou AntiMET-R (painel B) foram coradas com anti-fosfo-HGFR de humano. Análise imuno-histoquímica de tumores revelou que os níveis de HGFR ativado foram fortemente decrescidos em camundongos tratados com AntiMET-R.

- Figura 4. Tratamento com AntiMET-R interfere com a progressão de tumor in vivo. Camundongos nus foram inoculados subcutaneamente com $2,5 \times 10^6$ células MDA-MB-435 β4. Crescimento de tumor foi avaliado em camundongos não tratados (A) e em camundongos tratados com: 10 µg/g de VSV-G administrado IP (B), 1 µg/g de AntiMET-R IP (C), 10 µg/g de AntiMET-R IP (D) e 2 µg/g de AntiMET-R IS (E). Como mostrado no diagrama (K), AntiMET-R inibiu o crescimento de tumor em

camundongos nus enxertados com células de tumor de humano. Coloração imuno-histoquímica para anti-fosfo-HGFR de humano foi realizada em seções de tumor mostradas no painel esquerdo. Ativação forte de HGFR esteve presente em ambos camundongos não tratados (F) e em camundongos tratados com anticorpo de controle (G). Administração de AntiMET-R resultou em inibição de HGFR que igualou ao enfraquecimento de crescimento de tumor. (L) Análise de metástases pulmonares. Metástases foram contadas por observação microscópica de seções de pulmão após coloração com hematoxilina/eosina. Uma redução dose-dependente de número de metástases foi evidente em camundongos tratados com AntiMET-R. (M-N) Avaliação de vascularização de tumor. Coloração de imunofluorescência sobre seções histológicas de tumor foi realizada com um anticorpo anti-CD31 de camundongo. Número e área de vasos foram avaliados por microscopia de fluorescência. Como mostrado, ambos o número e o tamanho de vasos foram reduzidos em resposta ao tratamento com AntiMET-R.

- Figura 5. AntiMET-R induz regulação negativa de HGFR. Células GTL16 (A) e MDA-MB-435 β 4 (B) foram tratadas com AntiMET-R nos tempos indicados. Quantidades iguais de lisados de célula total foram processadas para Western blotting e sondadas com anti-HGFR (painéis superiores) ou, como controle de carregamento, com anticorpos anti-Hsp70 (painéis inferiores). Como mostrado, AntiMET-R foi capaz de induzir regulação negativa de HGFR tanto em células sobre-expressando (GTL16) quanto em células expressando níveis normais de HGFR (MDA-MB435 β 4). (C) Quantificação citofluorimétrica de HGFR sobre a superfície de célula. Células MDA-MB-435 β 4 foram incubadas em meio sozinho (barras pretas) ou HGF (barras cinzas) ou AntiMET-R (barras brancas). Nos instantes de tempo indicados, as células foram coradas com um Ab anti-extra HGFR (D024). Como mostrado, AntiMET-R foi capaz de eficientemente reduzir a

quantidade de HGFR de superfície com redução máxima após 30 h de tratamento.

- Figura 6. Regulagem negativa induzida por anticorpo e dependente de ligante segue rotas diferentes. (A) Células HeLa (painel superior) e GTL16 (painel inferior) foram pré-tratadas com lactacistina (lact) ou concanamicina (conc) ou ambas por 2 horas, antes do tratamento com HGF ou AntiMET-R. Regulagem negativa de HGFR foi avaliada sobre os lisados de célula totais. Na presença de inibidores de proteassomo, regulagem negativa de HGFR ligante-induzida foi enfraquecida, enquanto que Ab-induzida não o foi. Nesta condição, um fragmento de 60Kd (seta), detectável apenas por um Ab direcionado contra a porção intracelular (anti-intra Met), foi acumulado nas células. Além disso, sondagem com anticorpos anti-ubiquitina (B, painel superior) mostrou que este fragmento foi etiquetado com grupos ubiquitina, como esperado para uma molécula comprometida pela degradação proteassomal.

- Figura 7. AntiMET-R induz a clivagem proteolítica de HGFR e separação de Domínio Extracelular (ECTODOMAIN). (A) Células GTL16 foram metabolicamente marcadas com ^{35}S Metionina e ^{35}S Cisteína e então tratadas quer com HGF quer com AntiMET-R por 4 h. Sobrenadantes foram coletados e imunoprecipitados com um Ab anti-HGFR direcionado contra o domínio extracelular. Geles foram corridos sob condição não-redutoras (painel superior) e redutoras (painel inferior). Na ausência de agentes cadeias α e β de HGFR migram como um complexo, enquanto que as duas bandas correm separadamente na presença de β -mercapto-etanol. Como mostrado na figura, AntiMET-R mas não HGF foi capaz de induzir separação de ectodomínio de HGFR. (B) AntiMET-R induz separação de ectodomínio também em células endoteliais. Células HUVEC foram expostas ao anticorpo nos tempos indicados. Meios de cultura foram coletados e imunoprecipitados com um anticorpo reconhecendo a porção extracelular de cadeia- β de HGFR.

Western blots foram sondados com o mesmo anti-extra HGFR. (C, D) Separação de HGFR é dose- e tempo-dependente. Células foram estimuladas com quantidade crescente de AntiMET-R (C) ou por tempos diferentes (D). Meios de cultura foram tratados como em (B)

5 - Figura 8. Ativação de transdução de sinal não é requerida para separação de HGFR. Células Cos-7 foram transfectadas com mutantes de HGFR diferentes e 48 horas mais tarde foram tratadas com AntiMET-R por 4 h. Quantidades iguais de lisados de célula e meios condicionados foram processadas para Western blotting. Como mostrado, AntiMET-R foi capaz de
10 induzir regulação negativa e separação de ectodomínio de todos os mutantes de HGFR. HGFR KD = HGFR Quinase Morta, faltante de atividade de quinase; HGFR Duplo = mutante de HGFR faltante de 2 tirosinas de ancoragem 1349, 1356 e assim incapaz de recrutar transdutores de sinal; HGFR-GFP = mutante de HGFR onde toda a porção intracelular foi
15 substituída pela seqüência GFP.

 - Figura 9. O ectodomínio separado de HGFR comporta-se como uma “isca” . Células pré-tratadas com AntiMET-R foram estimuladas com HGF quer na ausência quer na presença de ectodomínio de HGFR (Met ecto) no meio de cultura. Como mostrado, ectodomínio de HGFR separado
20 prejudicou a ativação Akt e comportou-se como uma “isca” .

 - Figura 10. Células geneticamente modificadas por meio transferência de gene mediada por vetor lentiviral expressam AntiMET-R. (A) Desenho esquemático do vetor lentiviral bidirecional (forma integral) usado para expressar AntiMET-R; LTR: HIV-1 Long Terminal Repeats [Repetições
25 Terminais Longas de HIV-1]; a região U3 é deletada na posição -18 da região R. SD: Splice donor [Doador de União]. SA: Splice Acceptor [Aceptor de União]. PolyA SV40: sítio de poliadenilação do vírus simiano 40. Cte: elemento de transporte constitutivo derivado do vírus Mason-Pfizer de macaco. P_{min}CMV: promotor mínimo derivado de CitoMegaloVírus. hPGK:

promotor de humano do gene Fosfoglicerato-Quinase. PRE: elementos regulatório de pós-transcrição do vírus de hepatite de marmota. Etiqueta FLAG: seqüência codificadora de epítipo DYKDDDK 3 vezes repetido. Etiqueta His: seqüência codificadora de 7 resíduos de Histidina. (B) Análise por Western blot de sobrenadantes de cultura livre de soro (cada amostra de 75 μ L) coletados de duas linhagens celulares representativas com vetor lentiviral trazendo AntiMET-R cDNAs. Amostras foram submetidas à SDS-PAGE sob condição redutora e os filtros correspondentes foram sondados com Ig anti-camundongo. (C) Tabela relatando a quantificação de AntiMET-R em sobrenadantes de cultura derivados de um painel de linhagens de célula transduzidas com vetor lentiviral trazendo AntiMET-R cDNAs.

- Figura 11: O AntiMET-R recombinante liga-se com afinidade alta no domínio extracelular de Met . (A) Análise por Western blot de lisados de célula contendo o Receptor Met imunoprecipitado com o AntiMET-R derivado de fontes diferentes (hibridoma ou linhagem de célula de carcinoma geneticamente modificada). A imunoprecipitação foi realizada incubando Seph. Prot. G com sobrenadantes de cultura de célula de 1: Hibridoma produzindo MAb não relacionado; 2 Hibridoma produzindo AntiMET-R MAb; 3: células MDA-MB 435 infectadas com vetor lentiviral trazendo cDNAs para AntiMET-R MAb 4: células MDA-MB 435 não infectadas. Amostras foram submetidas à SDS-PAGE sob condição redutora e os filtros correspondentes foram sondados com um anticorpo anti-Met direcionado contra a cauda c-Terminal do receptor. (B) Ensaio de ligação do AntiMET-R e o AntiMET-R recombinante no domínio extracelular do Receptor Met . Placa de 96 cavidades revestida com domínio extracelular MET purificado fusionado no domínio Fc derivado de Ig de Humano (100 ng/cavidade) foi incubada com concentrações crescentes de AntiMET-R purificado ou AntiMET-R recombinante (de 0 a 5,5 nM). Curva de ligação foi revelada usando anticorpo ligado em Ig anti-camundongo - HRP. Para

controlar a especificidade de ligação realizamos o mesmo ensaio usando cavidades revestidas com Fc-Ron (uma proteína quimera gerada de fusão de domínio Fc de Ig de Humano no domínio extracelular do receptor Ron, uma proteína pertencente à família de receptores Met).

5 - Figura 12: O AntiMET-R recombinante induz a clivagem proteolítica de HGFR e separação de Domínio Extracelular (ECTODOMAIN). Células HCT-116, uma linhagem de célula derivada de carcinoma colorretal, foram incubadas em condição livre de soro por 24 h com a quantidade indicada de AntiMET-R (A) purificado ou AntiMET-R
10 recombinante (B). Lisados de célula totais (painéis superiores) e sobrenadantes de cultura celular (painéis inferiores) foram submetidos à SDS-PAGE seguida por Western Blot. A diminuição da forma madura de Met (p145) nas células e o aumento correspondente de ectodomínio Met (p80) nos sobrenadantes de cultura foram monitorados sondando filtros com mAb DL-
15 21 anti-Met que reconhece um domínio localizado na porção extracelular de cadeia β de Met.

 - Figura 13: Transdução com vetor lentiviral codificador de AntiMET-R inibe o fenótipo transformado de células de câncer in vitro e in vivo. (A) Ensaio de crescimento independente de ancoragem. Células HCT-
20 116 transduzidas (AntiMET-R) ou não (WT) com vetor lentiviral codificador de AntiMET-R foram semeadas em ágar 0,5% . As células foram então mantidas em meio suplementado com FCS 2%+ HGF 80 ng /mL. Colônias foram armazenadas após 14 dias; no topo de uma cavidade representativa é mostrado; no fundo o gráfico representa o número de colônias (calculado de triplicatas). (B) Ensaio de invasão. Células HCT116 transduzidas (AntiMET-
25 R) ou não (WT) com vetor lentiviral codificador de AntiMET-R foram plaqueadas em uma câmara Transwell revestida com matrigel. A câmara inferior foi cheia com meio FBS 2% + HGF 80 ng/mL. Após 24 h as células fixadas na parte inferior dos filtros foram contadas. Figuras são campos

representativos dos filtros. (C) Latência de tumor in vivo. Células HCT-116 transduzidas (AntiMET-R) ou não (WT) com vetor lentiviral codificador de AntiMET-R foram injetadas sob-cútis no flanco de camundongos nus anímicos (3×10^6 células/camundongo, $n = 6$ para cada grupo). Massa de tumor foi avaliada a cada 2 dias com um compasso de calibre. Camundongos foram considerados positivos para presença de tumor quando massa de tumor ultrapassou 15 mm^3 . (D) Crescimento de tumor in vivo. Células HCT-116 transduzidas (AntiMET-R) ou não (WT) com vetor lentiviral codificador de AntiMET-R foram injetadas sob-cútis no flanco de camundongos nus anímicos (3×10^6 células/camundongo, $n = 6$ por cada grupo). Cinética de crescimento de tumor foi avaliada medindo a massa de tumor com um compasso de calibre a cada 3 dias. No 65º dia todos os camundongos foram mortos.

- Figura 14: Liberação intra-tumor direta de vetor lentiviral codificador de AntiMET-R inibe crescimento de tumor. Células HCT-116 (4×10^6 células/camundongo) foram injetadas sob-cútis no flanco de camundongos nus anímicos. Quando a massa de tumor foi ao redor de 10 mm^3 partículas de vetor lentiviral ($1 \mu\text{g p24}$ /camundongo) foram administradas intra-tumoralmente no dia 0 e no dia 3. Um grupo (CTRL) recebeu partículas de vetor codificadoras de GFP, enquanto que o outro grupo recebeu partículas de vetor codificadoras de AntiMET-R (AntiMet-R). Cinética de crescimento de tumor foi avaliada medindo massa de tumor com um compasso de calibre a cada 3 dias.

- Figura 15: Mapa do plasmídeo codificador de Anti-MET-R.

- Figura 16: Mapa do plasmídeo codificador de Anti-MET-R FLAG-His.

- Figura 17: Desenho esquemático dos domínios derivados da porção extracelular do HGFR (ectodomínio Met) .

- Figura 18: AntiMET-R especificamente reconhece um

epítopo localizado na região IPTs. Meios condicionados de células MDA-MB-435 transduzidas com partículas de vetor lentiviral codificadoras de Isca Met myc-etiquetada, SEMA PSI myc-etiquetado e PSI IPT1-4 myc-etiquetado foram imunoprecipitados com o anticorpo antiMET-R e detectados por Western blot usando um anticorpo biotinilado anti-myc (painel direito). Quantidades iguais de meios condicionados foram carregadas como um controle para expressão de proteína (painel esquerdo). CTRL: meio condicionado de células MDA-MB-435 transduzidas com um vetor lentiviral vazio. Isca Met : meio condicionado de células MDA-MB-435 transduzidas com um vetor lentiviral expressando o domínio extracelular inteiro de HGFR. PSI-IPT: meio condicionado de células MDA-MB-435 transduzidas com um vetor lentiviral expressando domínios PSI, IPT-1, IPT-2, IPT-3, IPT-4 do HGFR. SEMA-PSI: meio condicionado de células MDA-MB-435 transduzidas com um vetor lentiviral expressando domínios Sema e PSI do HGFR. À direita é mostrado peso molecular em KD.

- Figura 19: AntiMET-R reconhece um epítopo localizado na região IPT-4. Lisados de células MDA-MB-435 transduzidas com partículas de vetor lentiviral expressando regiões individuais IPT-1, IPT-2, IPT-3, IPT-4, todas elas etiquetadas com indicador, foram imunoprecipitados com o anticorpo AntiMET-R e detectadas por Western blot usando um anticorpo anti-indicador (painel esquerdo); como controle para expressão de proteína, quantidades similares de lisados celulares foram imunoprecipitadas com um anticorpo anti-indicador e detectadas por Western blot usando o mesmo anticorpo anti-indicador (painel direito). CTRL: Lisado de células MDA-MB435 transduzidas com um vetor lentiviral vazio. IPT1: Lisado de células MDA-MB-435 transduzidas com um vetor lentiviral expressando a região IPT-1 de HGFR. IPT2: Lisado celular de células MDA-MB-435 transduzidas com um vetor lentiviral expressando a região IPT2 de HGFR. IPT3: Lisado de células MDA-MB-435

transduzidas com um vetor lentiviral expressando a região IPT-3 de HGFR. IPT4: Lisado de célula de MDA-MB-435 transduzidas com um vetor lentiviral expressando a região IPT-4 de HGFR. À direita peso molecular em KD é mostrado.

5 - Figura 20: AntiMet-R especificamente cora o receptor HGF em células intactas. Painel A: Perfil de GTL-16 analisado por citometria de fluxo com o anticorpo antiMet-R. Linha fina: GTL-16 incubada com o isótipo anticorpo CTRL; Linha em negrito: GTL-16 incubadas com AntiMet-R. MFI: Intensidade de fluorescência média. Painel C: Análise de imunofluorescência
10 de células GTL-16 marcadas com o anticorpo AntiMet-R reveladas por uma Ig de cabra anti-camundongo conjugada com o fluorocromo Alexa Fluor 488. Painel B: Células GTL-16 marcadas apenas com a Ig anti-camundongo / Alexa Fluor 488. (Magnificação original, x 63)

15 - Figura 21: Seqüência de ácido nucleico (a) e de aminoácidos (b) de cadeia pesada de AntiMET-R. As regiões CDR estão sublinhadas tanto na seqüência de nucleotídeos quanto na seqüência de aminoácidos.

 - Figura 22: Seqüência de ácido nucleico (a) e de aminoácidos (b) de cadeia leve de AntiMET-R. As regiões CDR estão sublinhadas tanto na seqüência de nucleotídeos quanto na seqüência de aminoácidos.

20 Descrição detalhada da invenção

 O Receptor de Fator de Crescimento de Hepatócito, codificado pelo proto-oncogene MET, é um receptor de tirosina quinase que, sob ativação, gera um espectro complexo de respostas biológicas conhecido como “crescimento invasivo” (8). Isto implica indução e coordenação de
25 proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência celulares. Sob condições fisiológicas, este programa de crescimento invasivo desempenha um papel importante em organogênese, durante desenvolvimento de embrião mas, quando desatrelado em câncer, contribui para progressão e metástase de tumor (13).

O envolvimento de HGFR em tumores de humano está agora firmemente estabelecido, como mutações missense de linhagem germinativa do gene MET são responsáveis por algumas formas hereditárias de câncer (9,10) e ativação inapropriada de HGFR tem sido mostrada na maioria dos tipos de tumores sólidos, muitas vezes correlacionados com prognóstico insatisfatório (14). A alteração mais freqüente em cânceres de humano é a sobre-expressão de receptor (15) que leva à dimerização constitutiva e à ativação do receptor, até mesmo na ausência de ligante (16). Expressão aumentada de HGFR pode ser devido a (i) amplificação de gene, como em tumores colorretais, onde MET confere às células neoplásicas uma vantagem seletiva para metástase hepática (11), (ii) transcrição intensificada, induzida por outros oncogenes, tais como Ras, Ret e Ets (17,18), (iii) transcrição ativada por hipoxia, neste caso, a quantidade maior de receptor hipersensibiliza as células ao HGF e promove a invasão de tumor (19).

Duas estratégias são correntemente usadas na prática clínica com o objetivo de interferir com os receptores de tirosina quinase (RTKs): (i) tratamento com moléculas pequenas inibindo a atividade de tirosina quinase; (ii) tratamento com anticorpos interferindo com ativação de receptor.

A presente invenção é direcionada ao uso na terapia de tumor de um anticorpo anti-HGFR, e em particular um anticorpo monoclonal anti-Met - chamado AntiMET-R - produzido pela linhagem de célula de hibridoma depositada por ICLC com número de acesso de PD 05006, que surpreendentemente foi verificado ser capaz de induzir regulação negativa de receptor.

Em uma modalidade, a presente invenção envolve o uso de anticorpo monoclonal AntiMET-R para a preparação de um medicamento para o tratamento de tumores e metástases em um paciente sofrendo de um tumor.

Em uma outra modalidade, a presente invenção refere-se ao

uso do anticorpo AntiMET-R para a manufatura de dispositivos de diagnóstico para a detecção de células neoplásicas quer in vivo quer in vitro.

AntiMET-R é um anticorpo monoclonal (mAb) específico para domínio extracelular de HGFR (20). Este anticorpo monoclonal não ativa todos os efeitos biológicos gerados pelo fator de crescimento de hepatócito (motilidade, proliferação, sobrevivência celular, invasão, tubulogênese e angiogênese) mas induz apenas motilidade. Além disso, ele supra-regula a expressão constitutiva de ativador de plasminogênio de tipo uroquinase mas não é capaz de induzir e manter a expressão de receptor de ativador de plasminogênio de tipo uroquinase por períodos de tempo prolongados. Este mAb ativa a fosforilação de receptor, que, sendo estritamente dependente de bivalência de mAb, requer dimerização de receptor.

A capacidade agonista desta anticorpo não é suficiente - per se - para justificar sua atividade terapêutica. De fato, um anticorpo monoclonal antiMET-R diferente (DO-24), que os inventores examinaram, não é capaz de induzir uma regulação negativa de receptor eficiente e não promove separação da porção extracelular do receptor.

AntiMET-R não previne a interação de HGFR com HGF, mas eficientemente promove a regulação negativa de HGFR como mostrado em Exemplo abaixo e discutido com referência à Figura 5. Esta interação leva à inibição de transdução de sinal mediada por HGFR e em particular da rota Akt, conhecida em estar envolvida na resposta anti-apoptótica.

Como será evidente dos resultados descritos abaixo, os inventores demonstraram que tratamento in vitro com AntiMET-R resultou em enfraquecimento da capacidade celular para crescer em uma maneira independente de ancoragem (veja Exemplo 2 e Figura 2), uma propriedade que requer o escape de apoptose devido à falta de ancoragem.

Além disso in vivo - como descrito em detalhe em Exemplo 3 - em animais tratados com AntiMET-R, os presentes inventores têm

observado que os tumores exibem uma velocidade aumentada de apoptose, sem mudanças importantes na velocidade de proliferação. Por outro lado, os inventores não têm observado modificação de propriedades de crescimento celular em resposta ao anticorpo, nem in vitro, nem in vivo, em concordância com a falta de efeito inibitório de AntiMET-R sobre a ativação da rota MAPK. Esta dissociação da capacidade de HGFR de ativar rotas diferente não é nova, já tem sido mostrada para mutantes diferentes de HGFR (21) e em resposta aos agonistas parciais de HGFR (22).

Intra-regulação de HGFR induzida por anticorpo envolve separação da porção extracelular do receptor. Separação de ectodomínio é um processo no qual o domínio extracelular de proteínas de membrana é proteoliticamente solto da superfície celular, permitindo assim que uma célula mude rapidamente sua superfície em resposta aos estímulos ambientais e para dar reguladores solúveis. Os presentes inventores mostram evidência desta atividade de AntiMET-R em Exemplos 6 e 7.

No presente pedido os inventores produzem evidências - em particular em Exemplo 3 - que anticorpo AntiMET-R é ativo in vivo onde ele enfraquece o crescimento de tumor e a formação de metástases espontâneas de células de câncer enxertadas em camundongos nus. Os experimentos sugerem que estes efeitos são mediados pela ação do anticorpo sobre ambas as células de câncer e o microambiente. De fato células endoteliais expressam HGFR (24) e temos demonstrado que antiMet-R induz separação do HGFR também neste tipo de células (dados não mostrados). Neo-vascularização do tumor primário é um requerimento absoluto para ambos o crescimento e a metástase de tumor (23) e tem sido firmemente estabelecido que HGF é um fator angiogênico potente (24). Além disso sob ativação de HGFR, ocorre um aumento na liberação de VEGF e de outros fatores angiogênicos (48-49-40). Assim, o efeito sobre a vascularização de tumor também poderia ser indireto porque inibição de função de Met em células de tumor poderia anular a

liberação de tais fatores do tumor. Os inventores da presente invenção têm observado uma redução significativa de neovascularização de intratumor, devido a uma diminuição do número de vasos germinando do microambiente após tratamento com AntiMET-R.

5 Não é importante que a atividade de AntiMET-R sobre células hospedeiras influencie a funcionalidade de órgãos diferentes tais como baço, medula óssea, fígado, coração, osso e rim, que não mostraram alterações patológicas evidentes (dados não mostrados) após exposição de longa duração ao anticorpo. Assim, a despeito do reconhecimento de HGF-R em ambas
10 células normais e neoplásicas, o AntiMET-R exibe a capacidade para detectar sobre-expressão de HGF-R e para induzir mudanças em viabilidade de célula.

Em conclusão, os resultados aqui mostrados sugerem que regulação negativa de HGFR induzida por AntiMET-R é um mecanismo candidato para imunoterapia e o uso de AntiMET-R ou fragmentos do mesmo
15 em uma composição farmacêutica pode proporcionar um outro modo no tratamento de tumores e prevenção de metástases em pacientes afetados por tumor.

Adicionalmente, AntiMET-R pode ser usado como ferramenta de diagnóstico para detectar células neoplásicas quer in vivo quer in vitro, por
20 exemplo por marcação de AntiMET-R com marcadores adequados.

AntiMET-R conforme a presente invenção pode ser produzido por métodos convencionais em animais ou, preferivelmente, por técnicas de engenharia genética.

O uso do anticorpo monoclonal AntiMET-R de acordo com a
25 presente invenção é intencionado para também incluir o uso de anticorpos humanizados e geneticamente engenheirados e de anticorpos marcados com marcadores de diagnóstico adequados. Anticorpos humanizados e geneticamente engenheirados e métodos para a produção deles são conhecidos na arte. Veja, para uma revisão (25).

O uso de AntiMET-R também inclui o uso de fragmentos contendo a região de ligação de epítopo do mesmo, tais como peptídeos contendo a região de ligação de epítopo ou Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs), fragmentos Fv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂.
5 Fragmentos convencionais são tipicamente produzidos por clivagem proteolítica, mas podem ser produzidos por síntese química, tal como síntese em fase sólida ou líquida, bem como por técnicas de DNA recombinante.

AntiMET-R e seus fragmentos são preferivelmente usados em composições farmacêuticas na forma de proteína solúvel, cuja liberação pode
10 ser realizada usando métodos convencionais de liberação de droga. Administração de composições farmacêuticas compreendendo o anticorpo AntiMET-R e/ou fragmentos do mesmo pode ser realizada por qualquer método conhecido pela pessoa experiente. Por exemplo, a composição pode ser administrada em uma solução aquosa que é injetada ou infundida para
15 dentro do paciente. A determinação da dosagem apropriada depende do número de variáveis específicas de caso, incluindo a idade e o peso do paciente e envolve experimentação de rotina dentro da especialidade da pessoa experiente.

Outra modalidade da presente invenção envolve a produção de
20 composições farmacêuticas contendo o anticorpo monoclonal AntiMET-R marcado com um marcador diagnóstico adequado para a detecção in vivo ou in vitro de células neoplásicas em um paciente sofrendo de um tumor.

A presente invenção envolve a produção de um vetor DNA compreendendo um promotor sintético obtido juntando um promotor de
25 núcleo mínimo (promotor minCMV) a montante em uma orientação oposta à do promotor eficiente do gene Fosfoglicerato Quinase de humano e DNA codificador de pelo menos uma porção da anticorpo monoclonal AntiMET-R. As seqüências de DNA compreendida no vetor codificam a cadeia leve e/ou pesada de AntiMET-R; substituições conservativas nas seqüências de DNA

também estão incluídas pela presente invenção bem como seqüências modificadas pela adição de seqüências de etiqueta em ambas a terminação 5' ou 3'. As seqüências de nucleotídeos codificadoras das cadeias pesada e leve de AntiMET-R são representadas em SEQ ID No.: 1 e SEQ ID No.:2, respectivamente.

Além disso os inventores modificaram a cadeia pesada adicionando uma seqüência de etiqueta em 3' da cadeia pesada de AntiMET-R (SEQ ID No.: 3). Esta seqüência permite purificação de MAb usando uma coluna de Níquel e é reconhecida especificamente por anticorpos anti-indicador (SIGMA).

Embora a produção de vetores de DNA da presente invenção pode ser realizada por uma variedade de métodos conhecidos na arte, produção é exemplificada em Exemplo 10.

Em outra modalidade, a presente invenção envolve o uso de um vetor de DNA compreendendo DNA codificador de região de ligação de epítipo do anticorpo monoclonal AntiMET-R para a preparação de um medicamento para o tratamento de tumor e metástases em um indivíduo. A liberação dos vetores de DNA da presente invenção pode ser realizada usando métodos conhecidos de terapia de gene. Por exemplo fazer referência a (10).

Uma outra modalidade da presente invenção envolve um produto compreendendo o anticorpo AntiMET-R e/ou fragmentos do mesmo e inibidores de quinase como uma preparação combinada para uso simultâneo, separado ou seqüencial em terapia de tumor. Exemplos de inibidores de quinase que podem ser vantajosamente usados na presente invenção são análogo de estaurosporina K252A (Calbiochem-Novabiochem Intl.; 36); PHA-665752 (3Z)-5-[(2,6-dicloro-benzil)-sulfonil]-3-[(3,5-dimetil-4-[(2R)-2-(pirrolidin-1-il-metil)-pirrolidin-1-il]-carbonil}-1H-pirrol-2-il)-metileno]-1,3-di-hidro-2H-indol-2-ona (34); SU11274 [(3Z)-N-(3-cloro-fenil)-3-({3,5-dimetil-4-[(4-metil-piperazin-1-il)-carbonil]-1H-pirrol-2-il)-

metileno)-N-metil-2-oxo-indolina-5-sulfonamida] (37, 38, 35); SU11271 [(3Z)-5-(2,3-di-hidro-1H-indol-1-il-sulfonil)-3-({3,5-dimetil-4-[(4-metil-piperazin-1-il)-carbonil]-1H-pirrol-2-il}-metileno)-1,3-di-hidro-2H-indol-2-ona] (38); SU11606 [(3Z)-N-(3-cloro-fenil)-3-{{3,5-dimetil-4-(3-morfolin-4-il-propil)-1H-pirrol-2-il}-metileno}-N-metil-2-oxo-indolina-5-sulfonamida] (38).

Os inventores têm, de fato, observado que o mecanismo inibitório ativado por AntiMET-R não requer atividade de HGFR tirosina quinase. Esta característica representa uma vantagem relevante em um abordagem terapêutica. Em prática clínica, de fato, é freqüente combinar drogas diferentes com o objetivo de melhorar o efeito da molécula alvo. No caso de HGFR, portanto é possível combinar inibidores de quinase com o anticorpo, permitindo a ação contemporânea sobre ambos os níveis e ativação de HGFR. Isto provavelmente intensifica a eficácia terapêutica da terapia alvo em tumores sobre-expressando Met, com o objetivo de interferir com o crescimento de tumor e com a aquisição de um fenótipo metastático.

O anticorpo AntiMET-R e seus fragmentos parte do produto de acordo com a presente invenção são produzidos como especificado acima. Os inibidores de quinase a serem usados nas preparação combinada de acordo com a presente invenção podem ser produzidos por síntese química convencional ou técnicas de engenharia genética.

Em uma outra modalidade, a presente invenção inclui um método para triar compostos capazes de se ligarem em pelo menos uma porção do receptor de domínio extracelular de fator de crescimento de hepatócito, no qual estes compostos possuem uma atividade antagonista versus o Receptor de Fator de Crescimento de Hepatócito e são farmacologicamente ativos na prevenção e/ou no tratamento de tumor e/ou metástases. Em particular, estes compostos são capazes de induzem regulação negativa de Receptor de Fator de Crescimento de Hepatócito ou

separação de pelo menos uma porção do domínio extracelular de Receptor de Fator de Crescimento de Hepatócito.

A presente invenção agora será descrita em relação a algumas modalidades preferidas por meio de exemplos não limitantes.

5 Anticorpos, inibidores e outros reagentes.

AntiMET-R Monoclonal anti-HGFR foi originalmente descrito por Prat (20). Outros anticorpos usados para Imunoprecipitação e análise de western blot são: anticorpos D024 e DL21 anti-HGFR (reconhecedores de domínio extracelular de HGFR descrito em 20); PY20 anti-fosfotirosina (Transduction Laboratories), anti-ubiquitina (Babco), anti-Hsp70 (Stressgen),
 10 anti-fosfo Akt (Ser473, Cell Signaling Technology), anti-Akt (Santa Cruz Biotechnologies) anti-domínio intracelular de HGFR (C12, Santa Cruz Biotechnologies). Colorações imuno-histoquímicas foram realizadas com: anticorpo anti-fosfo-HGFR de humano (Cell Signaling) e anti-CD31 de
 15 camundongo (Pharmingen). Para experimentos in vitro e in vivo anticorpo anti-vírus de estomatite vesicular (VSV-G, Sigma) foi usado como um controle. Lactacistina e concanamicina foram adquiridos de Calbiochem.

Seqüências de aminoácidos e nucleotídeos antiMET-R.

A tradução da seqüência de nucleotídeos de cadeia pesada de
 20 AntiMET-R correspondendo à SEQ ID No.: 1 e figura 21a é relatada em figura 21b e SEQ ID No:6.

As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos correspondentes às regiões CDR estão sublinhadas em Figuras 21a e 21b; suas seqüências de aminoácidos são: CDR-H1: GYTFTSYW (SEQ ID NO.:8); CDR-H2:
 25 INPSSGRT(SEQ ID NO.: 9) ; CDR-H3: ASRGY(SEQ ID NO.: 10) .

A tradução da seqüência de nucleotídeos de cadeia leve de AntiMET-R correspondendo à SEQ ID No.: 2 e figura 22a é relatada em figura 22b e em SEQ ID NO.:7.

As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos correspondendo

às regiões CDR estão sublinhadas em Figuras 22a e 22b; suas seqüências de aminoácidos são: CDR-L1: QSV^YDYDGGSY (SEQ ID NO.:11); CDR-L2: AAS (SEQ ID NO.:12); CDR-L3: QQSYEDPLT (SEQ ID NO.:13).

Transfecção transiente de células 293T para produção de vetores lentivirais.

5 Aproximadamente 24 horas antes da transfecção $6,0 \times 10^6$ células 293T foram semeadas em uma placa de 15 cm. 2 Horas antes da transfecção o meio de cultura foi mudado adicionando 22 mL de IMDM, suplementado com FBS inativado por calor (10%), Penicilina (25U/mL), Estreptomicina (25U/mL) e Glutamina (1%). A mistura de DNA plasmídeo
10 para transfecção foi preparada pela adição de: plasmídeo ENV (VSV-G), 9 µg; plasmídeo PACKAGING pMDLg/pRRE 16,2 µg; plasmídeo REV, 6,25µg; plasmídeo TRANSFER VECTOR #330 ou #331, 37,5µg. A solução de plasmídeo foi completada para um volume final de 1125 µL com 0,1X TE/dH₂O (2:1). 125 µL de CaCl₂ 2,5M foram adicionados e deixados na RT
15 por 5'. Então, agitação na velocidade máxima, 1.250 µL de solução 2X HBS foram adicionados e então imediatamente adicionados em gotas na cultura de células. DNA plasmídeo precipitado por CaPi foi incubado por 14-16 horas, então o meio foi substituído por um fresco adicionado de butirato de sódio 1 mM (18 mL por placa). Sobrenadante de cultura celular, contendo partículas
20 de vetor, foi coletado a 30-36 horas após mudança do meio. Após coleta, os sobrenadantes foram centrifugados a 2.500 RPM por 10', filtrados através de 0,2 µm e armazenados a -80°C.

Infecção de células alvo por sobrenadante de célula contendo vetor lentiviral.

25 10^5 Células foram semeadas com meio de cultura fresco suplementado com 10% de FBS, glutamina. Para infecção as linhagens de célula foram incubadas, na presença de polibreno 8 µg/mL, com sobrenadante contendo partículas de vetor lentiviral como descrito acima na concentração final de partículas de vetor entre 10 e 150 ng /mL de equivalente HIV-1 Gag p24 (medido pelo ensaio ELISA). Após 18 horas o meio foi mudado e as

células foram deixadas crescerem. Quando a cultura foi 80% confluenta, as células foram incubadas com o meio sem soro e após 72 h o sobrenadante contendo AntiMET-R foi coletado.

Ensaio de regulação negativa de HGFR.

5 Células foram mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Tratamentos com os anticorpos e HGF foram realizados em meio livre de soro com 80 µg/mL e 80 ng/mL, respectivamente. Onde indicado, as células foram pré-incubadas por 2 h quer com lactacistina 10 µM quer com concanamicina
10 100 nM, antes da estimulação. Para a análise de degradação de HGFR, as células foram lisadas em tampão LB (SDS 2%, Tris-HCl 0,5 M pH=6,8) e a concentração de proteína em lisados de célula foi avaliada com o Kit de Ensaio de Proteína BCA (Pierce). Então, quantidades iguais de proteínas totais foram analisadas por SDS-PAGE e Western Blotting. Para
15 experimentos de imunossupressão, as células foram lisadas em tampão EB (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, glicerol 10%, Triton X-100 1%) na presença de inibidores e ortovanadato de Na 1 mM. Após imunoprecipitação com os anticorpos apropriados, foram realizadas lavagens de estringência alta. As proteínas imunoprecipitadas foram processadas para
20 Western Blotting de acordo com métodos padrão. Detecção final foi realizada usando o sistema de detecção ECL (Amersham).

Marcação metabólica e análise de separação de HGFR.

Células foram privadas de soro por 16 horas, pulso-marcadas com [³⁵S] metionina e [³⁵S] cisteína (100 µCi/mL, Amersham Corp.) por 30
25 min. em meio DMEM livre de metionina e de cisteína e então tratadas com AntiMET-R ou VSV-G ou HGF por 4 horas. Meios condicionados foram coletados e submetidos à imunoprecipitação com anticorpo extracelular anti-HGFR. Proteínas imunoprecipitadas foram separadas por SDS-PAGE e autorradiografia foi realizada como previamente descrito em (26).

Ensaio biológicos in vitro.

Para avaliação de crescimento independente de ancoragem, GTL16 foram pré-tratadas com AntiMET-R ou VSV-G em meio usado por 48 horas. Então 1.500 células foram semeadas em DMEM 2% FBS mais ágar macio 0,5% (SeaPlaque agarose, BMA) em cada cavidade e mantidas na presença das quantidades indicadas de anticorpos e HGF por 10 dias. Colônias crescidas foram finalmente visualizadas por coloração de tetrazólio (47). O ensaio de invasão foi realizado em câmaras Transwell (Corning). Os filtros de polycarbonato (tamanho de poro de 8 μm) foram revestidos com 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de membrana basal de Matrigel (Collaborative Research). Tratamento com anticorpo foi realizado pré-incubando as células por 24 horas antes de semeadura com AntiMET-R ou VSV-G 20 nM. Então 5×10^4 células foram semeadas sobre o lado superior dos filtros e incubadas em DMEM + 2% FBS com 100 ng/mL de HGF adicionados nas cavidades de fundo das câmaras. Após 48 horas, células sobre o lado superior dos filtros foram mecanicamente removidas. Células migradas para o lado inferior foram fixadas, coradas e contadas. O índice de migração foi obtido pela divisão do número de células migradas sob estimulação de HGF por aquelas migradas sem estimulação.

Marcação in vitro de HGFR com AntiMet-R.

Para análise de citometria de fluxo, 105 células GTL-16 foram soltas com PBS-EDTA 0,025%, lavadas com PBS e incubadas com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticorpo antiMet-R ou a mesma quantidade de Ig de camundongo de controle isótipo por 15' na RT. Após 2 lavagens com PBS, as células foram incubadas com 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Ig de cabra anti-camundongo conjugada com FITC (Jackson Immunoresearch Laboratories) por 15' na RT. Células foram então lavadas, ressuspensas em PBS-5%BSA e analisadas por citometria de fluxo (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Células GTL-16 foram fixadas em metanol : acetona (3:1) por 5' sobre gelo então bloqueadas com soro de cabra 2% em PBS por 30' na RT. AntiMet-R purificado foi

adicionado em uma concentração de 2,5 µg/mL em soro de cabra 2% em PBS e incubadas 1 h na RT, então após 3 semanas com PBS, anticorpo anti-HGFR ligado foi revelado com 4 µg/mL de Ig anti-mouse conjugada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). Análise das amostras foi realizada com microscópio de fluorescência (DM-IRB, Leica Microsystems).

Experimentos in vivo.

Os experimentos in vivo foram realizados pela inoculação subcutânea com 1×10^6 GTL16 ou com $2,5 \times 10^6$ MDA-MB-435β4 para dentro do flanco posterior de camundongos fêmeas nu/nu imunodeficientes de seis semanas de idade em Swiss CD1 background (Charles River Laboratories). Com surgimento de tumor, os camundongos possuindo massas de tamanho comparável foram selecionados e inoculados com I.P. ou I.S. (I.S. apenas, no caso de camundongos injetados com GTL16) duas vezes por semana com as quantidades indicadas de AntiMET-R e anti-VSV-G. Após 8 semanas de tratamento, camundongos foram mortos e o peso de tumor foi calculado. Em camundongos injetados com MDA-MB 435β4 os pulmões foram analisados para a presença de metástase espontânea. Coloração imuno-histoquímica de tumores primários para avaliação de HGFR fosforilado foi realizada sobre seções de tumor embebidas em parafina de 5 µm usando um anticorpo anti-fosfoHGFR (Cell Signaling, 1:100). O número de metástases foi estabelecido por meio de observação microscópica dos pulmões após coloração com hematoxilina/eosina realizada de acordo com o protocolo de Masson-Trichrome (Sigma) para investigação patológica de rotina. Avaliação de vascularização de tumor foi realizada por imuno-histoquímica em amostras embebidas em composto Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek) e imediatamente congeladas a -80°C. Para as colorações imuno-histoquímicas foi usado um anticorpo monoclonal de rato anti-CD31 de camundongo (Pharmingen).

Avaliação de apoptose.

Avaliação morfológica de apoptose foi avaliada de acordo com

os critérios de Kerr. Por causa do número grande de células necróticas individuais e apoptose induzida por isquemia próxima dos focos necróticos, apenas tecido pelo menos 1 HPF (High Power Field [Campo de Potência Alta] = 0,63 mm) longe das áreas de necrose foi considerado confiável para contagem apoptótica. Casos com necrose tumoral massiva não foram avaliados. Todos os casos foram agrupados em uma das duas categorias: mais ou menos do que 10 figuras apoptóticas /10 HPF.

Inibição de proteases

Antes da estimulação com anticorpo as células foram tratadas por 2 horas com os seguintes inibidores: amilorida 4 mM (Sigma) para inibir Uroquinase; 1,10-fenantrolina 5 mM (Sigma) para inibir ADAM e proteases dependentes de Zn; aprotinina 20 µg/mL e leupeptina 100 µg/mL para inibir serina e cisteína proteases, pepstatina A 10 µg/mL para inibir proteases ácidas (Calbiochem). PKC foi inibida pelo tratamento das células com TPA 1µM por 24 horas.

Métodos de triagem

A invenção proporciona ensaios para triagem de compostos de teste que modulam a expressão / função / atividade biológica de HGFR ou induzem separação de domínio extracelular de HGFR na presença ou ausência de HGF ou de outros agonistas de receptor.

Um composto de teste se liga em HGFR preferivelmente interagindo com a porção extracelular de receptor. Mais preferivelmente, um composto de teste diminui a atividade biológica mediada via HGFR por pelo menos cerca de 10, preferivelmente cerca de 50, mais preferivelmente cerca de 75, 90, ou 100% relativo à ausência do composto de teste.

Um outro composto de teste preferivelmente regula expressão de HGFR. Mais preferivelmente, um composto de teste infra-regula proteína ou transcrito de HGFR em pelo menos cerca de 10, preferivelmente cerca de 50, mais preferivelmente cerca de 75, 90, ou 100% relativo à ausência do

composto de teste.

Compostos de teste

Os compostos de teste podem ser agentes farmacológicos, peptídeos ou proteínas já conhecidos na arte ou podem ser compostos previamente desconhecidos em possuírem qualquer atividade farmacêutica. Os compostos de teste podem ser naturalmente ocorrentes ou planejados em laboratório. Podem ser isolados de microorganismos, animais, ou plantas, podem ser produzidos por técnicas recombinantes ou sintetizados por métodos químicos conhecidos na arte. Se desejado, os compostos de teste podem ser obtidos usando qualquer um dos numerosos métodos de biblioteca combinatória conhecidos na arte, incluindo mas não limitados a, bibliotecas biológicas, bibliotecas de fase de solução ou de fase sólida paralela espacialmente localizáveis, métodos de biblioteca sintética requerendo deconvolução, o método de biblioteca “um-glóbulo um-composto”, e métodos de biblioteca sintética usando seleção por cromatografia de afinidade. A abordagem de biblioteca biológica é limitado às bibliotecas de polipeptídeo, enquanto que as outras quatro abordagens são aplicáveis às bibliotecas de compostos de polipeptídeos, de oligômeros de não-peptídeo, ou de moléculas pequenas.

20 Ensaio de ligação

Para os ensaios de ligação, o composto do teste é preferivelmente uma molécula que se liga na porção extracelular de HGFR, onde a citada molécula imita a atividade de AntiMet-R de tal modo que a atividade biológica normal de HGFR é evitada. Exemplos de tais moléculas incluem, mas não são limitados a, moléculas pequenas, peptídeos ou moléculas semelhantes a peptídeo.

Em ensaios de ligação, qualquer composto de teste ou porção extracelular de HGFR pode compreender uma marcação detectável, tal como uma marcação de radioisótopo, fluorescente, quimioluminescente, ou

enzimática (e.g. iodo radiomarcado, fósforo radiomarcado, fluoróforos ou proteínas fluorescentes, luciferase, peroxidase de rábano ou fosfatase alcalina). Detecção de um composto de teste que é ligado no domínio extracelular de HGFR pode ser então realizada, por exemplo, por contagem direta de radioemissão, por contagem de cintilação, ou por determinação de conversão de um substrato apropriado em um produto detectável, onde HGFR ou uma porção de seu domínio extracelular é ligada em um suporte ou expressada por uma célula ou pode ser recuperado de acordo com métodos bem conhecidos por um perito no campo.

10 Ensaaios funcionas

Os compostos de teste podem ser testados para a capacidade de detectar um efeito biológico de HGFR. Tais efeitos biológicos podem ser determinados usando os ensaios funcionais descritos no presente pedido. São referidos como o ensaio de crescimento independente de ancoragem e o ensaio de invasão (ambos descritos em detalhe nos exemplos 2 e 11) e a avaliação do fenótipo transformado in vivo (descrito em detalhe nos exemplos 3, 11, 12). Assim, ensaios funcionais podem ser realizados in vitro, usando qualquer linhagem celular expressando HFGR ou in vivo usando qualquer modelo animal no qual é possível estudar o desenvolvimento de um tumor experimental ou naturalmente ocorrente expressando o HGFR. Um composto de teste que diminui uma atividade biológica de HFGR em pelo menos cerca de 10, preferivelmente de acordo com 50, mais preferivelmente cerca de 75, 90, ou 100% é identificado como um agente farmacológico potencial para diminuir a atividade biológica de HGFR.

25 EXEMPLOS

Exemplo 1. O anticorpo anti-Met AntiMET-R prejudica a transdução de sinal de HGFR.

AntiMET-R é um anticorpo monoclonal direcionado contra o domínio extracelular de receptor HGF onde ele reconhece um epítipo distinto

daquele ligado pelo ligante. Este mAb comporta-se como um agonista parcial, porque não ativa todos os efeitos biológicos gerados pelo fator de crescimento de hepatócito (motilidade, proliferação, sobrevivência de célula, invasão, tubulogênese e angiogênese) mas induz apenas motilidade. Além disso, ele supra-regula a expressão constitutiva de ativador de plasminogênio de tipo uroquinase mas não é capaz de induzir e manter a expressão de receptor de ativador de plasminogênio de tipo uroquinase por períodos de tempo prolongados. Este mAb ativa a fosforilação de receptor, que, sendo estritamente dependente da bivalência de mAb, requer dimerização de receptor.

Para solucionar a questão de se o anticorpos AntiMET-R pode representar uma ferramenta para interferir com a ativação de receptor HGF constitutivo em tumores sobre- expressando, os inventores primeiro analisaram sua atividade bioquímica e biológica em células de tumor cronicamente expostas ao anticorpo. Como um modelo, os inventores usaram células GTL16, derivadas de um carcinoma gástrico de humano, onde HGFR é sobre-expressado e portanto oligomerizado e constitutivamente ativado (27). Figura 1A mostra, uma redução significativa na expressão de HGFR e fosforilação de tirosina.

O efeito do anticorpo sobre transdução de sinal de HGFR foi então avaliado. Visto que é sabido que HGFR promove um programa anti-apoptótico forte pela estimulação de ativação Akt, os inventores avaliaram o nível de fosforilação de Akt sob tratamento com AntiMET-R. Como mostrado em Figura 1B, fosforilação de Akt foi inibida em ambas condições basais e células estimuladas por HGF.

Outra rota importante ativada por HGFR é a rota MAPK, conhecida em estar envolvida na estimulação de crescimento celular. Os inventores checaram o nível de ativação de MAPKs em células tratadas com o anticorpo, mas não observaram inibição significativa desta rota (dados não

mostrados).

Exemplo 2. AntiMET-R inibe o fenótipo transformado de células de câncer in vitro.

O efeito do anticorpo sobre o crescimento celular e sobre o fenótipo transformado foi avaliado pela medição da capacidade das células de crescerem em maneira dependente e independente de ancoragem e de invadirem as matrizes extracelulares. Como mostrado em Figura 2A, não foi observada diferença na capacidade das células de crescerem em condições de dependência de ancoragem sob tratamento com anticorpo.

Crescimento dependente de ancoragem é estritamente dependente da capacidade das células para suplantarem apoptose devido à falta de ancoragem, a denominada “anoikis”; esta propriedade é normalmente analisada pela avaliação da capacidade das células para crescerem em ágar mole (28). Visto que muitos relatórios têm mostrado que ativação de HGFR é capaz de conferir às células esta propriedade, os inventores semearam células GTL16 em ágar 0,5% e mantiveram a cultura na presença ou ausência de quantidades diferentes de AntiMET-R ou de um anticorpo isótipo-combinado irrelevante (VSV-G), como um controle. Como mostrado em Figura 2B, células tratadas e não tratadas com foram capazes de formarem numerosas colônias. De modo oposto, AntiMET-R dramaticamente inibiu o crescimento ancoragem-independente de células de câncer em uma maneira dependente de dose. É interessante notar que as células GTL16 foram capazes de formarem colônias em ensaio de ágar mole até mesmo em condição basal, devido à ativação de HGFR constitutiva, e que o anticorpo reduziu o fenótipo transformado destas células em ambas na presença e na ausência de HGF.

Para avaliar a capacidade do anticorpo para interferir com a invasividade celular, os inventores estudaram MDA-MB-435 β 4, uma linhagem celular de carcinoma mamário que, em resposta ao HGF, é capaz de invadir membranas basais reconstituídas (29). Como mostrado em Figura 2C,

tratamento in vitro destas células com AntiMET-R resultou em uma redução dose-dependente de propriedades invasivas em resposta ao HGF.

Exemplo 3. AntiMET-R inibe o fenótipo transformado in vivo

Para avaliar a atividade de AntiMET-R sobre crescimento de tumor in vivo, os inventores inocularam subcutaneamente células GTL16 no flanco posterior de camundongos fêmeas nu/nu imunodeficientes. Os animais foram tratados duas vezes por semana com AntiMET-R ou VSV-G, administrado in situ (2 µg/g). A terapia iniciou 1 semana após o transplante, com surgimento de tumores no sítio de injeção: apenas animais possuindo tumores de tamanho comparável foram tratados por 4 semanas. Volume de tumor foi monitorado durante todo o tratamento e um crescimento diminuído foi observado em camundongos tratados com AntiMET-R (Figura 3A). Após o tratamento, os camundongos foram autopsiados e os tumores foram excisados e pesados. Como mostrado em Figura 3B, em camundongos tratados com AntiMET-R, tumores foram significativamente menores do que em controles ($p < 0,05$). Nestes tumores o nível de ativação de HGFR, mostrado por coloração com anticorpos específicos contra a forma fosforilada do receptor, foi diminuído (Figura 3C) enquanto que a presença de células apoptóticas foi significativamente aumentada (Figura 3D). Além disso os presentes inventores avaliaram nas seções de tumor após coloração com hematoxilina/eosina figuras mitóticas e apoptóticas. Embora apoptose fosse significativamente aumentada em tecidos de tumor obtidos de camundongos tratados com o AntiMET-R, o número de mitoses foi quase não modificado (dados não mostrados).

Os inventores realizaram o mesmo topo de experimentos também em células MDA-MB-435 β4, um sistema modelo para metástase espontânea in vivo (29). Animais foram tratados duas vezes por semana com doses diferentes de AntiMET-R ou o anticorpo de controle, administrados quer sistemicamente (1 µg/g ou 10 µg/g intraperitonealmente) quer no tumor

(2 µg/g in situ). A terapia iniciou no dia do transplante e foi realizada por oito semanas (o tempo para o potencial metastático ser expressado). Após tratamento, os camundongos foram autopsiados e análise de tumores primários e pulmões (o sítio privilegiado de metástases para estas células) foi realizada. Órgãos diferentes (baço, medula óssea, fígado, coração, osso e rim) também foram examinados para rejeitar efeitos tóxicos potenciais. Análise macroscópica mostrou que o tratamento com AntiMET-R resultou em inibição de crescimento da massa de tumor primário (Figura 4A-E e K). Coloração imuno-histoquímica com anticorpos reconhecendo a forma tirosina-fosforilada de HGFR mostrou, também neste caso, uma redução marcante de ativação de receptor (Figura 4F-J). Além disso, análise microscópica das seções de pulmão revelou que ambas a injeção de tumor intra e a administração sistêmica de AntiMET-R preveniram a o surgimento de metástases distantes no pulmão e nos órgãos inspecionados (Figura 4L).

Visto que muitos trabalhos têm mostrado que HGF é um fator angiogênico potente e que sinalização de HGFR contribui para angiogênese de tumor, os inventores analisaram a vascularização de tumor sob tratamento com AntiMET-R. Nestes tumores os inventores verificaram uma redução significativa do número de vasos (que foram menos e maiores em tamanho) e de suas ramificações (Figura 4 M,N). Os inventores assim concluem que o efeito anti-tumor e anti-metastático observado do tratamento foi devido à ação combinada do anticorpo sobre o tumor e sobre os vasos germinando do microambiente.

Exemplo 4. AntiMET-R induz regulação negativa de HGFR

Para estudar o mecanismo através do qual AntiMET-R é capaz de interferir com ativação de HGFR, os inventores trataram células sobre-expressando HGFR quer com AntiMET-R quer com VSV-G; este caso parece-se com o que é frequentemente observado em muitos tumores naturalmente ocorridos. Como mostrado em Figura 5A, os inventores

observaram que a quantidade total de HGFR diminuiu, em uma maneira dependente de tempo, sob tratamento com AntiMET-R mas não com VSV-G. Isto sugere que o anticorpo anti-Met especificamente induziu regulação negativa de receptor. É interessante sublinhar que nestas células, sobre-
 5 expressando HGFR, HGF, o ligante, foi incapaz de induzir regulação negativa de receptor (Figura 6, painel inferior).

Os inventores então verificaram se o anticorpo AntiMET-R poderia disparar regulação negativa de receptor também em células expressando níveis normais de HGFR. Como mostrado em figura 5B, painel
 10 esquerdo, também nestas células, AntiMET-R eficientemente infra-regulou HGFR.

Redução anticorpo-induzida de HGFR exposto na membrana celular também foi avaliada por análise FACS. A análise citofluorimétrica mostrou que o tratamento com anticorpo reduziu a quantidade de HGFR
 15 expressado na superfície celular com eficiência maior do que a do próprio HGF (Figura 5B, painel direito). Uma redução similar, no mesmo ensaio, também foi observado em células GTL16 (não mostrado) .

Exemplo 5. Mecanismo molecular de regulação negativa de HGFR induzida por AntiMET-R

20 Regulagem negativa independente de anticorpo e dependente de ligante pode seguir rotas diferentes. Regulagem negativa de RTKs dependente de ligante é um processo de múltiplas etapas incluindo internalização, ubiquitinilação, classificação endossomal e finalmente degradação lisossomal ou proteassomal (30).

25 Para avaliar qual rota de degradação está envolvida em intra-regulação de HGFR induzida por anticorpo, os inventores bloquearam a atividade quer de lisossomo quer de proteassomo com os inibidores específicos concanamicina e lactacistina, respectivamente, antes da estimulação com anticorpo. Surpreendentemente, embora inibição da rota

proteassomal severamente prejudicou a degradação de HGFR induzida por ligante, não afetou regulação negativa de receptor devido ao tratamento com AntiMET-R (Figura 6A, painel superior), assim indicando que o anticorpo e o ligante promovem regulação negativa de HGFR através de mecanismos moleculares diferentes. Além disso, quando a atividade do proteassomo foi enfraquecida, um fragmento de 60 Kd, dificilmente detectável em condição basal, foi pesadamente acumulado em células sob tratamento com anticorpo (Figura 6A, painel inferior). Este fragmento foi detectável sobre Western blots apenas com um anticorpo anti-HGFR intracelular e consistiu no domínio citoplásmico do receptor. Além disso, como esperado para moléculas postas sob degradação proteassomal, o fragmento de 60 Kd foi etiquetado com grupos ubiquitina (Figura 6B).

Como o domínio extracelular (Ectodomain) do receptor não foi detectável em lisados de célula sob tratamento com AntiMET-R, os inventores verificaram se ele foi liberado para fora das células sob clivagem, um fenômeno conhecido como “separação” (31). Para testar esta hipótese os inventores olharam para a presença do ectodomínio HGFR em meio de cultura de célula. Células foram metabolicamente marcadas com ³⁵S-Cisteína e ³⁵S-Metionina radioativas e então tratadas com HGF ou AntiMET-R por 4 horas. Meios foram coletados e submetidos à imunoprecipitação com um anticorpo anti-HGFR reconhecendo o domínio extracelular. Como mostrado em Figura 7A, do meio de cultura de células metabolicamente marcadas, os inventores imunoprecipitaram uma banda correndo sob condições não-redutoras com um MW aparente de 130 Kd (correspondendo ao complexo das cadeias- $\alpha\beta$ extracelulares); quando o gel foi corrido sob condições redutoras, o complexo foi resolvido nas duas bandas de 80Kd (cadeia- β) e 45Kd (cadeia- α). Embora estimulação de HGF não intensificou este processo, separação de receptor foi dramaticamente aumentada sob ligação de anticorpo. De acordo com dados prévios (15), uma quantidade pequena de ectodomínio de HGFR, é

conhecidamente constitutivamente liberada no ambiente extracelular. É interessante sublinhar que separação de ectodomínio induzida por anticorpo também foi observada em células expressando níveis normais de HGFR, tais como células endoteliais (Fig. 7B).

5 Pelo tratamento das células com quantidade crescente de anticorpo por 4 horas os inventores observaram que separação de HGFR mediada por anticorpo foi dependente de dose (Figura 7C). Para analisar a cinética de separação de HGFR induzida por anticorpo, os inventores estimularam as células com a mesma quantidade de AntiMET-R ou VSV-G
10 por tempos diferentes. Níveis crescentes do ectodomínio foram detectados no meio de células tratadas com AntiMET-R - mas não com VSV-G, mostrando que a separação induzida por anticorpo foi específica e dependente de tempo (Figura 7D) .

Exemplo 6. Separação de HGFR induzida por anticorpo ocorre na superfície
15 da célula

Para testar se endocitose é requerida para separação de HGFR os inventores utilizaram uma linhagem celular estavelmente transfectadas com uma forma mutante de Dynamin (Dyn K44A), que conhecidamente prejudica a endocitose dependente de clatrina e cuja expressão está sob o
20 controle de um sistema regulado por tetraciclina. Células foram mantidas por 48 horas quer na presença (Ctr) quer na ausência (K44A Dyn) de tetraciclina com o objetivo de enfraquecer a endocitose como uma consequência da expressão de mutante Dynamin. Como mostrado em Figura 7D, separação induzida por anticorpo não foi enfraquecida em células nas quais foi inibida
25 endocitose dependente de clatrina.

As proteases mais comumente envolvidas na separação de proteínas de membrana pertencem às α -secretases da família ADAM. Em uma tentativa para identificar a enzima responsável pela separação de HGFR, o agente quelante de Zn, 1,10-fenantrolina, um inibidor de ADAMS e das

proteases dependentes de Zn, foi adicionado nas células antes do tratamento com anticorpo. Nesta condição, a separação de receptor não foi afetada (dados não mostrados), mostrando que a clivagem proteolítica de ectodomínio de HGFR não é mediada por α -secretase mas por uma protease independente de Zn.

Visto que é sabido que HGFR transcricionalmente regula genes envolvidos em coagulação de mancha, os inventores também checaram se uma protease do sistema de coagulação poderia ser responsável pela separação de ectodomínio. Contudo, o papel dos fatores pró-coagulantes neste processo foi rejeitado porque sua inibição com aprotinina não alterou a separação de ectodomínio de HGFR induzida por anticorpo (dados não mostrados). Usando um painel de outros inibidores (amilorida, pepstatina A, leupeptina) os inventores também excluíram o envolvimento de outras hidrolases conhecidas, tais como Uroquinase, proteases ácidas, serina e cisteína proteases (dados não mostrados). Além disso, os inventores também provaram que separação do ectodomínio é independente da ativação de PKCa, porque inibição desta enzima com dose alta (1 μ M) e tratamento prolongado (24 horas) com o forbol éster TPA, não diminuiu a separação de ectodomínio (dados não mostrados).

Este conjunto de experimentos, todos realizados com os controles positivos apropriados, indica que a enzima responsável pela separação de ectodomínio de HGFR está fora da lista das proteases obviamente envolvidas em separação de receptor.

Exemplo 7. Ativação de HGFR não é requerida para separação induzida por anticorpo.

Como os inventores previamente relataram, um complexo trimérico contendo Endofilina, CIN85 e Cbl medeia regulação negativa de HGFR dependente de ligante (32). Este complexo é recrutado para o receptor sob ativação de HGFR e promove endocitose, ubiquitinação e degradação de

receptor. Com o objetivo de verificar se ativação de receptor e transdução de sinal são requeridos para separação e infra-modulação induzidas por anticorpo, os inventores estimularam a capacidade de AntiMET-R para infra-regular vários mutantes de HGFR. Os inventores expressaram em células COS-7 quer HGFR de tipo selvagem quer qualquer um dos seguintes mutantes: i) MET KD, codificador de um receptor “morto” destituído de atividade de tirosina quinase, devido a uma substituição de Lys-Ala na cavidade de ligação de ATP, ii) MET “duplo”, codificador de um HGFR faltante de tirosinas Y1349, Y1356 ancorando os transdutores de sinal, iii) MET-GFP, um mutante negativo dominante onde a seqüência codificadora de domínio intracelular inteiro do receptor foi substituída por seqüências GFP. Quarenta e oito horas após transfecção, células foram tratadas com AntiMET-R por 3 horas. Extratos celulares e meios extracelulares foram analisados por Western blot. Inesperadamente, AntiMET-R foi capaz de disparar regulação negativa e de induzir separação de HGFR em todos os mutantes (Figura 8). Este experimento sugere que regulação negativa de receptor de HGF induzida por anticorpo não requer atividade de quinase, nem o recrutamento de transdutores citoplásmicos, e que o domínio intracelular inteiro é dispensável para o processo. Isto adicionalmente confirma que o anticorpo e o ligante ativam mecanismos infra-regulatórios diferentes.

Exemplo 8. O ectodomínio separado de HGFR comporta-se como uma “isca”

Visto que tem sido mostrado que um domínio extracelular geneticamente engenheirado do HGFR pode efetivamente funcionar como molécula “isca” negativa dominante (33), os inventores testaram a capacidade do ectodomínio separado na inibição de sinalização de HGFR. Células pré-tratadas opor 72 h com AntiMET-R ou VSV-G foram estimuladas por tempos diferentes com HGF quer na presença (Figura 9, pistas 4-6) quer na ausência (pistas 7-9) de ectodomínio de HGFR no meio de cultura. Como mostrado, na presença de ectodomínio de HGFR, fosforilação de Akt ativada por HGF foi

fortemente enfraquecida, confirmando assim a idéia de que o fragmento separado, como a isca (33), atua como ambos um competidor pela ligação de HGF como uma molécula negativa dominante interferindo com ativação de HGFR.

5 Exemplo 9. O anticorpo agonista AntiMET-R DO-24 não induz separação de ectodomínio.

A capacidade agonista deste anticorpo não é suficiente - per se - para justificar sua atividade terapêutica. De fato, um anticorpo monoclonal antiMET-R diferente (DO-24) que temos examinado não promove separação
10 da porção extracelular do receptor mas é capaz de totalmente ativar o receptor.

Exemplo 10. Produção de AntiMET-R por meio de transferência de gene via vetor lentiviral.

Os inventores inseriram seqüências de cadeias pesada e leve de
15 AntiMET-R em um vetor lentiviral bidirecional (51) (Fig. 10A, 15 e 16). Este vetor lentiviral permite a expressão coordenada de dois cDNAs separados graças à presença de um promotor sintético (ACCTGGGT, SEQ ID No.:4) obtido juntando um promotor de núcleo mínimo (promotor minCMV) a montante e em orientação oposta ao promotor hPGK (51). Este promotor
20 sintético é capaz de conduzir a atividade de transcrição em ambas as direções. Assim posicionamento de dois cDNAs codificadores de AntiMET-R, um a montante em orientação de anti-senso (a cadeia leve) e o outro a jusante em orientação de senso (a cadeia pesada), é possível gerar coordenadamente dois mRNAs independentes. Os inventores produziram partículas de vetor com
25 transfecção transiente de células 293T como descrito. Então, para modificação permanente do genoma de células alvo, os inventores infectaram um a painel de linhagens de células derivadas de carcinoma com sobrenadante contendo partículas de vetor. Após infecção, as células foram privadas do meio sem soro e incubadas por 72 horas para coletar os sobrenadantes de

cultura de célula. A presença de anticorpo AntiMET-R foi avaliada pela análise de Western Blot (Fig. 10B) e a quantificação de AntiMET-R foi feita por ELISA (Fig. 10C). Todas as linhagens de células transduzidas produziram o anticorpo AntiMET-R que foi corretamente secretado no sobrenadante de cultura. A produção do anticorpo foi variável, dentro da faixa de 0,2-6 µg/mL, dependendo da linhagem de célula analisada. A especificidade de AntiMET-R recombinante foi controlada pelo ensaio de imunoprecipitação (Fig. 11A), enquanto que a afinidade de ligação foi avaliada pelo ensaio ELISA (Fig. 11B). AntiMET-R recombinante foi capaz de especificamente reconhecer o receptor de Met com uma afinidade dentro da mesma faixa de uma obtida pelo AntiMET-R convencionalmente produzido pelo hibridoma. Além disso, o AntiMET-R recombinante, como o AntiMET-R produzido pelo hibridoma, foi capaz de induzir a clivagem proteolítica de Met e separação do Domínio ExtraCelular (Fig. 12).

Exemplo 11. Transdução com vetor lentiviral codificador de AntiMET-R inibe o fenótipo transformado de células de câncer in vitro e in vivo.

Os inventores transduziram células HCT-116 com vetor lentiviral codificador de AntiMET-R (25 ng p24/mL). Células transduzidas foram testadas, em comparação com células de tipo selvagem, para seu fenótipo transformado, analisando propriedades de invasão e crescimento independente de ancoragem em tumorigênese in vitro e in vivo. Para crescimento independente de ancoragem, os inventores semearam células produtoras de antiMET-R e células de tipo selvagem como controle em ágar 0,5% e as colônias obtidas após 15 dias de cultura foram contadas. Células transduzidas foram inibidas em sua capacidade de crescimento independente de ancoragem visto que crescem para um número reduzido de colônias, são menores em tamanho comparadas com as colônias geradas com células de tipo selvagem (Fig. 13A). Para testar invasividade celular, os inventores analisaram a capacidade das células para invadirem membrana basal

reconstituída. Como mostrado em Fig. 13B células transduzidas mostraram uma redução de suas propriedades invasivas. Os inventores também testaram a tumorigênese in vivo das células transduzidas com vetor lentiviral codificador de AntiMET-R injetando-as sub-cútis dentro do flanco de camundongos nus atímicos. Dados mostrados em Fig. 13 C e D indicaram que as células transduzidas foram enfraquecidas em suas propriedades de tumorigênese in vivo porque latência de tumor e crescimento de tumor foram inibidas em comparação com células de tipo selvagem.

Exemplo 12 : Administração de intra-tumor direta de vetor lentiviral codificador de AntiMET-R inibe crescimento de tumor.

Para se ter prova formal da eficácia de transferência de gene AntiMET-R, os inventores administraram partículas de vetor lentiviral trazendo cDNAs codificadores de anticorpo diretamente em tumores pré-formados por injeção sub-cútis de células HCT-116 no flanco de camundongos nus. Tumores tratados como vetores codificadores de AntiMET-R mostraram velocidade de crescimento mais lenta em comparação com os tumores tratados com vetor de controle (Fig. 14).

Exemplo 13: Sítio de ligação de AntiMET-R em ectodomínio de Met.

Para mapear o epítipo reconhecido por AntiMET-R, experimentos de imunoprecipitação foram realizados usando domínios extracelulares diferentes do Receptor de Fator de Crescimento de Hepatócito (também conhecido como ectodomínio Met) (Fig. 17).

-Isca Met (aminoácidos 1-932): é uma proteína recombinante solúvel correspondendo à região extracelular inteira de Met de humano truncada antes do domínio de transmembrana (Michieli et al. 2004);

-SEMA PSI (aminoácidos 1-562): é uma forma truncada de Isca Met contendo o domínio SEMA (aminoácidos 1-515) (Stamos et al, 2004; Gherardi et al. 2004) e a região PSI (aminoácidos 516-562) (Kozlov et al. 2004).

-PSI IPT (aminoácidos 1-24; 516-932): é uma forma truncada de Isca Met contendo a seqüência líder endógena (aminoácidos 1-24) fusionada na região PSI (aminoácidos 516-562) e os quatro domínios IPT (aminoácidos 563-932) (Bork et al, 1999; Gherardi et al., 2004).

5 Uma etiqueta poli-histidina e etiqueta de epítipo-Myc foram adicionadas na terminação-C de cada molécula.

Seqüência de Isca Met foi derivada da seqüência codificada com o Número de Acesso do Gene Bank de X54559 (Giordano et al., 1991); esta seqüência corresponde ao transcrito maior do gene Met de humano que
10 codifica uma proteína tirosina quinase que é corretamente processada e está localizada na membrana.

Outros relatórios referem-se à seqüência codificada com o Número de Acesso do Gene Bank de J02958 (Park et al., 1987); esta numeração corresponde a um transcrito menor alternativamente editorado
15 contendo uma inserção de 54pb em posição do nucleotídeo 2264 ao nucleotídeo 2318. Este transcrito codifica uma proteína tirosina quinase que não é corretamente processada e não está localizada na membrana (Rodriguez et al., 1991). De acordo com esta seqüência, a região extracelular de Met corresponde aos aminoácidos 1-950 e o terceiro domínio IPT (IPT3) contém
20 uma inserção de 18 aminoácidos.

Tabela 1 sumariza as posições dos domínios diferentes de Met de acordo com as seqüências X54559 e J02958.

Tabela 1.

Ectodomínios MET	Gene Bank X54559 (aa-aa)	Gene Bank J02958 (aa-aa)
Isca Met	1-932	1-950
SEMA PSI	1-562	1-562
PSI	1-24; 516-932	1-24; 516-950
IPT 1	563-656	563-656
IPT 2	657-741	657-741
IPT 3	742-838	742-856
IPT 4	839-932	857-950

Os cDNAs para as moléculas engenheiradas foram

subclonados no vetor lentiviral pRRL.sin.PPT.CMV.Wpre (Follenzi et al., 2000); partículas lentivirais recombinantes foram produzidas em grande escala e usadas para transduzir linhagens de célula de tumor de humano (Michieli et al., 2004).

5 Meios condicionados de células MDA-MB-435 transduzidas com Isca Met myc-etiquetada, SEMA PSI e PSI IPT foram imunoprecipitadas com o anticorpo AntiMET-R e detectadas por Western blot usando um anticorpo biotinilado anti-myc (Fig. 18, painel direito). Quantidades iguais de meios condicionados foram carregadas como um controle para a expressão de
10 proteína (fig. 18, painel esquerdo), no qual o controle é um meio condicionado de células MDA-MB-435 transduzidas com um vetor lentiviral vazio. Como mostrado no painel direito de Figura 18, AntiMET-R é capaz de imunoprecipitar Isca Met e PSI-IPT mas não SEMAPSI. Portanto, reconheceu um epítipo na região IPT.

15 Para mapear com mais detalhe o epítipo reconhecido pelo anticorpo AntiMET-R experimentos de imunoprecipitação foram realizados usando domínios IPT individuais (Bork et al., 1999). Cada IPT é uma forma truncada de PSI-IPT contendo a sequência líder endógena (aminoácidos 1-24) fusionada em IPT 1 (aminoácidos 563-656) ou IPT 2 (aminoácidos 657-741)
20 ou IPT 3 (aminoácidos 742-838) ou IPT 4 (aminoácidos 839-932).

 Uma etiqueta de poli-histidina e etiqueta de Flag-epítipo foram adicionadas na terminação-C de cada molécula. Os cDNAs para as moléculas engenheiradas foram subclonados no mesmo vetor lentiviral como previamente relatado e partículas lentivirais recombinantes foram usadas para
25 transduzir linhagens de célula de tumor.

 Todas estas proteínas recombinantes são fatores solúveis, mas IPT 2 não é secretado para o meio condicionado das células transduzidas. Por este motivo os experimentos de imunoprecipitação foram realizados em lisados de célula.

Lisados celulares de células MDA-MB-435 transduzidas com IPTs individuais etiquetados com indicador foram imunoprecipitados com o anticorpo AntiMET-R e detectados por Western blot usando um anticorpo anti-indicador (Fig. 19, painel esquerdo); quantidades similares de Western blot usando o mesmo anticorpo anti-indicador, como um controle para expressão de proteína (Fig. 19, painel direito).

Como mostrado no painel esquerdo, AntiMET-R é capaz de imunoprecipitar IPT 4, mas nenhum dos outros três domínios IPT. AntiMET-R reconhece um epítipo contido no domínio IPT 4 da região extracelular MET.

Exemplo 14: AntiMET-R reconheceu o HGFR em células intactas por análise FACS ou análise de imunofluorescência.

Células GTL-16, uma linhagem de célula de carcinoma gástrico de humano, foram incubadas com o anticorpo AntiMET-R. Perfil de GTL-16 analisado por citometria de fluxo revelou que o antiMET-R foi capaz de especificamente corar células expressando o HGFR. De fato a média da intensidade de fluorescência em células marcadas com o anticorpo antiMet-R foi aumentada com respeito às células ctrl (Fig. 20, painel A). Células GTL-16 também foram incubadas, após fixação, com o anticorpo antiMet-R para realizar uma análise de imunofluorescência. A coloração revelou uma marcação específica sobre as superfícies celulares correspondendo ao receptor Met (Fig. 20, painéis B,C).

Naturalmente, embora o princípio da invenção permaneça o mesmo, os detalhes de construção e as modalidades podem amplamente variar com respeito ao que tem sido descrito e ilustrado puramente por meio de exemplo, sem se desviarem do escopo da presente invenção como definido nas reivindicações anexadas.

BIBLIOGRAFIA

1. Hudson, P. J. (1999) *Curr. Opin. Immunol.* 11, 548-557.
2. Hudson, P. J. & Souriau, C. (2003) *Nat. Med.* 9, 129-134.
3. Gschwind, A., Fischer, O. M. & Ullrich, A. (2004) *Nat. Rev.*
5 *Cancer* 4, 361-370.
4. Cragg, M. S., French, R. R. & Glennie, M. J. (1999) *Curr. Opin. Immunol.* 11, 541-547.
5. Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H. P. & Novotny, W. (2004) *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 391-400.
6. Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J., Kussie, P. & Ferguson, K. M. (2005) *Cancer Cell* 7, 301-311.
7. Hynes, N. E. & Lane, H. A. (2005) *Nat. Rev. Cancer* 5, 341-354.
8. Trusolino, L. & Comoglio, P. M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2,
15 289-300.
9. Schmidt, L., Duh, F. M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S. W., Zhuang, Z., Lubensky, I., Dean, M. et al. (1997) *Nat. Genet.* 16, 68-73.
10. Kim, I. J., Park, J. H., Kang, H. C., Shin, Y., Lim, S. B., Ku, J. L., Yang, H. K., Lee, K. U. & Park, J. G. (2003) *J. Med. Genet.* 40,
20 e97.
11. Di Renzo, M. F., Olivero, M., Giacomini, A., Porte, H., Chastre, E., Mirossay, L., Nordlinger, B., Bretti, S., Bottardi, S., Giordano, S. et al. (1995) *Clin. Cancer Res.* 1, 147-154.
12. Corso, S., Comoglio, P. M. & Giordano, S. (2005) *Trends Mol. Med.* 11, 284-292.
13. Comoglio, P. M. & Trusolino, L. (2002) *J. Clin. Invest* 109, 857-862.
14. Maulik, G., Shrikhande, A., Kijima, T., Ma, P. C.,

- Morrison, P. T. & Salgia, R. (2002) *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 41-59.
15. Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E. & Vande Woude, G. F. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915-925.
16. Kong-Beltran, M., Stamos, J. & Wickramasinghe, D. (2004) *Cancer Cell* 6, 75-84.
17. Ivan, M., Bond, J. A., Prat, M., Comoglio, P. M. & Wynford-Thomas, D. (1997) *Oncogene* 14, 2417-2423.
18. Gambarotta, G., Boccaccio, C., Giordano, S., Ando, M., Stella, M. C. & Comoglio, P. M. (1996) *Oncogene* 13, 1911-1917.
19. Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzone, M., Giordano, S. & Comoglio, P. M. (2003) *Cancer Cell* 3, 347-361.
20. Prat, M., Crepaldi, T., Pennacchietti, S., Bussolino, F. & Comoglio, P. M. (1998) *J. Cell Sci.* 111 (Pt 2), 237-247.
21. Giordano S, Maffe A, Williams TA, Artigiani S, Gual P, Bardelli A, Basilico C. Michieli, P., Comoglio PM. (2000), *FASEB J.*, 2, 399-406.
22. Boccaccio C., Ando' M., Comoglio PM., (2002) *FASEB J.*, 1, 120-2.
23. Folkman, J. (1971) *N. Engl. J. Med.* 285, 1182-1186.
24. Bussolino, F., Di Renzo, M. F., Ziche, M., Bocchietto, E., Olivero, M., Naldini, L., Gaudino, G., Tamagnone, L., Coffey, A. & Comoglio, P. M. (1992) *J. Cell Biol.* 119, 629-641.
25. Clark M. (2000) *Imm. Today* 21 397-402.
26. Prat, M., Crepaldi, T., Gandino, L., Giordano, S., Longati, P. & Comoglio, P. (1991) *Mol. Cell Biol.* 11, 5954-5962.
27. Giordano, S., Ponzetto, C., Di Renzo, M. F., Cooper, C. S. & Comoglio, P. M. (1989) *Nature* 339, 155-156.
28. Frisch, S. M. & Francis, H. (1994) *J. Cell Biol.* 124, 619-626.

29. Trusolino, L., Bertotti, A. & Comoglio, P. M. (2001) *Cell* 107, 643-654.
30. Di Fiore, P. P. & De Camilli, P. (2001) *Cell* 106, 1-4
31. Arribas, J. & Borroto, A. (2002) *Chem. Rev.* 102, 4627-
5 4638.
32. Petrelli, A., Gilestro, G. F., Lanzardo, S., Comoglio, P. M.,
Migone, N. & Giordano, S. (2002) *Nature* 416, 187-190.
33. Michieli, P., Mazzone, M., Basilico, C., Cavassa, S.,
Sottile, A., Naldini, L. & Comoglio, P. M. (2004) *Cancer Cell* 6, 61-73.
- 10 34. Christensen JG, Schreck R, Burrows J, Kuruganti P, Chan
E, Le P, Chen J, Wang X, Ruslim L, Blake R, Lipson KE, Ramphal J, Do S,
Cui JJ, Cherrington JM, Mendel DB. (2003) *Cancer Res.* Nov 1; 63 (21)
:7345-55.
35. Berthou S, Aebersold DM, Schmidt LS, Stroka D, Heigl C,
15 Streit B, Stalder D, Gruber G, Liang C, Howlett AR, Candinas D, Greiner
RH, Lipson KE, Zimmer Y. (2004) *Oncogene* Jul 8;23(31):5387-93.
36. Morotti A, Mila S, Accornero P, Tagliabue E, Ponzetto C.
(2002) *Oncogene* Jul 25;21(32):4885-93.
37. Sattler M, Pride YB, Ma P, Gramlich JL, Chu SC, Quinnan
20 LA, Shirazian S, Liang C, Podar K, Christensen JG, Salgia R. (2003) *Cancer*
Res. Sep 1; 63 (17) :5462-9.
38. Wang X, Le P, Liang C, Chan J, Kiewlich D, Miller T,
Harris D, Sun L, Rice A, Vasile S, Blake RA, Howlett AR, Patel N,
McMahon G, Lipson KE. (2003) *Mol Cancer Ther.* Nov; 2 (11) :1085-92.
- 25 39. Stamos J, Lazarus RA, Yao X, Kirchhofer D, Wiesmann
C, (2004) *EMBO J*; 23:2325-2335.
40. Gherardi E, Love CA, Esnouf RM, Jones EY, (2004) *Curr.*
Opin. Struct. Biol., 14: 669-678.
41. Kozlov G, Perreault A, Schrag JD, Park M, Cygler M,

Gehring K, Ekiel I, (2004) *Biochem Biophys Res Commun.*; 321 (1) :234-40.

42. Bork P, Doerks T, Springer TA, Snel B, (1999) *Trends Biochem Sci.*; 24(7):261-3.

43. Giordano S, Ponzetto C, Comoglio PM, (1991) *J. Biol. Chem.*; 266:19558-19564.

44. Park M, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda MA, Vande Woude G, (1987) *PNAS*; 84:6379-6383.

45. Rodrigues GA, Naujokas MA, Prak M, (1991) *Mol. Cell Biol.*; 11:2962-2970.

46. Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S, Geuna M, Naldini L, (2000) *Nat. Genet.*; 25:217-222.

47. Schaeffer W.I., and Friend K (1976) *Cancer Lett.* ; 1: 259-262.

48. Sengupta, Gherardi E, Sellers LA, Wood JM, Sasisekharan R, Fan TP (2003). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:69-75

49. Worden B, Yang XP, Lee TL, Bagain L, Yeh NT, Cohen JG, Van Waes C, Chen Z. (2005) *Cancer Res.*; 65:7071-80.

50. Zhang YW, Su Y, Volpert OV, Vande Woude GF. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 100:12718-23.

51. Amendola M, Venneri MA, Biffi A, Vigna E, Naldini L. (2005) *Nature Biotech.* 23: 108-116.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Università degli Studi di Torino

<120> Anticorpo monoclonal Anti-Met, fragmentos e vetores do mesmo para o tratamento de tumores e produtos correspondentes

<130> BW08034-CF

<150> EP06101345.5

<151> 2006-02-06

<160> 13

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 1386

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Cadeia pesada de AntiMET-R

<400> 1

```

atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgg ccactcccag      60
gtccaactgc agcagcctgg gactgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagctgtcc      120
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagt tactggatac actgggtgaa gcagaggcct      180
ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctagca gcggtcgtac taactacaac      240
gagaaattca agaacaaggc cacagtgact gtagacaaat cttccaccac agcctacatg      300
caactcagca acctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag taggggctac      360
tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacagcccc atcgggtctat      420
ccactggccc ctgtgtgtgg aaatacaact ggctcctcgg tgactctagg atgcctggtc      480
aagggttatt tccctgagcc agtgaccttg acctggaact ctggatccct gtccagtggc      540
gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct gacctctaca cctcagcag ctcaagtact      600
gtaacctcga gcacctggcc cagccagtcc atcacctgca atgtggccca cccggcaagc      660
agcaccaagg tggacaagaa aattgagccc agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca      720
tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttgggt ggaccatccg tcttcatctt ccctccaaag      780
atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc cccatagtca catgtgtggc ggtggatgtg      840
agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca      900
gctcagacac aaacctatag agaggattac aacagtactc tccgggtggc cagtgccttc      960
cccatccagc accaggactg gatgagtggc aaggagtcca aatgcaaggt caacaacaaa     1020
gacctcccag cgcccatcga gagaaccatc tcaaaacca aagggtcagt aagagctcca     1080
caggtatatg tcttgctctc accagaagaa gagatgacta agaaacaggt cactctgacc     1140
tgcattggtc cagacttcat gcctgaagac atttacgtgg agtggaccaa caacgggaaa     1200
acagagctaa actacaagaa cactgaacca gtcctggact ctgatgggtc ttacttcatg     1260
tacagcaagc tgagagtggg aaagaagaac tgggtggaaa gaaatagcta ctctgttca     1320
gtggtccacg aggggtctgc caatcaccac acgactaaga gcttctcccg gactccgggt     1380
aatga                                             1386

```

<210> 2

<211> 717

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Cadeia leve de AntiMET-R

<400> 2

atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt	60
gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggga gagggccacc	120
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg gtagttatat gagttggttc	180
caacagagac caggacagcc acccaaactc ctcatctctg ctgcatcaa tctagaatct	240
gggatcccag ccaggtttag tggcagtggc tctgggacag acttcaccct caatatccat	300
cctgtggagg aggaggatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagttatga ggatccgctc	360
acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc	420
atcttccac catccagtga gcagttaaca tctggaggtg cctcagtcgt gtgcttcttg	480
aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtgaaga ttgatggcag tgaacgacaa	540
aatggcgctc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc	600
agcaccctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc	660
actcacaaga catctacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttag	717

<210> 3

<211> 1473

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Cadeia pesada de Anti-MET-R com uma sequência tag para 3'

<400> 3

atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgg ccactcccag	60
gtccaactgc agcagcctgg gactgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagctgtcc	120
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagt tactggatac actgggtgaa gcagaggcct	180
ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctagca gcggtcgtac taactacaac	240
gagaaattca agaacaaggc cacagtgact gtagacaaat cttccaccac agcctacatg	300
caactcagca acctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag taggggctac	360
tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacagcccc atcgggtctat	420
ccactggccc ctgtgtgtgg aaatacaact ggctcctcgg tgactctagg atgcctggtc	480
aagggttatt tccctgagcc agtgacctg acctggaact ctggatccct gtccagtggc	540
gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct gacctctaca ccctcagcag ctcaagtact	600
gtaacctcga gcacctggcc cagccagtcc atcacctgca atgtggccca cccggcaagc	660
agcaccaagg tggacaagaa aattgagccc agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca	720
tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttggtt ggaccatccg tcttcatctt cctccaaaag	780
atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc cccatagtca catgtgtggt ggtggatgtg	840
agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca	900
gctcagacac aaacctatag agaggattac aacagtactc tccgggtggt cagtgcctc	960
cccatccagc accaggactg gatgagtggc aaggagtcca aatgcaaggt caacaacaaa	1020
gacctcccag cgcccatcga gagaaccatc tcaaaacca aagggtcagt aagagctcca	1080

caggtatatg tcttgccctcc accagaagaa gagatgacta agaaacaggt cactctgacc 1140
 tgcattggtca cagacttcat gcctgaagac atttacgtgg agtggaccaa caacgggaaa 1200
 acagagctaa actacaagaa cactgaacca gtcctggact ctgatgggttc ttacttcatg 1260
 tacagcaagc tgagagtgga aaagaagaac tgggtggaaa gaaatagcta ctctgttca 1320
 gtggtccacg aggggtctgca caatcaccac acgactaaga gcttctcccg gactccgggt 1380
 aaagctagct ctgactacaa ggacgacgat gacaagagcg attacaaaga cgatgatgat 1440
 aagctgcagc atcaccacca tcatcaccat tga 1473

<210> 4

<211> 9

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> promoter sintético - a montante

<400> 4

acctgggtt

9

<210> 5

<211> 13

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> promoter sintético - a jusante

<400> 5

attggttggt tgg

13

<210> 6

<211> 461

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Cadeia pesada de AntiMET-R

<400> 6

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp
 1 5 10 15
 Gly His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Asn Lys Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr
 85 90 95

Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Asn	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val			
			100					105					110					
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Arg	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr			
		115					120					125						
Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Ala	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro			
		130					135					140						
Val	Cys	Gly	Asn	Thr	Thr	Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val			
145					150					155					160			
Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Leu	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser			
			165						170					175				
Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu			
		180						185					190					
Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser			
		195						200					205					
Gln	Ser	Ile	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val			
		210					215					220						
Asp	Lys	Lys	Ile	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro			
225					230					235					240			
Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile			
			245						250					255				
Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile			
		260						265					270					
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln			
		275						280					285					
Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln			
		290					295					300						
Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu			
305					310					315					320			
Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys			
			325						330					335				
Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys			
		340						345					350					
Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro			
		355						360					365					
Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr			
		370					375					380						
Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys			
385					390					395					400			
Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly			
			405						410					415				
Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val			
		420						425						430				

Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn
 435 440 445
 His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 450 455 460
 <210> 7
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cadeia leve de AntiMET-R
 <400> 7
 Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30
 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 Val Asp Tyr Asp Gly Gly Ser Tyr Met Ser Trp Phe Gln Gln Arg Pro
 50 55 60
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 130 135 140
 Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
 165 170 175
 Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
 180 185 190
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
 195 200 205
 Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
 210 215 220
 Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235
 <210> 8

<211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cadeia pesada de AntiMET-R - CDR-H1
 <400> 8
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
 1 5
 <210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cadeia pesada de AntiMET-R - CDR-H2
 <400> 9
 Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr
 1 5
 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cadeia pesada de Anti-MET-R - CDR-H3
 <400> 10
 Ala Ser Arg Gly Tyr
 1 5
 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cadeia leve de AntiMET-R - CDR-L1
 <400> 11
 Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Gly Ser Tyr
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cadeia leve de AntiMET-R - CDR-L2
 <400> 12

Ala Ala Ser

1

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Cadeia leve de AntiMET-R - CDR-L3

<400> 13

Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Leu Thr

1

5

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um anticorpo monoclonal, um fragmento e/ou anticorpo geneticamente engenheirado ou humanizado, i) citado anticorpo monoclonal sendo anticorpo monoclonal anti-Met, ii) citado fragmento sendo
5 fragmento contendo a região de ligação de epítipo de um anticorpo monoclonal anti-Met e/ou iii) citado anticorpo sendo anticorpo geneticamente engenheirado ou humanizado contendo a região de ligação de epítipo de um anticorpo monoclonal anti-Met, caracterizado pelo fato de ser para a produção de um medicamento para o tratamento de tumor e/ou metástases em um
10 paciente sofrendo de tumor, em que o citado anticorpo é produzido pela linhagem de célula de hibridoma ICLC PD 05006.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os citado anticorpo, citado fragmento e/ou citado anticorpo geneticamente engenheirado estão na forma de proteína solúvel.

15 3. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o citado anticorpo e/ou citado anticorpo geneticamente engenheirado são produzidos por um método selecionado do grupo consistindo de técnica recombinante de DNA, síntese em fase sólida, síntese em fase líquida.

20 4. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o citado fragmento é selecionado do grupo consistindo de Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, scFv, e um peptídeo contendo a região de ligação de epítipo.

25 5. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o citado fragmento é produzido por um método selecionado do grupo consistindo de clivagem proteolítica de citado anticorpo, técnica recombinante de DNA, síntese em fase sólida, síntese em fase líquida.

6. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o citado medicamento é administrado por injeção ou por infusão.

7. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo

fato de que o citado tumor é selecionado de tumor colorretal, e tumor hepático.

8. Uso de uma seqüência de nucleotídeos codificadora de i) um anticorpo monoclonal anti-Met, ii) um fragmento contendo a região de
 5 ligação de epítipo de um anticorpo monoclonal anti-Met, ou iii) um anticorpo geneticamente modificado ou humanizado contendo a região de ligação de epítipo de um anticorpo monoclonal anti-Met, caracterizado pelo fato de ser para a produção de um medicamento para o tratamento de tumor e/ou metástases em um paciente sofrendo de tumor, em que o citado anticorpo
 10 monoclonal anti-Met é produzido pela linhagem de célula de hibridoma ICLC PD 05006.

9. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a seqüência de nucleotídeos compreende pelo menos:

i) SEQ ID NO.:1 e SEQ ID NO.:2,
 15 ii) uma seqüência de nucleotídeos correspondendo a SEQ ID NO.:1 e SEQ ID NO.:2, na qual uma ou mais substituições conservativas estão presentes, ou

iii) SEQ ID NO.:8 (CDR-H1), SEQ ID NO.:9 (CDR-H2), SEQ ID NO.:10 (CDR-H3), SEQ ID NO.:11 (CDR-L1), SEQ ID NO.:12 (CDR-L2) e SEQ ID NO.:13 (CDR-L3).
 20

10. Uso de um vetor compreendendo pelo menos uma seqüência de nucleotídeos codificadora de i) um anticorpo monoclonal anti-Met, ii) um fragmento contendo pelo menos uma região de ligação de epítipo de um anticorpo monoclonal anti-Met, ou iii) um anticorpo geneticamente
 25 modificado ou humanizado contendo a região de ligação de epítipo de um anticorpo monoclonal anti-Met, em que o anticorpo monoclonal anti-Met é produzido pela linhagem de célula de hibridoma ICLC PD 05006, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para o tratamento de tumor e/ou metástases em um indivíduo sofrendo de tumor.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o citado vetor compreende uma seqüência de nucleotídeos selecionada de:

i) SEQ ID NO.:1 e SEQ ID NO.:2,

5 ii) uma seqüência de nucleotídeos correspondendo a SEQ ID NO.:1 e SEQ ID NO.:2, na qual uma ou mais substituições conservativas estão presentes, ou

10 iii) SEQ ID NO.:8 (CDR-H1), SEQ ID NO.:9 (CDR-H2), SEQ ID NO.:10 (CDR-H3), SEQ ID NO.:11 (CDR-L1), SEQ ID NO.:12 (CDR-L2) e SEQ ID NO.:13 (CDR-L3) .

12. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o citado vetor está na forma de uma partícula.

13. Produto, caracterizado pelo fato de que contém i) um anticorpo monoclonal anti-Met, ii) um fragmento contendo a região de
15 ligação de epítopo e/ou iii) um anticorpo geneticamente modificado ou humanizado contendo a região de ligação de epítopo de um anticorpo monoclonal anti-Met e pelo menos um inibidor de quinase como uma
preparação combinada para uso simultâneo, separado ou seqüencial no tratamento de tumores e/ou metástases, em que o citado o anticorpo
20 monoclonal anti-Met é produzido pela linhagem de célula de hibridoma ICLC PD 05006.

14. Produto de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que os citado anticorpo e/ou citado pelo menos um fragmento do mesmo estão na forma de proteína solúvel.

25 15. Produto de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o citado anticorpo e/ou citado anticorpo geneticamente engenheirado são produzidos por um método selecionado do grupo consistindo de: clivagem proteolítica de citado anticorpo, técnica recombinante de DNA, síntese em fase sólida, síntese em fase líquida.

16. Produto de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que citado fragmento é selecionado do grupo consistindo de Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, scFv, peptídeo contendo pelo menos uma região de ligação de epítopo.

5 17. Produto de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o citado fragmento é produzido por um método selecionado do grupo consistindo de: clivagem proteolítica de citado anticorpo, técnica recombinante de DNA, síntese em fase sólida, síntese em fase líquida.

10 18. Produto de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o citado pelo menos um inibidor de quinase é selecionado do grupo consistindo de K252A análogo de estaurosporina; (3Z)-5-[(2,6-dicloro-benzil)-sulfonil]-3-[(3,5-dimetil-4-[(2R)-2-(pirrolidin-1-il-metil)-pirrolidin-1-il]-carbonil}-1H-pirrol-2-il)-metileno]-1,3-di-hidro-2H-indol-2-ona; [(3Z)-N-(3-cloro-fenil)-3-({3,5-dimetil-4-[(4-metil-piperazin-1-il)-carbonil]-1H-pirrol-2-il}-metileno)-N-metil-2-oxoindolina-5-sulfonamida];[(3Z)-5-(2,3-di-
15 hidro-1H-indol-1-il-sulfonil)-3-({3,5-dimetil-4-[(4-metil-piperazin-1-il)-carbonil]-1H-pirrol-2-il}-metileno)- 1,3-di-hidro-2H-indol-2-ona]; [(3Z)-N-(3-cloro-fenil)-3-{{3,5-dimetil-4-(3-morfolin-4-il-propil)-1H-pirrol-2-il}-metileno}-N-metil-2-oxo-indolina-5-sulfonamida].

20 19. Produto de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o citado produto é administrado por injeção ou por infusão.

20. Método para triar compostos capazes de se ligarem em pelo menos uma porção do receptor de domínio extracelular de fator de crescimento de hepatócito (HGFR), citados compostos possuindo uma
25 atividade antagonista versus o HGFR e sendo farmacologicamente ativos na prevenção e/ou tratamento de tumor e/ou metástases, caracterizado pelo fato de que o citado método compreende o uso de pelo menos uma porção do domínio extracelular de HGFR como alvo para os citados compostos.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado

pelo fato de que os citados compostos são capazes de induzirem regulação negativa de HGFR.

22. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que os citados compostos são capazes de induzirem separação de
5 pelo menos uma porção do domínio extracelular de HGFR.

23. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que os citados compostos são capazes de limitarem proliferação e/ou intensificam apoptose de células neoplásicas pela alteração de sinalização de HGFR.

10 24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 23, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma porção do domínio extracelular de HGFR é selecionada de isca Met, SEMA PSI, PSI IPT, IPT, IPT 1, IPT 2, IPT 3, IPT 4 ou uma combinação dos mesmos.

15 25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma porção do domínio extracelular de HGFR é selecionada de IPT 1, IPT 2, IPT 3, IPT 4 ou uma combinação dos mesmos.

26. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma porção do domínio extracelular de HGFR é IPT 4.

20 27. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 26, caracterizado pelo fato de que compreende:

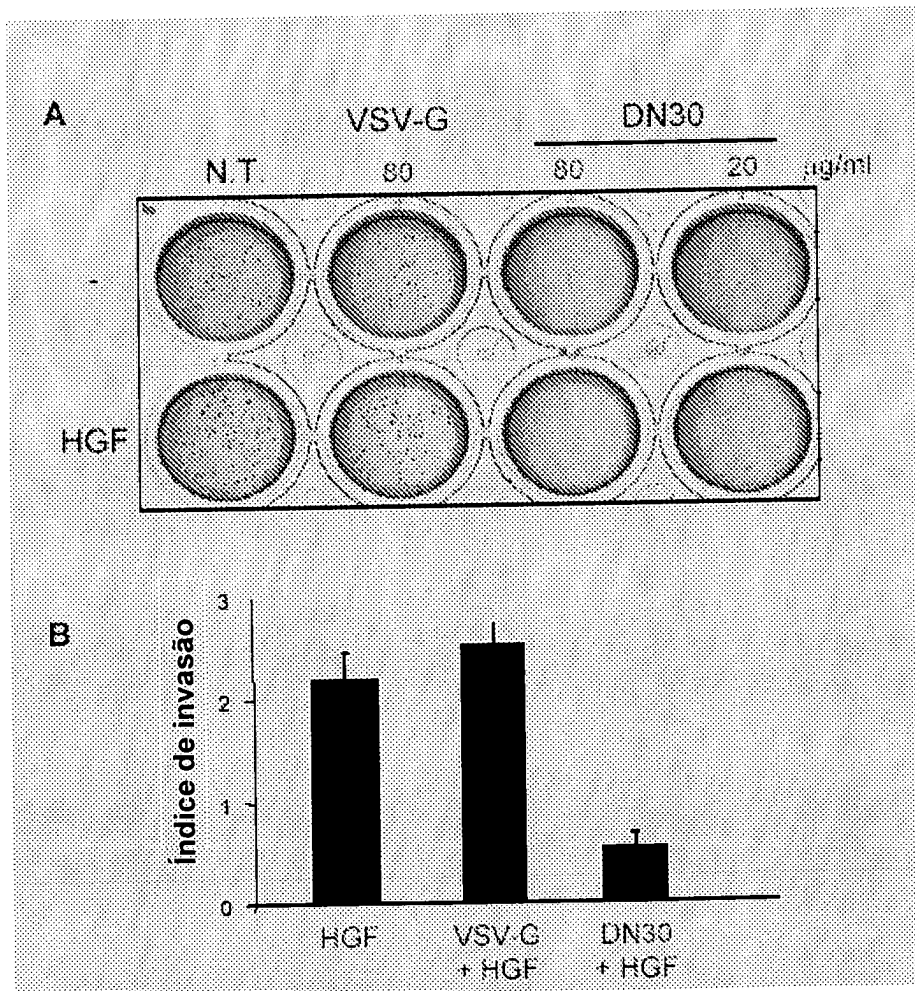
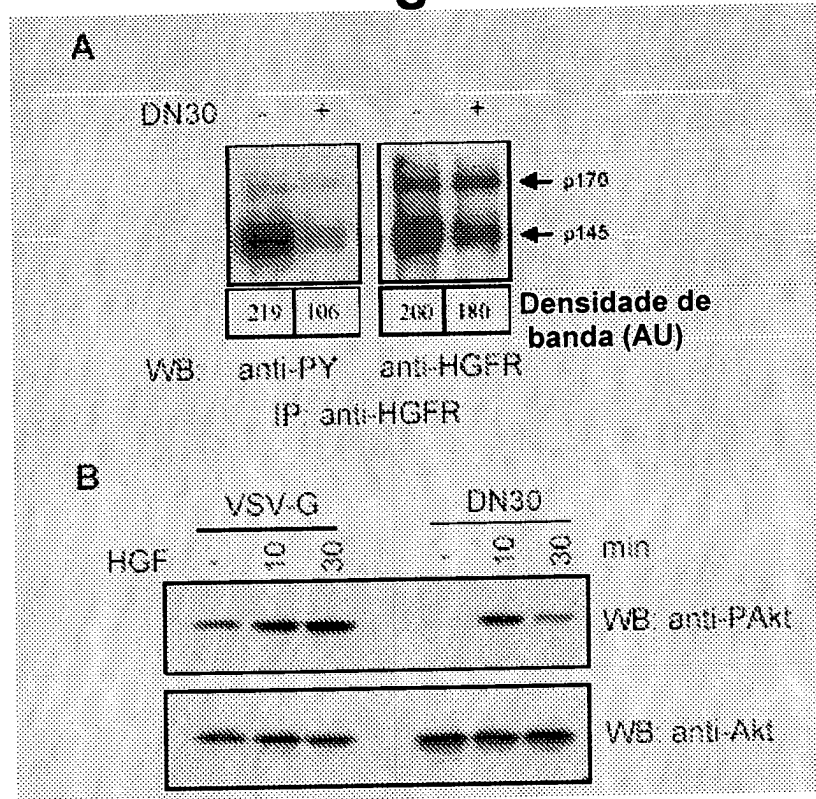
- a) proporcionar uma célula hospedeira contendo um gene que expressa pelo menos uma porção do domínio extracelular de HGFR;
- b) administrar um composto à citada célula;
- 25 c) determinar se o citado composto é capaz de induzir:
 - regulação negativa de HGFR,
 - separação de pelo menos uma porção de domínio extracelular de HGFR, ou
 - alteração de sinalização de HGFR e portanto limitação de

proliferação de células neoplásicas.

28. Uso de um anticorpo monoclonal, um fragmento e/ou anticorpo geneticamente engenheirado ou humanizado, i) citado anticorpo monoclonal sendo anticorpo monoclonal anti-Met, ii) citado fragmento sendo
5 fragmento contendo a região de ligação de epítipo de um anticorpo monoclonal anti-Met e/ou iii) citado anticorpo sendo anticorpo geneticamente modificado ou humanizado contendo a região de ligação de epítipo de um anticorpo monoclonal anti-Met, caracterizado pelo fato de ser para a
manufatura de uma preparação diagnóstica para a detecção de células
10 neoplásicas, em que o citado anticorpo monoclonal anti-Met é produzido pela linhagem de célula de hibridoma ICLC PD 05006.

29. Uso de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que os citados anticorpo monoclonal anti-Met, citado fragmento ou
citado anticorpo geneticamente engenheirado ou humanizado estão
15 conjugados em um marcador.

30. Uso de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o citado marcador é selecionado de: um radioisótopo, uma
molécula fluorescente, um traçador quimiofluorescente ou um indicador
molecular.

Fig. 1**Fig. 2**

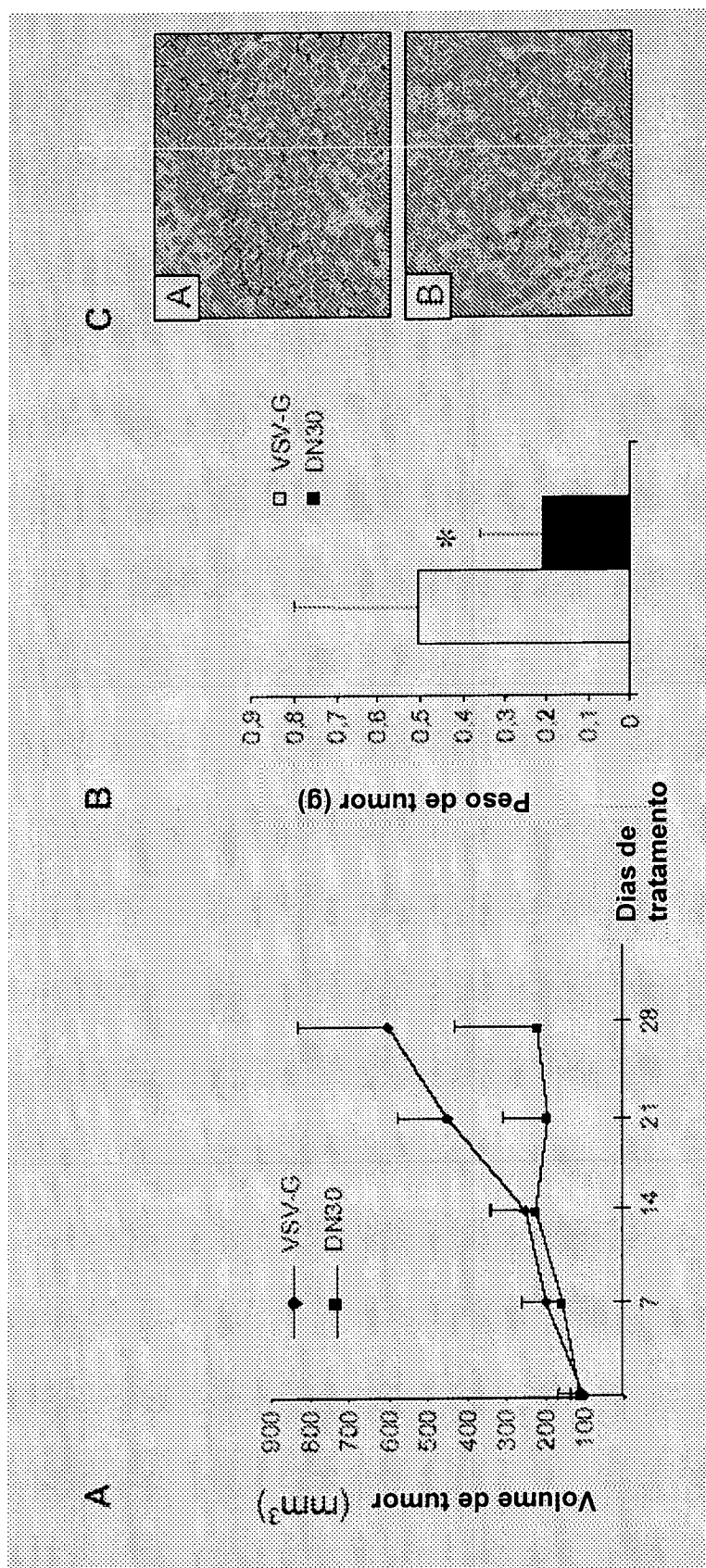


Fig. 3

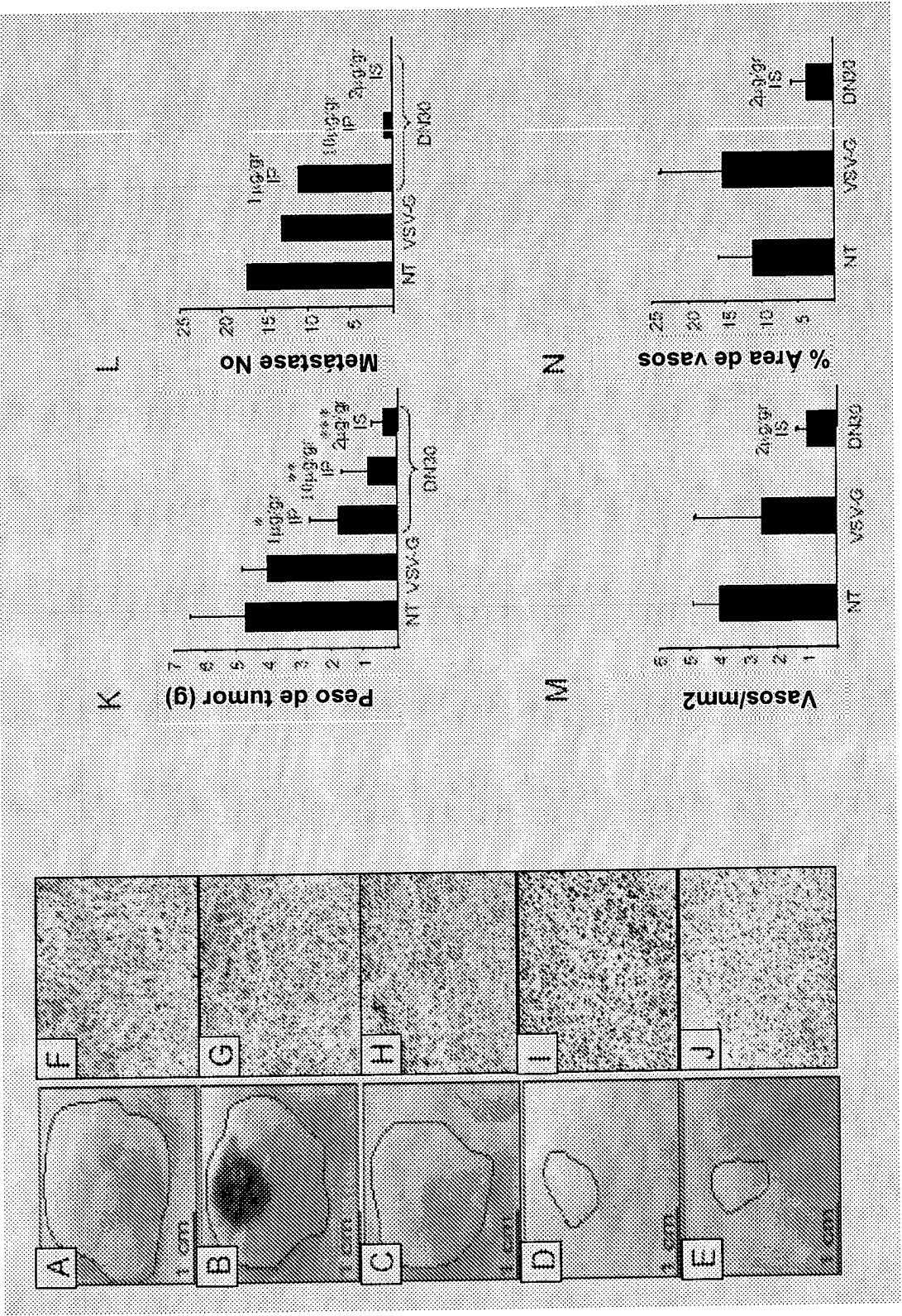


Fig. 4

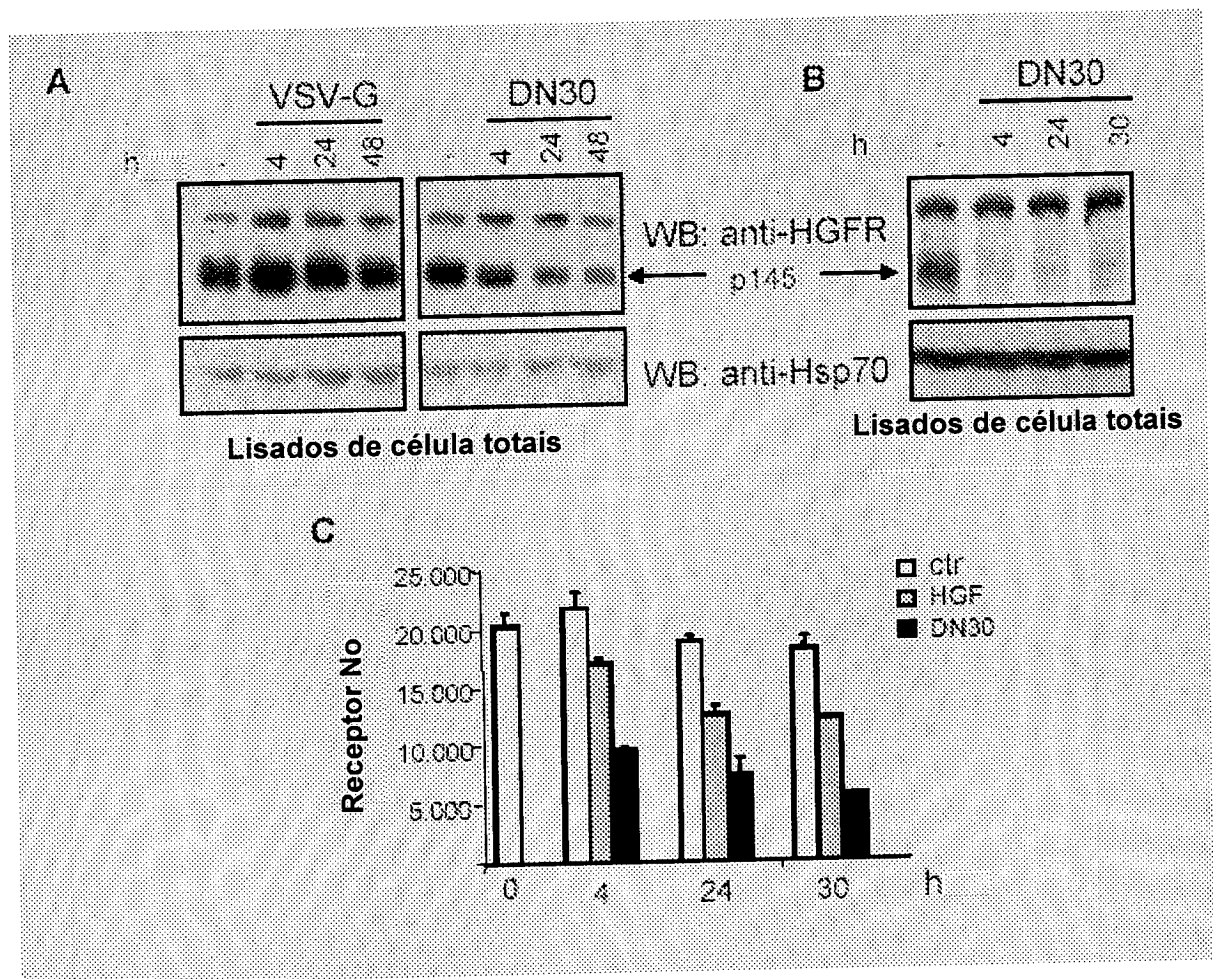
Fig. 5

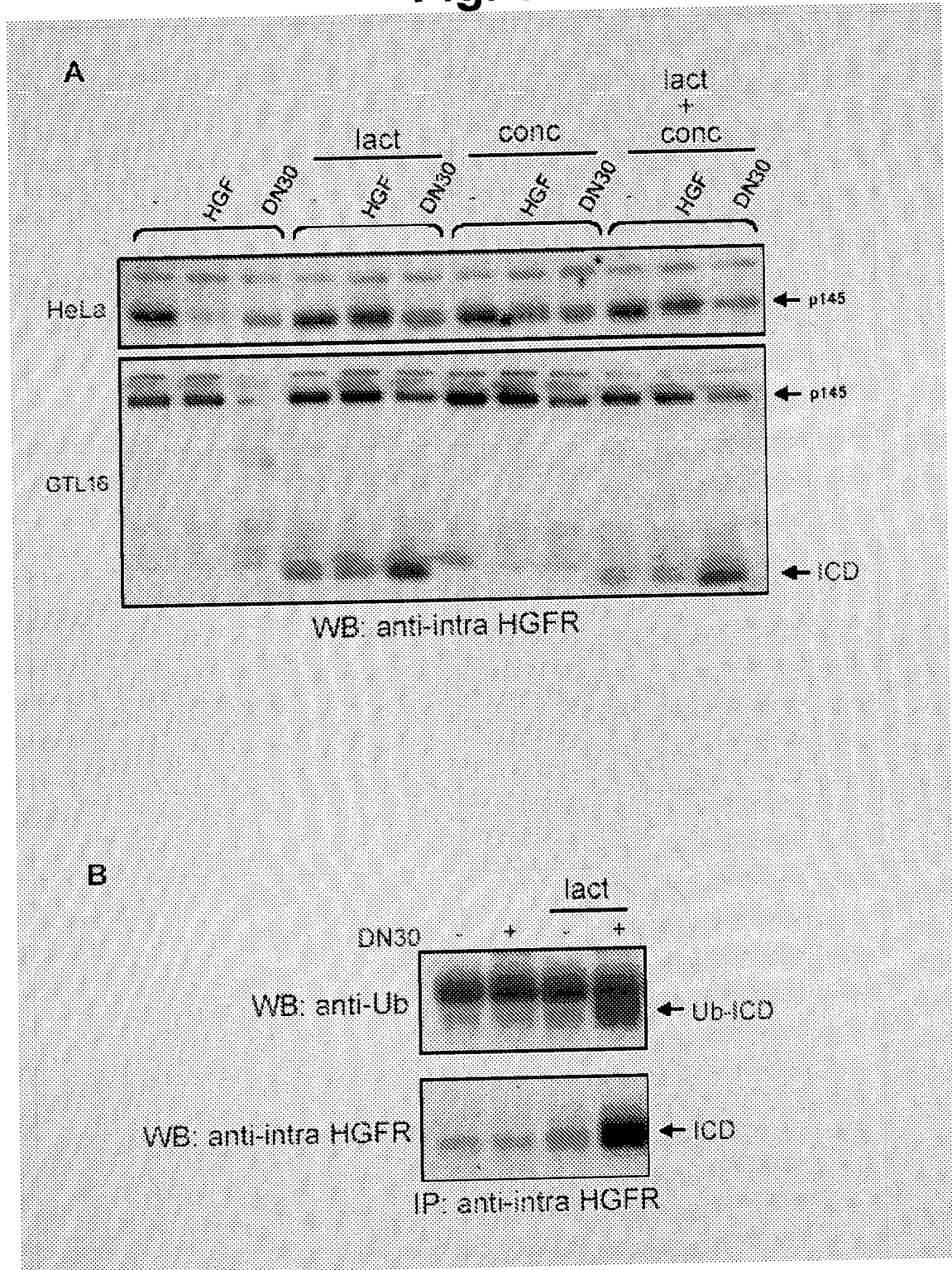
Fig. 6

Fig. 7

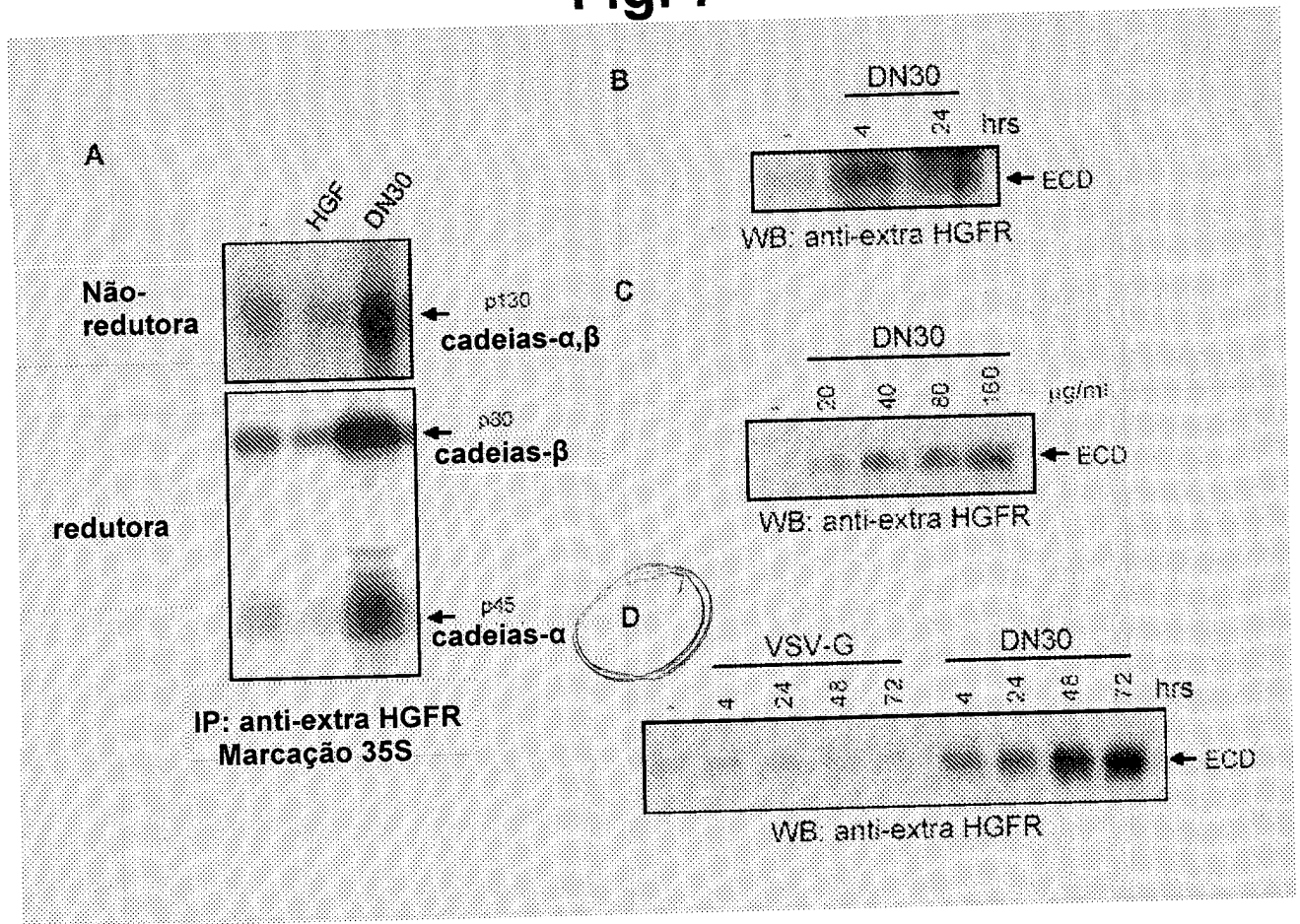
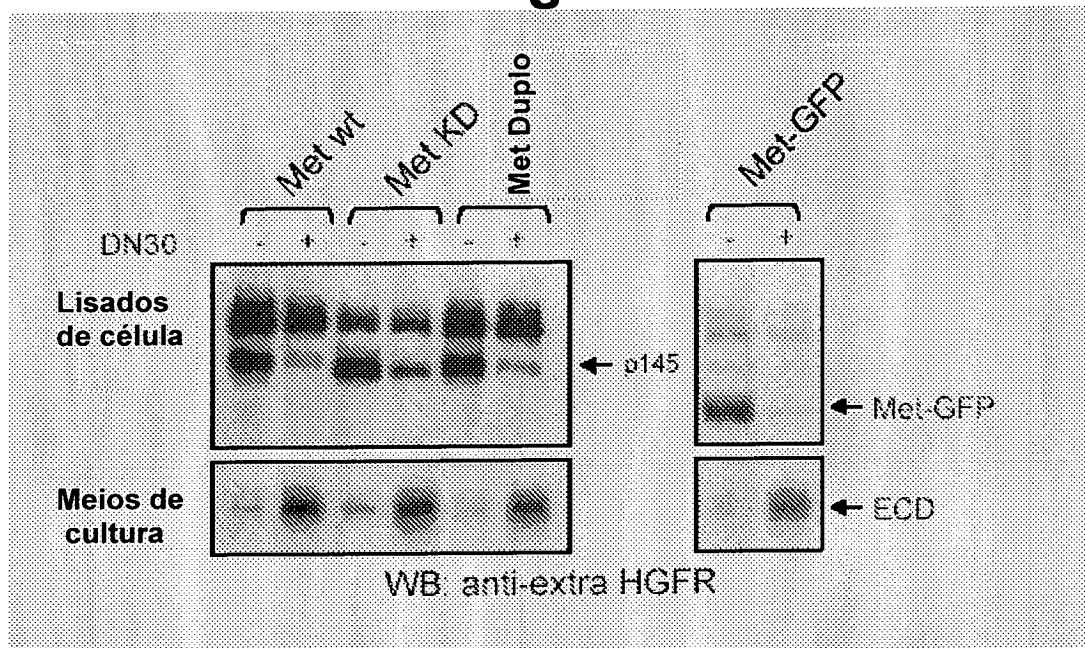
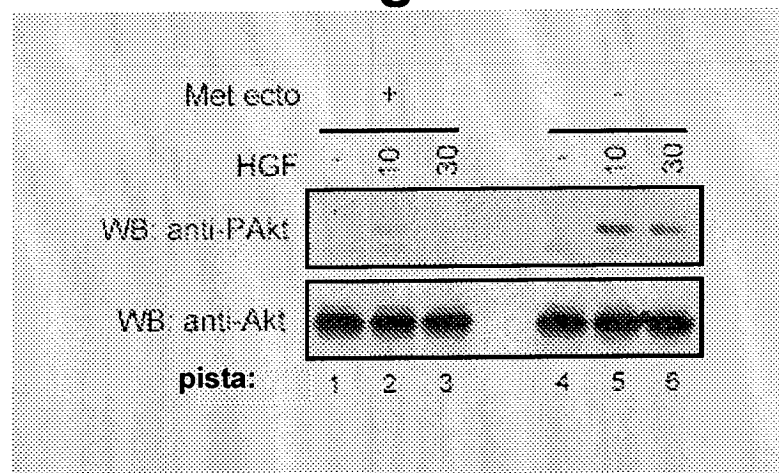


Fig. 8**Fig. 9**

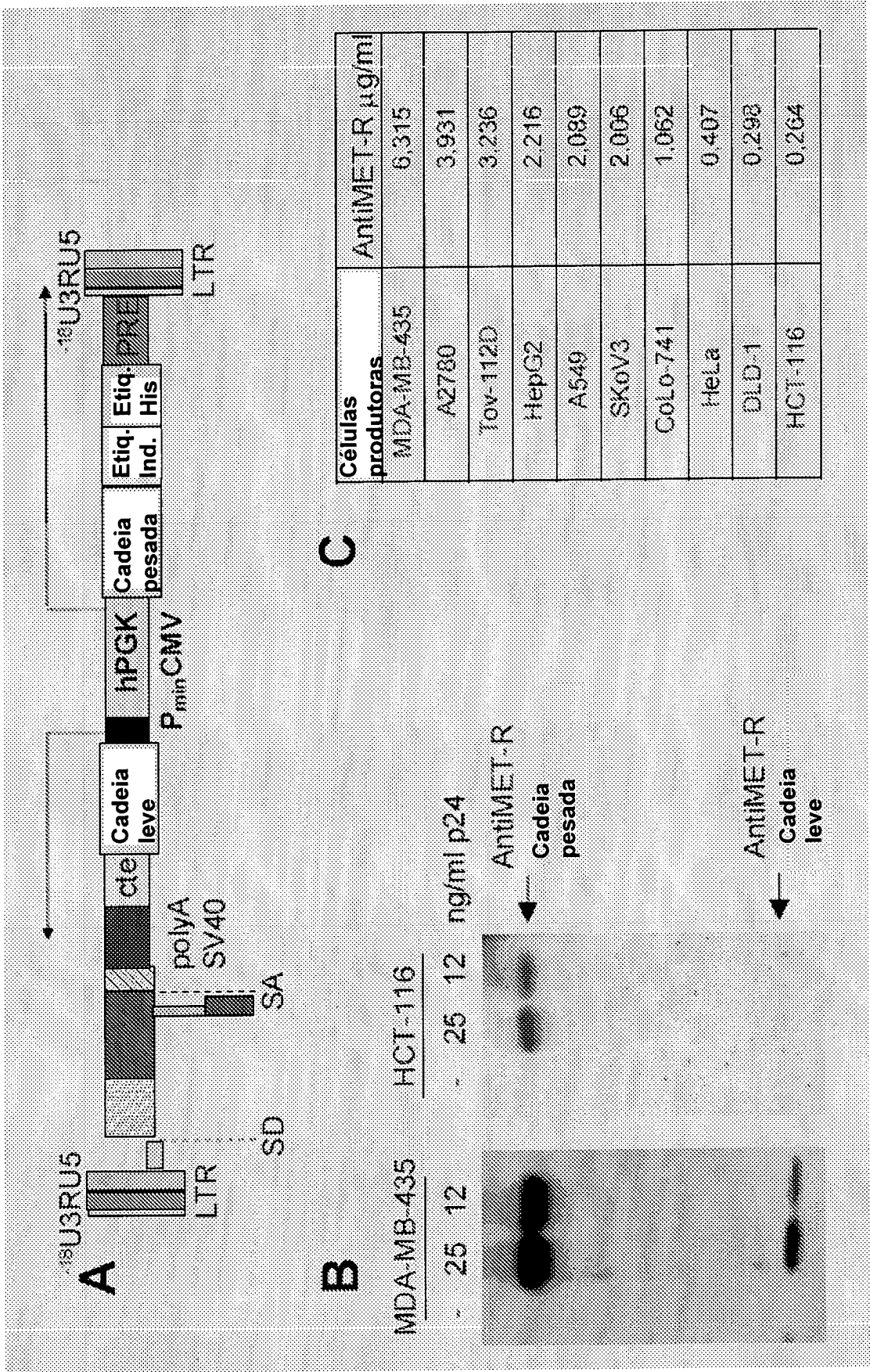


Fig. 10

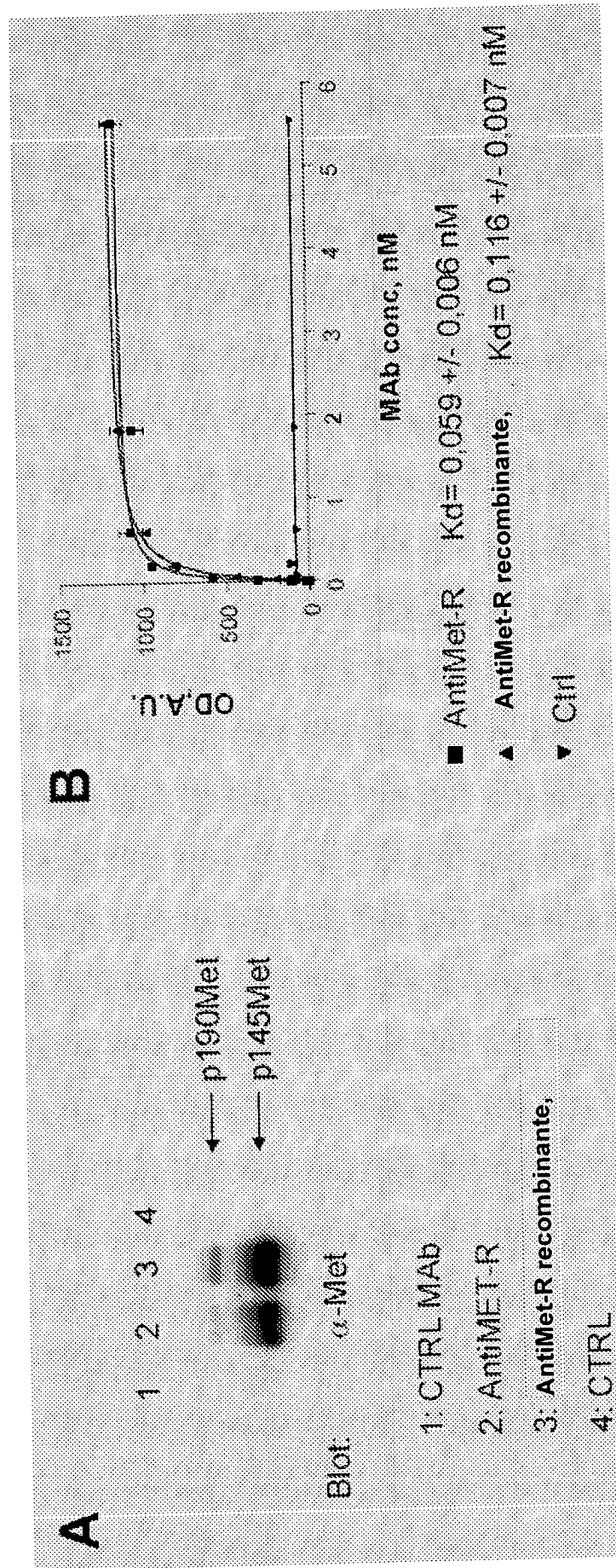


Fig. 11

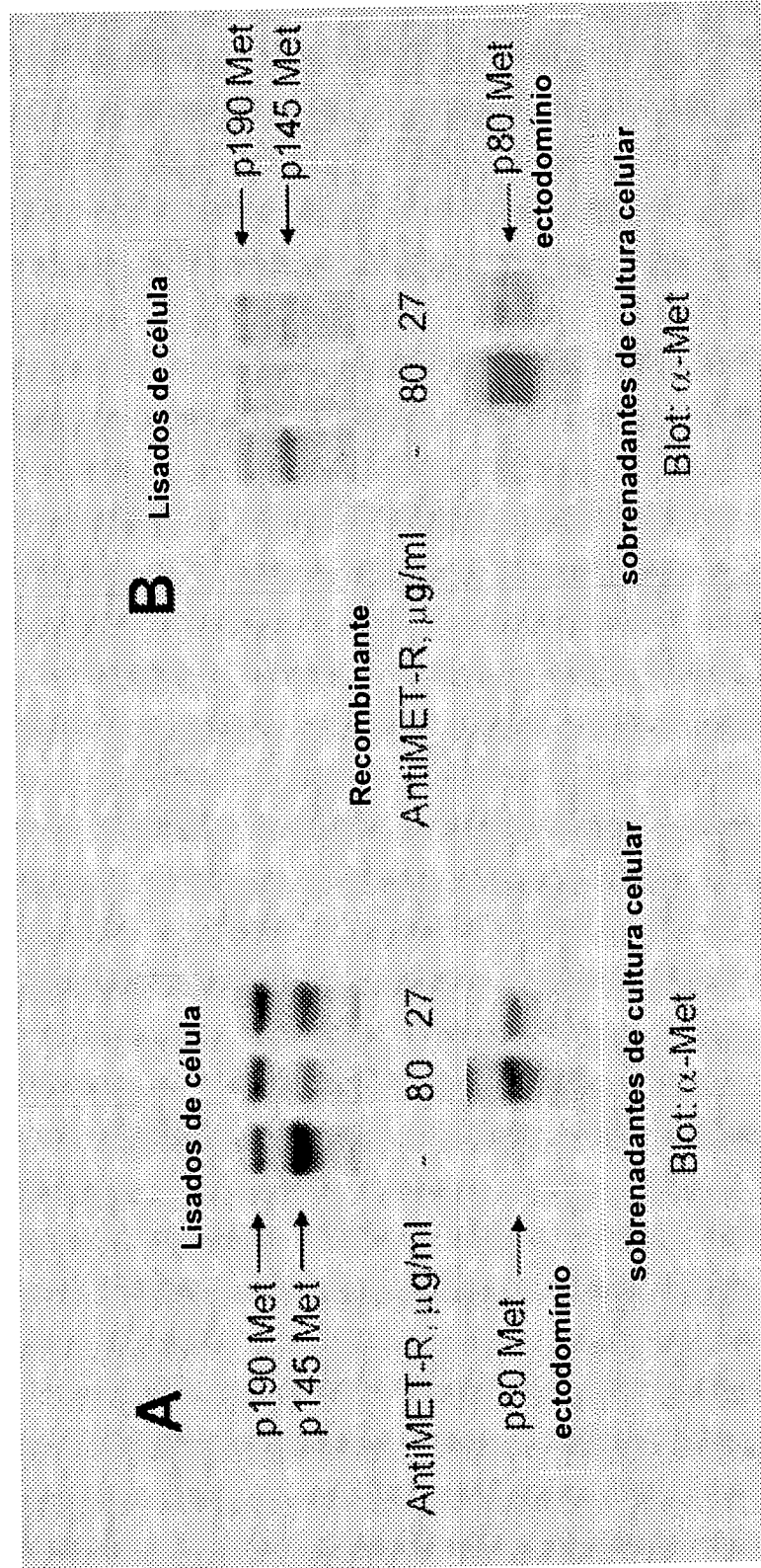
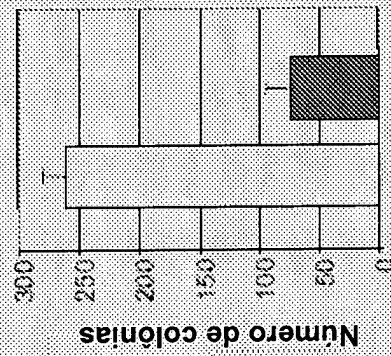
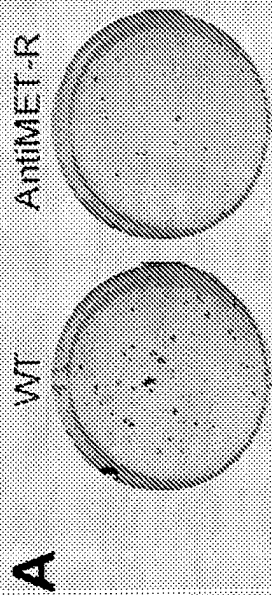


Fig. 12

Fig 13



Tipo de células: WT AntiMET-R

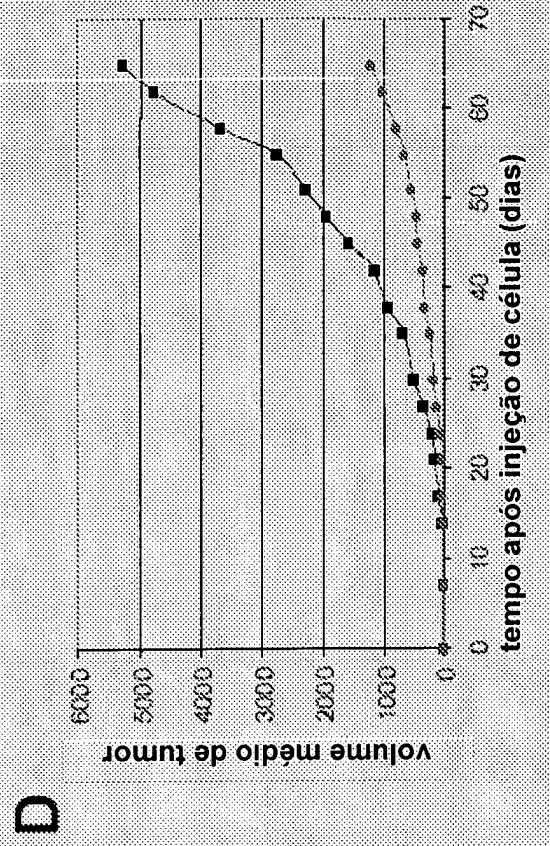
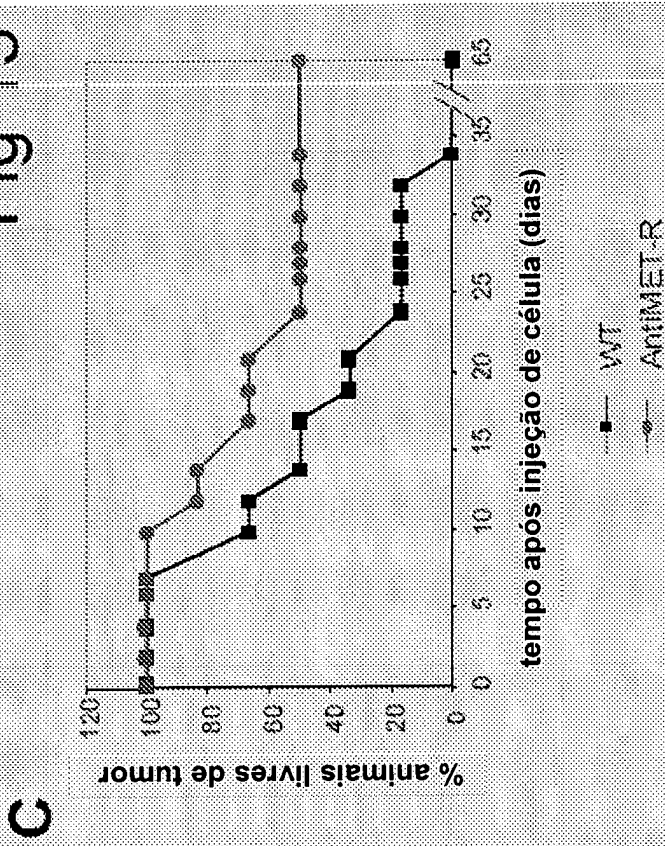
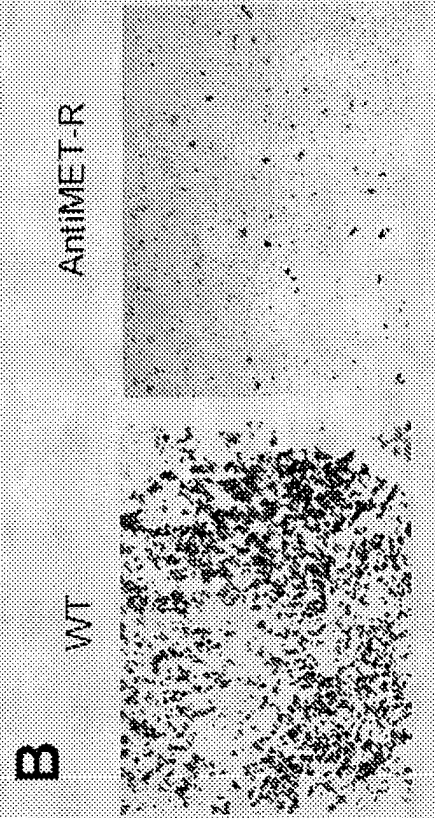


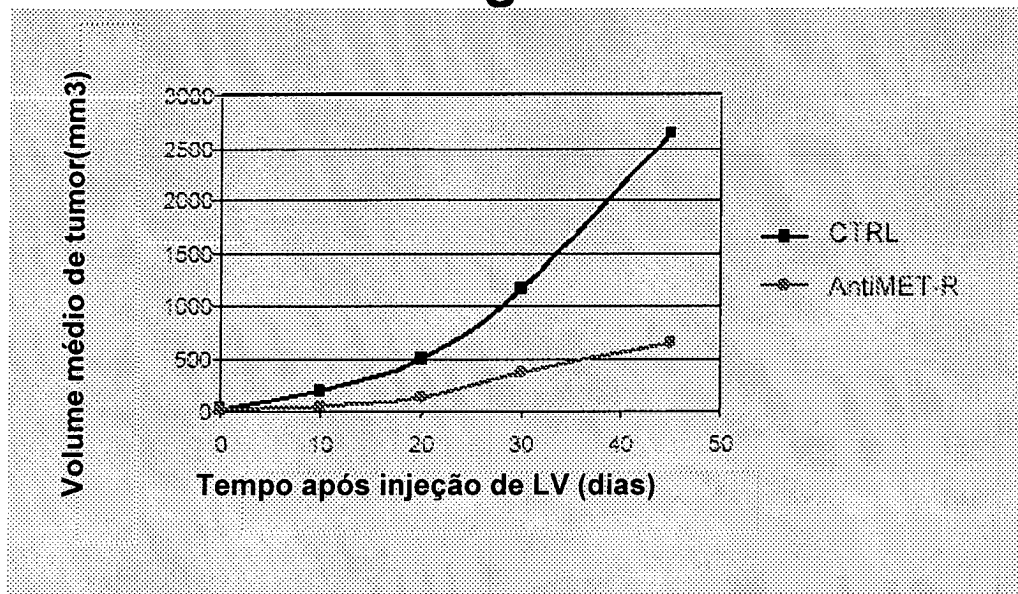
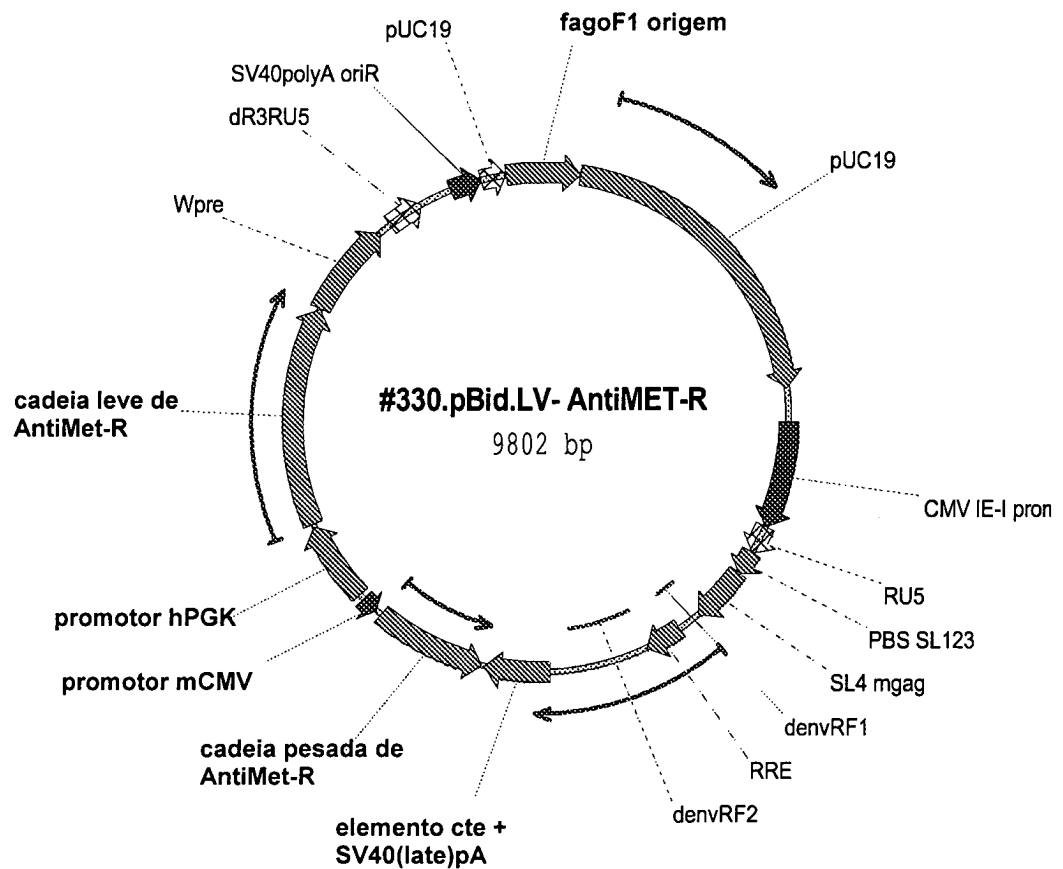
Fig. 14**Fig. 15**

Fig. 16

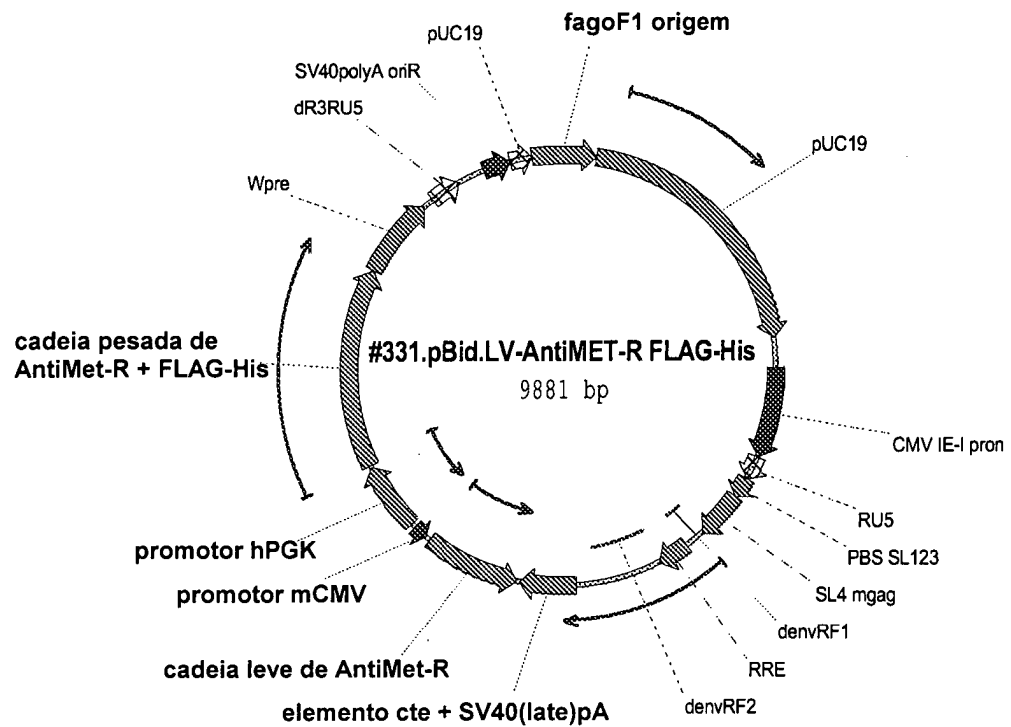


Fig. 17

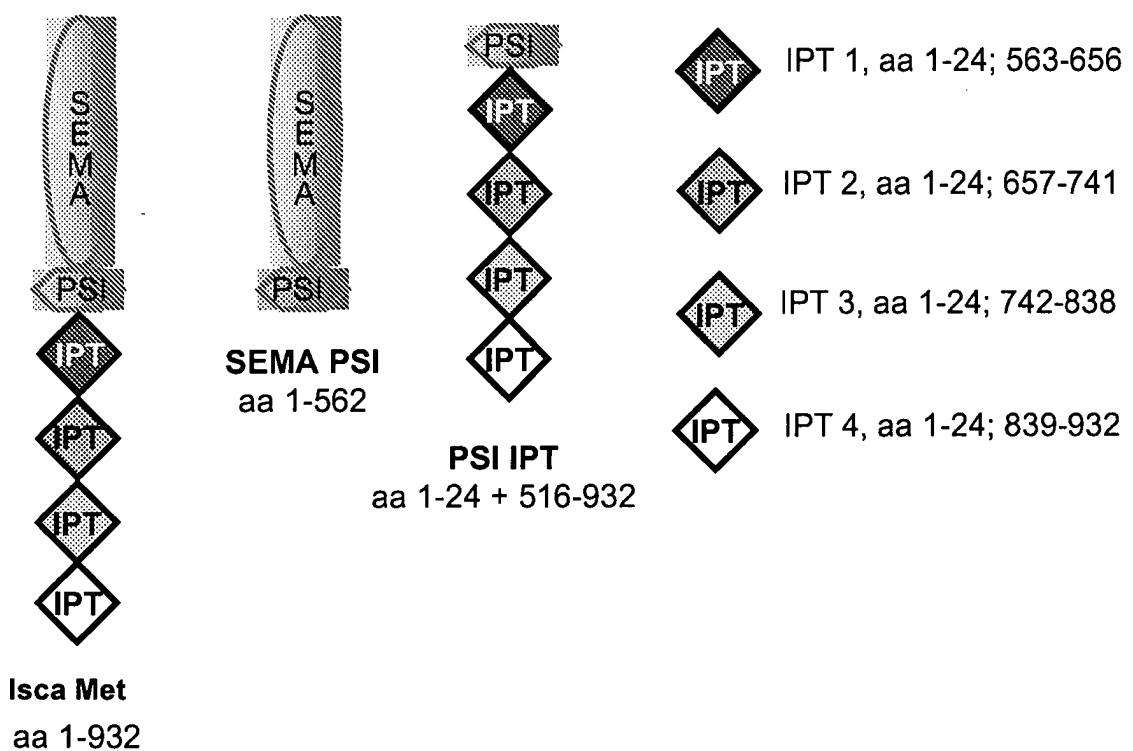


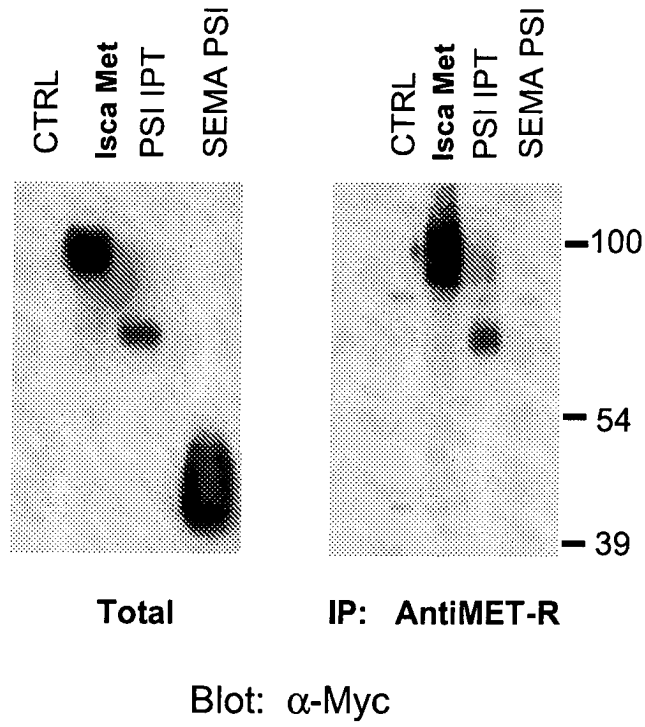
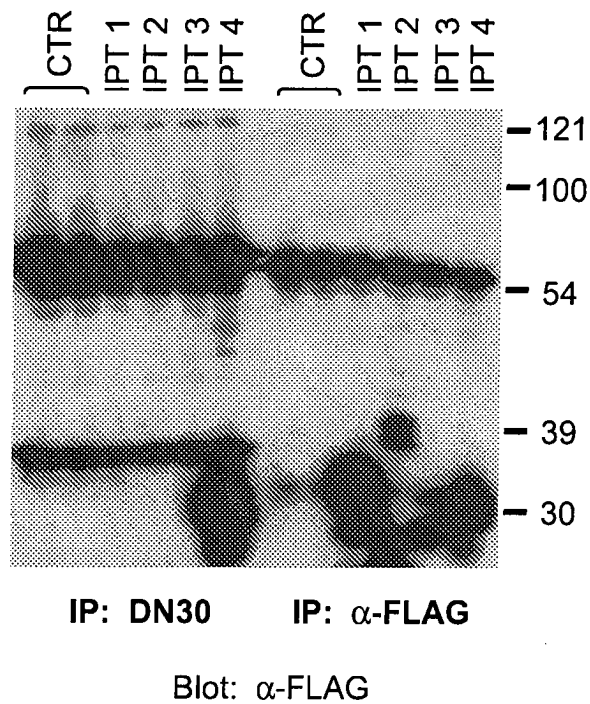
Fig. 18**Fig. 19**

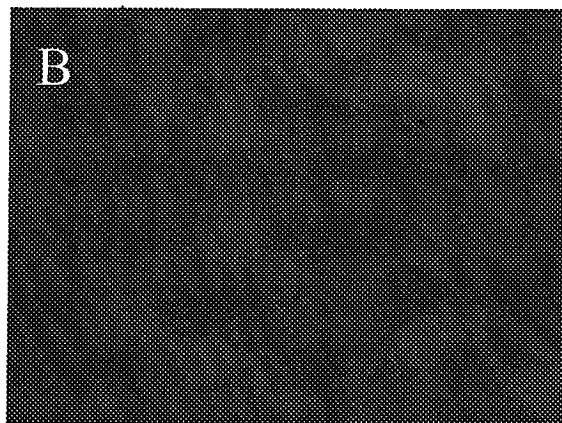
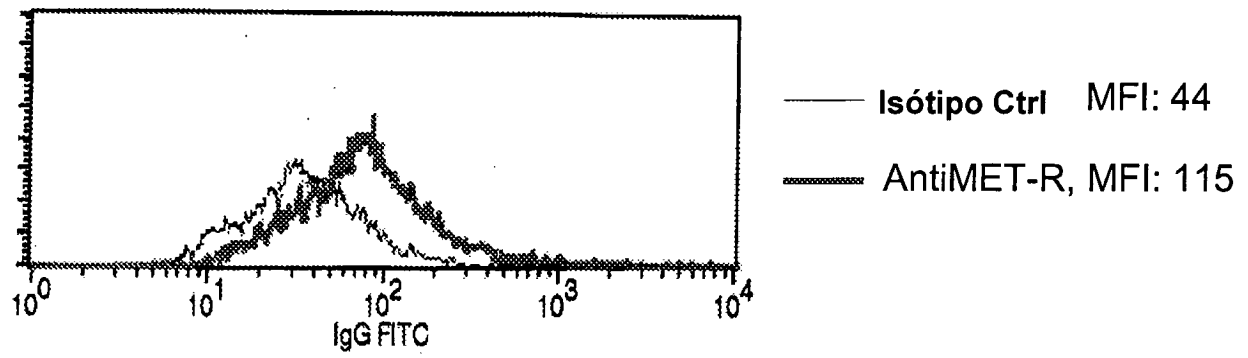
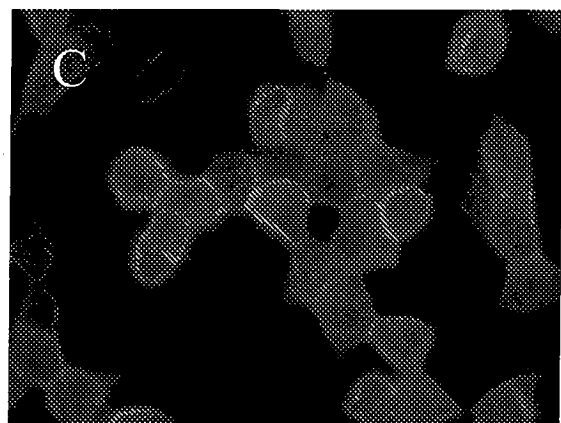
Fig. 20**Ctrl****AntiMET-R**

Fig.21 a

```

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 acctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag taggggctac      360
tggggccaaag gcaccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacagcccc atcgggtctat      420
ccactggccc ctgtgtgtgg aaatacaact ggctcctcgg tgactctagg atgcctggtc      480
aaggggttatt tccctgagcc agtgaccttg acctggaact ctggatccct gtccagtggc      540
gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct gacctctaca ccctcagcag ctcagtgact      600
gtaacctcga gcacctggcc cagccagtcc atcacctgca atgtggccca cccggcaagc      660
agcaccaagg tggacaagaa aattgagccc agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca      720
tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttgggt ggaccatccg tcttcatctt ccctccaaag      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 taaaaccca aagggtcagt aagagctcca     1080
caggtatatg tcttgcctcc accagaagaa gagatgacta agaaacaggt cactctgacc     1140
tgcatggtca cagacttcat gcctgaagac atttacgtgg agtggaccaa caacgggaaa     1200
acagagctaa actacaagaa cactgaacca gtccctggact ctgatgggtc ttacttcatg     1260
tacagcaagc tgagagtgga aaagaagaac tgggtggaaa gaaatagcta ctccgtttca     1320
gtggtccacg agggctctgca caatcaccac acgactaaga gcttctcccg gactccgggt     1380
aatga                                             1386

```

Fig.21b

MGWSYIILFLVATATDGHSQVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWIHHWKQRPQGQLEW
 IGEINPSSGRTNYNEKFKNKVTVTVDKSSTTAYMQLSNLTSEDSAVYYCASRGYWGQGTTTLTVSSA
 KTTAPSVYPLAPVCGNTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSS
 VTVTSSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDV
 LMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSG
 KEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWT
 NNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

Fig. 22a

```

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

```

Fig. 22b

```

METDTILLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVYDGGSYMSWFQQRPGQ
PPKLLISAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDVATYYCQQSYEDPLTFGAGTKLELKR
ADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYS
MSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

```

RESUMO

“USOS DE UM ANTICORPO MONOCLONAL, UM FRAGMENTO E/OU
ANTICORPO GENETICAMENTE ENGENHEIRADO OU
HUMANIZADO, DE UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E DE UM
5 VETOR, PRODUTO, E, MÉTODO PARA TRIAR COMPOSTOS”

Uso de um anticorpo monoclonal direcionado contra o
domínio extracelular de fator de crescimento de hepatócito é descrito para a
preparação de um medicamento para o tratamento de tumores e/ou metástases
e de uma ferramenta de diagnóstico para detectar células neoplásicas bem
10 como vetores compreendendo pelo menos uma porção da sequência de
nucleotídeos codificadora do anticorpo monoclonal anti-Met e/ou pelo menos
um fragmento do mesmo e pelo menos um inibidor de quinase.