

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-196206

(P2012-196206A)

(43) 公開日 平成24年10月18日(2012. 10. 18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 B O 6 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 7 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C O 8 4
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	4 C O 8 5

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L 外国語出願 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-39193 (P2012-39193)	(71) 出願人	508238336 メセレス・トランスレイショナル・リサーチ・ソシエタ・アノニマ METHERESIS TRANSLATIONAL RESEARCH S. A. スイス、ツェーハー6900ルガーノ、 ヴィア・アッラ・カンパーニャ2/A番
(22) 出願日	平成24年2月24日 (2012. 2. 24)	(74) 代理人	100100158 弁理士 鮫島 睦
(31) 優先権主張番号	11158861.2	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(32) 優先日	平成23年3月18日 (2011. 3. 18)	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100127638 弁理士 志賀 美苗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】放射線治療の有効性を増強するためのME T阻害剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】患者の放射線治療に対する耐性を低減するおよび／またはなくするため、癌に罹患している患者の治療において使用するための阻害剤の提供。

【解決手段】(i) 抗-Me tモノクローナル抗体、(ii) 抗-Me tモノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)を含む遺伝子組み換え抗体、および、(iii) 抗-Me tモノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)を含む(i)または(ii)の断片、またはそれらの組合せ、から選択され、腫瘍に罹患している患者の治療における使用のためのMe t阻害剤であって、Me t遺伝子によってコードされる受容体のダウンレギュレーションを誘導することができ、かつ、放射線治療に対する患者の耐性を低減する、および／または、なくすることができるMe t阻害剤。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- i) 抗-Met モノクローナル抗体、
 - ii) 抗-Met モノクローナル抗体の相補性決定領域 (CDR)を含む遺伝子組み換え抗体、および、
 - iii) 抗-Met モノクローナル抗体の相補性決定領域 (CDR)を含む(i)または(ii)の断片、またはそれらの組合せ、
- から選択される、腫瘍に罹患している患者の治療における使用のためのMet 阻害剤であって、MET遺伝子によってコードされる受容体のダウンレギュレーションを誘導することができ、かつ、放射線治療に対する患者の耐性を低減する、および/または、なくすることができるMet 阻害剤。

10

【請求項 2】

腫瘍に罹患している患者の治療における使用のためのMet 阻害剤をコードするヌクレオチド配列であって、該 Met 阻害剤が：

- i) 抗-Met モノクローナル抗体、
- ii) 抗-Met モノクローナル抗体の相補性決定領域 (CDR)を含む遺伝子組み換え抗体、および、
- iii) 抗-Met モノクローナル抗体の相補性決定領域 (CDR)を含む(i)または(ii)の断片、から選択されるものであり、該 Met 阻害剤が、MET遺伝子によってコードされる受容体のダウンレギュレーションを誘導することができ、かつ、放射線治療に対する患者の耐性を低減する、および/または、なくすることができるものである、Met阻害剤をコードするヌクレオチド配列。

20

【請求項 3】

請求項 1または 請求項 2のMet 阻害剤またはMet 阻害剤をコードするヌクレオチド配列であって、該 Met 阻害剤が：

- i) DN30 抗-Met モノクローナル抗体、
 - ii) DN30 抗-Met モノクローナル抗体の相補性決定領域 (CDR)を含む遺伝子組み換え抗体、ここで該 CDRは、配列番号12 ～ 14 および 20 ～ 22に示すアミノ酸配列を有する、および、
 - iii) DN30 抗-Met モノクローナル抗体の相補性決定領域 (CDR)を含む(i)または(ii)の断片またはそれらの組合せ、ここで該 CDRは、配列番号12 ～ 14 および 20 ～ 22に示すアミノ酸配列を有する、
- から選択されるものであり、該 DN30 抗-Met モノクローナル抗体がハイブリドーマ細胞株 ICLC PD 05006によって産生されるものである、Met 阻害剤またはMet 阻害剤をコードするヌクレオチド配列。

30

【請求項 4】

該 Met 阻害剤が、注射または注入による、可溶性タンパク質の形態における投与のためのものである、請求項 1 または請求項 3のMet 阻害剤。

【請求項 5】

請求項 2または請求項 3の該 Met 阻害剤をコードするヌクレオチド配列であって、該 Met 阻害剤をコードする該ヌクレオチド配列が、ベクターによる投与のためのものであり、該ベクターが粒子の形態におけるものである、Met 阻害剤をコードするヌクレオチド配列。

40

【請求項 6】

該ベクターが腫瘍または腫瘍関連細胞を標的化するために好適なものである、請求項 5の該 Met 阻害剤をコードするヌクレオチド配列。

【請求項 7】

該ベクターが、好ましくは注射による、全身的または腫瘍内投与のためのものである、請求項 5または請求項 6の該 Met 阻害剤をコードするヌクレオチド配列。

【請求項 8】

50

該断片が Fab 断片、好ましくは少なくとも一つの安定化分子を含む Fab 断片である前記請求項いずれかの Met 阻害剤または Met 阻害剤をコードするヌクレオチド配列。

【請求項 9】

該少なくとも一つの安定化分子が、ポリエチレングリコール、アルブミン結合ドメイン、アルブミンから選択される、請求項 8 の Met 阻害剤または Met 阻害剤をコードするヌクレオチド配列。

【請求項 10】

該 Met 阻害剤 および/または該 Met 阻害剤をコードする該ヌクレオチド配列が、該患者を放射線治療に供する少なくとも一週間前に投与するためのものである、前記請求項いずれかの Met 阻害剤または Met 阻害剤をコードするヌクレオチド配列。

10

【請求項 11】

該 Met 阻害剤 および/または該 Met 阻害剤をコードする該ヌクレオチド配列が該患者を放射線治療に供する一日前に投与するためのものである、前記請求項いずれかの Met 阻害剤または Met 阻害剤をコードするヌクレオチド配列。

【請求項 12】

該 Met 阻害剤 および/または該 Met 阻害剤をコードする該ヌクレオチド配列が、放射線治療が終わった後、少なくとも一週間まで、好ましくは 6 から 48 時間まで投与するためのものである、前記請求項いずれかの Met 阻害剤または Met 阻害剤をコードするヌクレオチド配列。

20

【請求項 13】

該腫瘍が、癌腫、骨格筋肉腫、軟部組織肉腫、造血器悪性腫瘍、脳腫瘍、黒色腫、中皮腫、ウィルムス腫瘍から選択される、前記請求項いずれかの Met 阻害剤または Met 阻害剤をコードするヌクレオチド配列。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本開示は、癌に罹患している患者における放射線治療の有効性を増強するための MET 阻害剤の使用に関する。

【背景技術】

30

【0002】

技術的背景

癌患者の治療のために成功裏に使用されているにもかかわらず、放射線治療は腫瘍を根絶することができないことがあり、腫瘍がより悪性の表現型を伴って再発する場合がある。それに一致して、電離放射線 (IR) の矛盾した転移誘発 (pro-metastatic) 効果が、動物モデルにおける古典的研究によって明らかになってきた。放射線治療の後の腫瘍の進行は、本質的に放射線耐性である、「癌幹細胞」亜集団の正の選択に起因しうる。しかしながら、顕著な証拠が、選択に加えて、IR が組織再生を目的とした適応 (adaptive) 表現型を促進することを示しており、それは転移挙動に進展しうる。この表現型は、DNA 損傷に対する「ストレスおよび回復 (stress-and-recovery)」応答として規定され、単細胞および組織レベルの両方において起こる。単細胞において、DNA 損傷の検出は、おもに ATM-p53 軸によって組織化されている特異的な分子機構を誘発し、それは複製を阻害し、DNA 修復を活性化する。損傷が非可逆的である場合、正常細胞は、アポトーシスを経るか、あるいは老化を介してその増殖能を引きこもらせるようにプログラムされる。しかしながら、変異細胞の死の後、組織は元の構造および機能を取り戻すために適正な細胞数およびパターンを回復しなければならない。したがって、再生 (または「創傷治癒」) が、正常または腫瘍性の生存細胞によって開始される。インビトロで観察されるように、このプロセスは、傷の縁からの脱離、線維芽細胞表現型の獲得、傷ついた部位への遊走、そしておそらくは、増殖といった工程を含む。この全プログラムは、形態学的特徴を強調する専門用語である「上皮間葉移行」 (EMT) と称されてきた。より最近には、このプログラムはまた、癌に

40

50

関する機能的側面を強調する語である、「浸潤性増殖」(IG)としても規定されている。現在では、EMT/IGは、組織発達および再生のための生理的プログラムであるということが広く受け入れられており、それは、浸潤および転移を行うために癌細胞によって奪われる。EMT/IGは癌細胞において、(a)時折、クローン選択を支持する遺伝子損傷の結果として；(b)より頻繁に、不利な環境条件への適応応答の結果として、活性化される。

【0003】

したがって、EMT/IGは、数個の特定の転写因子によって最終的には制御され、少数の細胞外シグナルによって調整される遺伝的プログラムである。後者は、細胞分散因子(scatter factor)、例えば、肝細胞増殖因子(HGF)およびマクロファージ刺激タンパク質(MSP)を含み、これらは、Metファミリーに属するチロシンキナーゼ受容体に結合する。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

発明の目的および概要

それゆえ、腫瘍に罹患している患者における放射線治療の有効性を増強するための改善された解決手段に対する必要性が感じられている。

【0005】

本開示の目的は、かかる改善された解決手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明によると、上記目的は添付の特許請求の範囲において具体的に記載されている特定事項のおかげで達成され、それらは本開示の不可分の部分を形成するものとして理解される。

20

【0007】

本発明のある態様は、腫瘍、好ましくは秩序を失った(deregulated)Met経路を示す腫瘍に罹患している患者の治療におけるMet阻害剤の使用を提供し、ここで、Met阻害剤は以下から選択され：

i) 抗-Metモノクローナル抗体、

ii) 抗-Metモノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR(s))を含む遺伝子組み換え(genetically engineered)抗体、および、

30

iii) 抗-Metモノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR(s))を含む(i)または(ii)の断片、またはそれらの組合せ、

ここで、Met阻害剤は、MET遺伝子によってコードされる受容体のダウンレギュレーションを誘導することおよび放射線治療に対する患者の耐性を低減するおよび/またはなくすることができる。

【0008】

好ましい態様において、抗-Metモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株 ICLC PD 05006によって産生されるDN30抗-Metモノクローナル抗体である。

【0009】

さらに好ましい態様において、a)遺伝子組み換え抗体、または、b)抗-Metモノクローナル抗体または遺伝子組み換え抗体の断片に含まれる相補性決定領域(CDR)は、アミノ酸配列を配列番号12~14および20~22に示すDN30抗-Metモノクローナル抗体のCDRである。

40

【0010】

本開示の別の態様は、腫瘍、好ましくは、秩序を失ったMet経路を表す腫瘍に罹患している患者の治療(例えば、遺伝子治療による)における使用のためのMet阻害剤をコードするヌクレオチド配列に関し、該Met阻害剤は以下から選択され：

i) 抗-Metモノクローナル抗体、

ii) 抗-Metモノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR(s))を含む遺伝子組み換え抗体、および、

50

iii) 抗-Met モノクローナル抗体の相補性決定領域 (CDR(s)) を含む(i)または(ii)の断片、またはそれらの組合せ、

ここで、該 Met 阻害剤は、MET遺伝子によってコードされる受容体のダウンレギュレーションを誘導することができ、かつ、放射線治療に対する患者の耐性を低減するおよび/またはなくすることができるものである。

【0011】

好ましい態様において、抗-Met モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株 ICLC PD 05006によって産生されるDN30 抗-Met モノクローナル抗体である。

【0012】

好ましい態様において、a) 遺伝子組み換え抗体、または、 b) 抗-Met モノクローナル抗体または遺伝子組み換え抗体の断片をコードするヌクレオチド配列に含まれる相補性決定領域 (CDR) は、アミノ酸配列が配列番号12~14および20~22に示されるDN30 抗-Met モノクローナル抗体のCDRである。

【0013】

好ましい態様によると、Met 阻害剤は、i) 注射または注入による可溶性タンパク質の形態における、または、ii) 全身的または腫瘍内投与のためのベクターの手段による投与のためのものである。

【0014】

さらなる好ましい態様によると、Met 阻害剤は、少なくとも一つの安定化分子(stabilizing molecule)に所望により結合していてもよい(conjugated) Fab 断片の形態におけるものであり、ここで、安定化分子は、ポリエチレングリコール、アルブミン結合ドメイン、アルブミンから選択される。

【0015】

本開示は、照射がMET 発現 (癌の「浸潤性増殖」) を駆動することが知られている癌遺伝子) をアプレギュレートすることを開示し、それは次いで細胞浸潤を促進し、細胞を放射線に誘導されるアポトーシスから保護する。したがって、特定の化合物、即ち、特定の Met 阻害剤により、MET 発現をなくすることまたはそのキナーゼ活性を阻害することは、アポトーシスを促進し、放射線に誘導される浸潤に対抗し、したがって放射線治療の有効性を増強する。

【0016】

図面の簡単な説明

本発明を添付の図面に言及して例示的にのみ以下に説明する、ここで：

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】 図1。IRはMET 転写を誘導する。a、照射 (10 Gy) 後示された時点でのMDA-MB-435SにおけるMet タンパク質。ctrl、時間0でのMet。b、照射 (1-10 Gy) の12時間後のMDA-MB-435SにおけるMet タンパク質。c、照射 (10 Gy) 後示された時点でのMDA-MB-435SにおけるMET 転写産物。d、照射 (10 Gy; ctrl、非照射細胞) 後示された時点でのMDA-MB-231におけるMET プロモーターによって駆動されるルシフェラーゼ活性 (基底、プロモーター無しのコンストラクト)。棒: 2つの独立した実験の三連の分析の平均 $\pm$ s.e.m. (* $p < 0.05$, $n = 6$, 対応のあるt-検定)。a.u.、任意単位。

【図2】 図2。IR-誘導性 MET 転写はNF- κ Bを必要とする。a、照射 (10 Gy) 後示された時点または低酸素状態 (1% O_2) において24時間培養後に分析されたMDA-MB-435Sにおけるタンパク質の核内蓄積。ctrl、時間0での非照射細胞。b、照射された MDA-MB-231におけるクロマチン免疫沈降(10 Gy; ctrl、非照射細胞)。棒は、MET プロモーターにおける各NF- κ B 結合配列 (κ B1または κ B2)の抗-p65/RelA および非特異的 IgG 免疫沈降の間の比を表す (三連の分析の平均 $\pm$ s.e.m.)。NFKBIA (I κ B α) プロモーターを陽性対照として用いた。c、p65/RelA 発現につきサイレンシングされ(siRELA; siCTRL、対照)、照射された (10 Gy; ctrl、非照射細胞)、MDA-MB-231におけるMET プロモーター活性。棒は、MET プロモーター-駆動ルシフェラーゼ発現およびプロモーター無しの(基底) ルシフェラー

10

20

30

40

50

ゼ発現の間の比を表す (3つの独立した実験における三連の分析の平均 $\pm$ s.e.m)。差し込み図: siRNA トランスフェクションの後のp65/RelA タンパク質。d、p65/RelA 発現についてサイレンシングされたMDA-MB-435Sにおける (siRELA; siCTRL、対照)、照射 (ctrl、時間0での非照射細胞)後示された時点でのMet タンパク質蓄積。

【図3】図3。IR-誘導性 MET 発現はATM キナーゼ活性化を必要とする。ATM キナーゼ阻害剤 CGK733で処理され、照射後示された時点にて抽出されたMDA-MB-435SにおけるMet タンパク質発現、Chk2 リン酸化 (p-Chk2) およびp65/RelA 核転座。ctrl、時間0での非照射細胞。

【図4】図4。IR-誘導性浸潤性増殖はMetを必要とする。a、照射された MDA-MB-231またはU-251 (10 Gy; ctrl、対照)による基底膜浸潤。トランスウェルフィルターの顕微鏡写真(10X)。b、示された HGF濃度の存在下または非存在下(-)で培養された、照射された MDA-MB-435S (10 Gy; ctrl、対照)における異常な Met-誘導性分枝形態形成。スケール・バー: 100 μ m。

【図5】図5。Met 阻害は、細胞をIR-誘導性アポトーシスおよび増殖抑制に対して感作する(sensitize)。48時間、10 Gyで照射された、および/または、DN30 抗-Met 抗体のFab断片の存在下で培養された、U-251の生存能力(媒体: 非照射細胞)。棒: 3つの独立した実験の三連の分析の平均 $\pm$ s.e.m. (* $p < 0.05$ 、Fab-DN30 または 10 Gyのいずれか単独に関して有意に低減した生存能力、 $n = 9$ 、対応のあるt-検定)。棒: クローンを作る細胞のパーセンテージ (2つの独立した実験の三連の分析の平均 $\pm$ s.e.m.、* $p < 0.05$ 、 $n = 6$ 、対応のあるt-検定)。

【図6】図6。IRは Met リン酸化を誘導する。HGF (50 nM) および/または IR (10 Gy)で処理されたMDA-MB-231細胞におけるMet リン酸化を、示された時点にて抗-Met 抗体で免疫沈降させ、抗-ホスホ-Tyr 抗体 (p-Tyr)を用いるウェスタンブロットにより分析した。Metは、タンパク質免疫沈降の対照として示した。ctrl、HGF 陰性対照で処理した細胞 (方法を参照)。

【図7】図7。マウスおよびヒト MET プロモーターのアラインメント。ヒト MET プロモーター (GenBank 受入番号AF046925)を転写因子結合部位の同定のためにTRANSFAC 7.0 ソフトウェア (Biobase Biological Database GmbH, Wolfenbuttel, Germany)により分析した。2つの推定 NF- κ B 結合部位 (κ B1 および κ B2)が判明した。ヒトおよびマウス (遺伝子番号: 17295) MET プロモーターのアラインメントは、 κ B2 部位 (ヒト配列における-1149/-1136、長方形)が2つの種の間で高度に保存されていることを示す。

【図8】図8: DN30 モノクローナル抗体重鎖の核酸 (a)およびアミノ酸 (b) 配列。CDR領域は、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列の両方において下線で示す。

【図9】図9: DN30 モノクローナル抗体軽鎖の核酸 (a)およびアミノ酸 (b) 配列。CDR領域は、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列の両方において下線で示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

発明の態様の詳細な説明

本発明を非限定的な例によっていくつかの好ましい態様に関して詳細に説明する。

【0019】

以下の記載において、様々な具体的な詳細が態様の理解の補助を提供するために与えられる。これらの態様は具体的な詳細の1以上を用いずに実践できるし、その他の方法、成分、材料などを用いても実施できる。別の例において、周知の構造、材料、または操作は、態様の側面を不明瞭にすることを避けるために詳細には示されないし、記載されない。

【0020】

本明細書において提供される見出しは便宜の目的のためのみのものであり、態様の範囲や意味を解釈するためのものではない。

【0021】

細胞内標的に損傷を与えることに加えて、電離放射線 (ほとんどは活性酸素種の生成を介する)は、調節分子の活性を調整し、かかる調節分子は、ストレスおよび回復の(stress

10

20

30

40

50

-and-recovery) 生物学的応答を制御する。

【0022】

MET 癌遺伝子の転写上方制御(upregulation)は、この応答において重要な事象として現れ、その結果として放射線-誘導性損傷に対抗する生存促進性(pro-survival)および再生のプログラムの実行がおこる。本開示は、IR-誘導性 MET 上方制御はDNA 損傷の検出の後にタンパク質キナーゼ ATMによって誘発されるシグナル伝達経路によって制御されることを示す。この経路は、ATM キナーゼの核外輸送および転写因子 NF- κ Bの阻害解除を伴う。注目すべきことに、DNA 損傷によるNF- κ Bの活性化は放射線に対する防御応答において鍵となる役割を果たすことが知られている。というのは、NF- κ Bは、抗-アポトーシス遺伝子の卓越した調節因子であるからである。NF- κ Bによって促進される細胞生存は、癌細胞の放射線治療に対する「適応耐性」を誘導するために有効であることが提案されている。本発明者らは、NF- κ Bによって支持される放射線に対する適応応答は重要なことに MET 癌原遺伝子を伴うことをこのたび示す。

【0023】

IR によるMET 誘導は二相性転写事象であり、NF- κ BのMET プロモーターに位置する2つの κ B特異的応答要素への結合によって媒介される。照射の1-2時間以内に起こる初期転写応答はおそらくは、DNA 損傷センサー-ATMによって駆動される内因性経路によるNF- κ Bの活性化に依存する。考えられる限りでは、IR-誘導性 Met 過剰発現はそれ自体で、低酸素状態-誘導性Met 過剰発現の場合において示されるように、生理的濃度の遍在する(ubiquitous)リガンド HGFの存在下でシグナル伝達を誘発するために十分である。後期および持続性 MET 上方制御 - 24時間を超えて延長するもの - はまたおそらくはNF- κ Bに作用する複数の外因性シグナル伝達経路によって支持されている。実際、照射はサイトカイン、例えば、TNF- α 、IL-1 および IL-10の発現を促進し、これらサイトカインは、一方でNF- κ B標的であり、他方でNF- κ B 転写活性を刺激する。本発明者らは、生組織において、照射はNF- κ Bに影響する自己分泌/傍分泌ループを誘導し、それは損傷組織にわたって生存シグナルの波を伝播することを考慮する。

【0024】

注目すべきことに、NF- κ Bに対する転写応答には、生存促進性遺伝子に加えて、EMT/IGに責任のある分子が含まれることが知られている。生存促進性プログラムおよびEMT/IG遺伝的プログラムの組み合わせの実行は、両刃の剣として作用する:正常組織においては、これらプログラムは生存および損傷の後の再生をもたらし;癌細胞においては、これらは悪性腫瘍への進行を助長する。

【0025】

MET 癌原遺伝子は、ストレスおよび回復(stress-and-recovery) 応答の明るい側と暗い側の両方を組織化するために必要な、決定的な(critical)NF- κ B 標的であるための基準を満たす。本開示において示されるように、一方で、IR-誘導性 Met 過剰発現は細胞が損傷した単分子層を治癒させることを可能にする。他方で、IRは細胞が基底膜を横切ることを刺激し、これは悪性腫瘍の典型的な特徴である。より驚くべきことに、IRはMet-誘導性分枝形態形成の生理的プロセスを三次元マトリックスにわたる無秩序な細胞伝播(dissemination)へと向かわせることが報告されている。すべての場合において、MET ノックダウンまたは機能阻害を介して、いくつかのNF- κ B 標的遺伝子が照射された細胞において発現するが、本発明者らは、Metが生理的浸潤性増殖 (創傷治癒)と悪性浸潤性増殖 (浸潤)との両方に必要であることを示す。照射の後に再発する腫瘍の報告されている攻撃性は、したがって、MET 癌遺伝子の緊密な制御の下でのEMT/IG プログラムの活性化を伴う可能性がある。

【0026】

Metが、抗-アポトーシス、再生およびIRに対する侵襲性応答に関与している(implied)という観察は、重要な治療の結果を有する:放射線治療と Met 阻害との組み合わせは癌細胞を放射線増感する一方、侵襲促進性(pro-invasive) 副作用を防止する。実際、本開示は、Met 阻害が治療量のIRへの曝露の後の細胞生存およびコロニー形成活性を顕著に損なうこ

とを示す。もっとも重要なことに、いくつかの正常組織の幹/前駆部分(compartment)において発現されるが、METは考えられる限りでは癌幹細胞においても発現され、それはしばしば正常幹細胞または増殖する前駆細胞の直接の形質転換に由来する。IR-誘導性 Met 発現および活性化は、癌(幹)細胞の放射線耐性および侵襲能力を支持し、したがって、それらの正の選択および伝播(dissemination)の機会を増やす。

【0027】

それゆえ、従来の治療法、即ち、放射線治療と組み合わせた、Met 阻害(可溶性タンパク質の形態におけるMet 阻害剤の投与によるか、または、遺伝子治療、即ち、以下に規定するMet 阻害剤をコードするベクターの投与による)は、癌を根絶するためのさらなる戦略である。

【0028】

本開示において、「Met 阻害剤」という表現は、抗-Met モノクローナル抗体、MET遺伝子によってコードされる受容体のダウンレギュレーションを誘導することができるその誘導体および/または断片を意味する。好ましい態様において、「Met 阻害剤」は、DN30 抗-Met モノクローナル抗体、MET遺伝子によってコードされる受容体のダウンレギュレーションを誘導することができるその誘導体および/または断片である。

【0029】

「抗体誘導体」という表現は、抗体の相補性決定領域(CDR)を含む分子、例えば、抗体のCDRを含む遺伝子組み換えまたはヒト化抗体または抗体のCDRを含むペプチドを意味する。

【0030】

「抗体断片」という表現は、i)抗-Met モノクローナル抗体、および、ii)抗-Met モノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)を含む遺伝子組み換えまたはヒト化抗体の、Fv、s cFv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 断片から選択される断片を意味する。

【0031】

薬理学的観点からは、Fab 断片の使用は長所と短所の両方を有する。Fab 分子は、下等真核生物および原核生物などの単純な発現系を用いて容易に産生することができる(Chambers RS. Curr Opin Chem Biol 2005 9:46-50)。Fab 分子はまた、抗体全体と比べて免疫原性が低く、それらの低い分子量は組織浸透を改善する。

【0032】

臨床現場におけるFab 断片の使用における問題点は、より高い腎臓クリアランスに起因するFab 断片の短い血漿中半減期に関する。これはFab 分子の腫瘍部位への局所投与によって回避することができる。全身送達および延長された(長期)治療を必要とする治療への応用のためには、Fab 半減期を増大させるための行為が必要である。増大した Fab 半減期を得るために、安定化分子 (Fab 断片の抗原結合特性を改変しないもの)との接合(conjugation)によって得られるFabの安定化された形態が実現されている。

【0033】

PEG化はもっとも強化された技術であるが (Chapman AP. Adv Drug Deliv Rev 2002 54: 531-545)、PEG化は、治療用タンパク質の安定性を満たすための唯一の可能性ではない。

【0034】

化学修飾に代えて、組み換え Fab 分子を、高アフィニティーにて血清アルブミンと結合することができるペプチドまたはドメインをコードする配列を組み込むように一次ヌクレオチド配列のレベルで修飾することができ (Dennis MS, et al., J Biol Chem 2002 277:35035-35043; Stork R, et al. Protein Eng Des Sel 2007 20:569-576)、あるいは、Fabをコードする鎖の一つが生物学的に不活性なタンパク質(例えば、血清アルブミン (Subramanian GM, et al. Nat Biotechnol 2007 25:1411-1419))をコードする配列とインフレームにて融合するようなキメラ分子として作成することもできる。ポリエチレングリコール、アルブミン結合ドメイン、アルブミン、またはFab 断片の抗原結合特性を改変しないその他のあらゆる配列が、Fab 断片のインビボ血漿中半減期を上昇させることができる安定化分子として用いることができる。

10

20

30

40

50

【0035】

DN30 抗-cMet モノクローナル抗体は、Advanced Biotechnology Center (ABC)、Interlab Cell Line Collection (ICLC), S.S. Banca Cellule e Colture in GMP, Largo Rosanna Benzi 10, Genova, Italyに受託番号 ICLC PD 05006にて寄託されたハイブリドーマ細胞株によって産生される。

【0036】

本開示による、放射線治療耐性を低減するおよび/またはなくするための、Met 阻害剤の投与に好適な腫瘍としては、i) 癌腫、好ましくは、膀胱、乳房、胆管癌、結腸直腸、子宮内膜、食道、胃、頭頸部、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、卵巣、膵臓/胆嚢、前立腺、甲状腺（癌）から選択されるもの、ii) 軟部組織肉腫、好ましくは、カボジ肉腫、平滑筋肉腫、MFH/線維肉腫から選択されるもの、iii) 骨格筋肉腫、好ましくは、骨肉腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫から選択されるもの、iv) 造血器悪性腫瘍、好ましくは、急性骨髄性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髄性白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫から選択されるもの、v) その他の腫瘍、好ましくは、脳腫瘍、黒色腫、中皮腫、ウィルムス腫瘍から選択されるものが挙げられる。

【0037】

これらのすべての腫瘍は、実際、「秩序を失った Met 経路」を示し、ここでこの表現は、これらの腫瘍が以下の少なくとも一つに起因する異常な Met シグナル伝達によって特徴づけられることを意味する：i) Met 突然変異、ii) Met タンパク質過剰発現、iii) MET遺伝子増幅、iv) 循環 HGFのレベル上昇。

【0038】

Met 阻害剤のヒト患者への投与

抗-Met 抗体は、ヒト悪性腫瘍に関与するその他の受容体チロシンキナーゼを標的化する抗体(例えば、トラスツズマブ、HER-2に対する抗体)について採用されているものと類似の投与計画によって投与される。典型的には、抗体またはその誘導体または断片は、5-10 mg/kg、好ましくは、4-8 mg/kgの範囲の週用量にて静脈内注入により投与される。放射線治療との組合せのためには、抗-Met 抗体の投与は照射の一週間前、より好ましくは一日前に開始し、放射線治療が終わった後一週間まで、好ましくは 6 ~ 48 時間まで継続する。

【0039】

抗-Met 抗体、またはその誘導体または断片をコードするcDNA 配列も、「遺伝子治療」手順によってヒト患者に投与することができる。cDNA 配列は、ウイルス起源（レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス等）の形質導入(transduction)ベクターにクローニングされ、特異的な表面結合タンパク質によって腫瘍または腫瘍関連細胞を特異的に標的化することができるウイルス粒子へとアセンブリーされる。次いで、ウイルス粒子調製物はGMPグレードの設備において産生される。この調製物は、単回または複数回注射によって全身的または腫瘍内のいずれかによって送達されうる。ウイルスベクターにより形質導入された(transduced) 腫瘍組織は、抗-Met 抗体、またはその誘導体または断片の配列によってコードされるタンパク質を発現し、それにより、自己抑制的(auto-inhibitory)回路を提供する。

【0040】

以下の実験データが提供される；実験はDN30 モノクローナル抗体および/またはその誘導体および/または断片を用いて実施し、その目的はいくつかの好ましい態様の詳細な記載を提供することであり、本発明の目的を限定する意図のものではない。

【実施例】

【0041】

材料および方法

細胞株およびsiRNA。細胞株(A549、MDA-MB-231、LoVo、MDAMB- 435S、U-87MG、U-251、PC3、SF295、DLD1、SK-N-SH)はATCCから得た。ATM キナーゼ阻害のために、細胞を照射の前に4時間前処理し、次いで、CGK733 (DMSO中10 μ M)の存在下で維持した。siRNAs 標的

化RELA (ON-TARGET plus SMART pool L-003533-00 Human RELA、NM_021975、Dharmacon、100 nM)、または 対照 siRNAs (ON-TARGET plus SMART pool、siCONTROL Non Targeting siRNA、Dharmacon)を一過性にトランスフェクトした。

【0042】

siRNA 配列は以下の通りであった。

「SMART pool L-003533-00 Human RELA NM_021975」は、以下の二本鎖配列の1:1:1:1:混合物であった:

- (1) センス: GGAUUGAGGAGAAACGUAAUU (配列番号1)、
アンチセンス: 5' -NUUUCUACAAGCUCGUGGGUU (配列番号2)、
- (2) センス: CCCACGAGCUUGUAGGAAAUU (配列番号3)、
アンチセンス: 5' -NUUUCUACAAGCUCGUGGGUU (配列番号4)、
- (3) センス: GGCUAUAACUCGCCUAGUGUU (配列番号5)、
アンチセンス: 5' -NCACUAGGCGAGUUAUAGCCUU (配列番号6)、
- (4) センス: CCACACAACUGAGCCCAUGUU (配列番号7)、
アンチセンス: 5' -NCAUGGGCUCAGUUGUGUGUU (配列番号8)。

10

【0043】

SMART pool、siCONTROL Non Targeting siRNA (1つのシングルデュプレックス(single duplex)配列):

センス: AUGUAUUGGCCUGUAUUAG (配列番号9)。

【0044】

DN30 抗体およびDN30 Fab 断片産生。DN30 モノクローナル抗体を、Prat M. et al., 1998, J. Cell Sci 111:237-247に記載されているように産生し、Advanced Biotechnology Centerに、受託番号 ICLC PD 05006にて寄託した。DN30 Fab 断片をDN30 パパイン消化およびアフィニティー精製 (Immunopure Fab Preparation Kit, Pierce)を介して得た。

20

【0045】

DN30 重鎖のアミノ酸配列を図 8bに図示し、配列番号10に示し、DN30 重鎖のヌクレオチド配列を図 8aに図示し、配列番号11に示す。

【0046】

DN30 重鎖のCDR 領域に対応するアミノ酸配列は以下の通りである: CDR-H1: GYTFTSYW (配列番号12); CDR-H2: INPSSGRT (配列番号13); CDR-H3: ASRGY (配列番号14)。DN30 重鎖のCDR 領域に対応するヌクレオチド配列は以下の通りである: CDR-H1: GGCTACACCTTCAC CAGTTACTGGA (配列番号15); CDR-H2: ATTAATCCTAGCAGCGGTCGTACT (配列番号16); CDR-H3: GCAAGTAGG (配列番号17)。

30

【0047】

DN30 軽鎖のアミノ酸配列を図 9bに図示し、配列番号18に示し、DN30 軽鎖のヌクレオチド配列を図 9aに図示し、配列番号19に示す。

【0048】

DN30 軽鎖のCDR 領域に対応するアミノ酸配列は以下の通りである: CDR-L1: QSVDDYDGGSY (配列番号20); CDR-L2: AAS (配列番号21); CDR-L3: QQSYEDPLT (配列番号22)。DN30 軽鎖のCDR 領域に対応するヌクレオチド配列は以下の通りである: CDR-L1: AAAGTGTGATT ATGATGGTGGTAGTTATAT (配列番号23); CDR-L2: GCTGCATCC (配列番号24); CDR-L3: CAGCAA AGTTATGAGGATCCGCTCAG (配列番号25)。

40

【0049】

インビトロ照射。X線は6 MVにて作動している線形粒子加速器 (Clinac 600C/D、Varian)によって放射した。

【0050】

ウェスタンブロット。タンパク質発現を、照射されたコンフルエントな、血清飢餓(serum-starved)細胞において調べた。細胞質および核部分における分画のために、細胞を洗浄し、「バッファー A」(10 mM HEPES pH 7.9、10 mM KCl、0.1 mM EDTA、0.5% NP-40、1 mM ジチオスレイトール、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニルおよびプロテアーゼ阻

50

害剤の混合物(cocktail))中で氷上で10分間インキュベートした。細胞質抽出物を含む、上清を、遠心分離によって分離した。ペレットを「バッファー B」(20 mM HEPES pH 7.9、400 mM KCl、1 mM EDTA、1 mM ジチオスレイトール、10% グリセロール、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニルおよびプロテアーゼ阻害剤の混合物)に再懸濁し、4℃で1時間激しく混合しながらインキュベートした。その結果得られた核溶解液を高速遠心分離によって清澄にした。等量のタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、以下の一次抗体を用いてウェスタンブロットにより分析した: マウス抗-ヒト Met (Prat et al., Int. J. Cancer 49, 323-328 (1991)に開示のDL21)、マウス抗-p65/RelA およびマウス抗-HIF-1 α (BD Biosciences)、ウサギ抗-ホスホ-Ser276およびウサギ 抗カスパーゼ-3 (Cell Signaling)、ウサギ抗-ホスホ-Chk2 (T68, R&D Systems)。ヤギ抗-アクチン (C-11; Santa Cruz Biotechnology)およびマウス 抗-ラミン B (Calbiochem)をそれぞれ等しい細胞質または核タンパク質ローディングの対照のために用いた。ブロットイメージをモレキュラーイメージャー (GelDoc XR; Bio-Rad Laboratories)を用いて獲得した。濃度測定分析をQuantity One 1-D (Bio-Rad Laboratories)を用いて行った。示されるウェスタンブロットは、少なくとも3つの独立した実験において得られた結果の代表である。

【0051】

ノザンブロット。コンフルエントな細胞を48時間血清飢餓させ、照射した。トータルRNAを0.8% アガロース-ホルムアルデヒドゲルにて分離し、標準的手順に従ってナイロンメンブレン(Amersham)にトランスファーした。全コード配列 (GenBank 受入番号J02958)を含むMET プローブをpCEV-MET プラスミド (Michieli et al., Oncogene 18, 5221-5231 (1999)参照)から得、[α -³²P]dCTP (Megaprime, Amersham)で標識した。ハイブリダイゼーションを50% ホルムアミドの存在下で42℃で16時間行った。ナイロンメンブレンを2X SSC-0.1% SDSで2回、0.1X SSC-0.1% SDSで2回、42℃で洗浄し、オートラジオグラフィーに供した。

【0052】

ROS 検出。細胞内 ROS 生成を5-(および 6)-カルボキシ-2'-7'-ジクロロフルオレセインジアセタート (カルボキシ-H₂DCFDA、Molecular Probes)を製造業者の指示に従って用いて評価した。簡単に説明すると、細胞を処理(IR: 10 Gy; 対照としてH₂O₂: 100 μ M)の24時間前に黒色 96-ウェルプレート(3 x 10⁴ 細胞/ウェル)に播種した。細胞をフェノールレッド-非含有DMEM中でカルボキシ-H₂DCFDA (10 μ M)の存在下で1時間37℃でインキュベートした。細胞を洗浄し、カルボキシ-H₂DCFDAの非存在下でフェノールレッド-非含有DMEM中でさらに30分間インキュベートし、次いで照射した。ROS 生成は、蛍光プレートリーダー (λ_{ex} = 485 nm、 λ_{em} = 535 nm) (DTX 880 Multimode Detector)を用いて照射の15分後に測定した。

【0053】

クロマチン免疫沈降 (ChIP)。4 x 10⁷ の細胞を照射された細胞または対照細胞のいずれかについての10のChIPのために用いた。照射 (10 Gy)の後、細胞を15分間室温で1% ホルムアルデヒド中で固定し、反応をグリシン (0.125 M)を用いて終結させた。固定された細胞を洗浄し、プロテアーゼ阻害剤の混合物を補充した氷冷 PBS 中に収集し、遠心分離した。細胞質画分を上記のように抽出して廃棄し、核をペレット化し、1 mlのSDS-溶解バッファー (1% SDS、1 mM EDTA、50 mM Tris-HCl pH 8、およびプロテアーゼ阻害剤の混合物)に再懸濁した。核を次いで超音波処理により破壊し、バルクサイズ(bulk size)が400-1000 bpのDNA 断片を得た。細胞残屑を14,000 rpmで10分間の4℃での遠心分離により清澄にした。クロマチン調製物を含有する上清を希釈バッファー 10X (0.01% SDS、1.1% Triton X-100、1.2 mM EDTA、16.7 mM Tris-HCl pH 8、167 mM NaCl)で希釈した。クロマチンを次いで、プロテインG-セファロース (Amersham、0.2 mg/ml のサケ精子 DNA、0.1% BSA および 0.05% NaN₃を補充した50%ゲルスラリー(gel slurry))を添加することにより1時間 4℃にてあらかじめ清澄にした(pre-cleared)。ビーズを4000 rpm で4℃での短い遠心分離によりペレット化し、上清を収集した。3%のクロマチン調製物をChIP 正規化(normalisation)のためのInputとして用いた。ChIP を一晩4℃で 4 μ g の抗体 (抗-p65/

RelA、Santa Cruz; 全(total)マウス IgG、Chemicon)を用いて行い、50 μ lのプロテイン G-セファロースビーズとともに3時間インキュベーションを行った。ビーズを回転台の上で 4°Cで以下の溶液 (各10分間)を用いて連続的に洗浄した:低塩バッファー (0.1% SDS、1% Triton X-100、2 mM EDTA、20 mM Tris-HCl pH 8、150 mM NaCl)を用いて2回、高塩バッファー (0.1% SDS、1% Triton X-100、2 mM EDTA、20 mM Tris-HCl pH 8、500 mM NaCl)を用いて2回、LiCl バッファー (0.25 M LiCl、1% デオキシコール酸、0.5% NP-40、1 mM EDTA、10 mM Tris-HCl pH 8)を用いて1回、およびTE (10 mM Tris-HCl pH 8、1 mM EDTA)を用いて2回。ChIPをEB (1% SDS、0.1 M NaHCO_3)中で2回溶出させ、一晚 65°Cで維持して、ホルムアルデヒド架橋を逆転させた(reverse)。RNase (50 μ g/ml、37°C30分間)およびプロテイナーゼ-K (500 μ g/ml、45°C2時間)による処理を行った。各サンプルをフェノール/クロロホルム抽出によって精製し、最後に40 μ lの滅菌水に再懸濁した。2 μ lの各サンプルをABI PRISM 7900HT 配列検出システム (Applied Biosystems)でのSYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いるリアルタイム PCRのためのテンプレートとして用いた。

【0054】

用いたプライマーは以下の通りであった:

- NFKBIA (fw: GAACCCAGCTCAGGGTTTAG - 配列番号26; rev: GGGAATTTCCAAGCCAGTCA - 配列番号27);
- κ B1 (fw: AGGCCAGTGCCTTATTACCA - 配列番号28; rev: GCGGCCTGACTGGAGATTT - 配列番号29);
- κ B2 (fw: GGGACTCAGTTTCTTTACCTGCAA - 配列番号30; rev: GGGACTCAGTTTCTTTACCTGCAA - 配列番号31)。

【0055】

創傷治癒アッセイ。細胞を24-ウェルプレート中で集密になるまで成育させ、24 時間飢餓させ、プラスチックチップで掻き取った。培地を1% FBSを含む新鮮な培地および媒体(vehicle)のみ (DMSO)に交換し、直ちに照射した。24 時間後、細胞を1% グルタルアルデヒド (Sigma)により固定し、クリスタル・バイオレットにより染色した。画像を倒立光学顕微鏡 (DM IRB、Leica)に連結したLeica photcamera (Leica DFC320、Leica)により獲得した。画像は少なくとも3つの独立した実験において得られた結果の代表である。

【0056】

トランスウェルアッセイ。細胞浸潤をTranswell (商標) チャンバー (BD Falcon)において測定した。MDA-MB-231 および MDA-MB-435S 細胞 (5×10^5 /トランスウェル)を、20 μ g/cm² の再構成されたマトリゲル基底膜 (Collaborative Research)により上側が被覆されたフィルター上に播種した。U-251 (10^4 /トランスウェル)を50 μ g/cm²に被覆されたフィルター上に播種した。1% FBSを補充した培地を両方のチャンバーに添加した。播種の1時間後、細胞を照射し (10 Gy)、37°Cで24時間インキュベートした。フィルター上側の細胞を機械的に除き、下側へと遊走した細胞を上記のようにして固定し、染色し、撮像した。細胞浸潤の定量のために、1実験条件あたり10の視野をランダムに選択し、10X 対物レンズ(objective)を用いて上記のように顕微鏡写真撮影した。形態計測解析をMetaMorph 7.1 ソフトウェアを用いて行った。画像は少なくとも3つの独立した実験の代表である。

【0057】

分枝形態形成アッセイ。MDA-MB-435S 球状体(spheroid)を、240 mg/ml メチルセルロース (Sigma)中での単細胞再懸濁および非接着性 96-ウェルプレート (Greiner)における24時間の培養によって前もって形成させた。球状体を、1.3 mg/mlのラット尾部由来I型コラーゲン(BD Biosciences)、10% FBS、および240 mg/ml メチルセルロースを含むマトリックスへと移した。24時間後、細胞を、照射および/またはHGFの存在下で7日間培養した。HGF をSF9 細胞中にバキュロウイルス組み換えタンパク質として得た。非感染細胞からの培養上清(conditioned medium)を陰性対照として用いた。画像は3つの独立した実験において得られた結果の代表である。

【0058】

DN30 Fabを用いる細胞生存能力アッセイ。10³ の細胞を 96-ウェルプレートに播種し、24時間育成させた。培地を1% FBS およびDN30 Fab (28 µg/ml)を含む培地または媒体単独 (PBS)と交換した。24 時間後、細胞を照射した (10 Gy)。細胞生存能力を上記のようにして評価した。

【0059】

結果

IR はMET 転写を誘導する

本発明者らは、以前にMET 癌原遺伝子が細胞外および細胞内の特定のシグナル、例えば、増殖因子および酸素センサーによって転写的に制御されることを示している。ここでは、治療用量のIR (10 Gyまで)への曝露によるMet 発現の調節を調べる。

【0060】

様々な組織型の腫瘍組織 (乳房、肺、前立腺および結腸の癌腫; 黒色腫; 膠芽細胞腫; 神経芽細胞腫)に由来する 10の細胞株において、Met タンパク質レベルが照射の24時間後に顕著に上昇したことが見いだされた。代表的な細胞株 (例えば、MDA-MB-435SおよびMDA-MB-231)において、詳細な経時変化実験により、Met タンパク質蓄積の二相性プロファイルが明らかになった。これは、約1-2 時間のMet 誘導 (~5倍)の初期ピーク、次いで、同様の 6 時間目に現れる後期ピークまたはプラトー、そして照射の24時間後の低下を特徴とする(図1a)。用量-応答実験により、Met 誘導は1 Gyの後に開始し、5 Gyにてプラトーに達することが示された (図1b)。照射された細胞において、MET mRNA 蓄積、および全長 MET プロモーターの活性化もまた観察され(図1c-d)、これはIR-誘導性 MET 過剰発現は転写機構を伴うことを示している。興味深いことに、MDA-MB-231において、一過性であってリガンドに依存しない Met 自己リン酸化もまた検出され、これはIRへの曝露後10分間以内に起こった (図6)。IR-誘導性 Met リン酸化の強度は非飽和濃度の HGF (50 ng/ml)によって引き起こされるものと匹敵していた。しかし、リン酸化の反応速度論は異なっており、IRによって誘導されたピークは10分後に達成された一方で、HGFにより誘導されたピークは、30分後に達成された。IR およびHGFによる同時に起こる刺激は相乗的ではなかった(図6)。

【0061】

IR-誘導性 MET 転写はNF-κBを必要とする

IRはいくつかの転写因子、例えば、NF-κBを調節することが知られている。したがって、ゲノム規模での発現プロファイリングは、調べた細胞株において、IRが顕著な初期 NF-κB 応答を誘導することを示した。例えば、MDA-MB-231において、照射の1 時間後に調節された33の遺伝子のうち9つはNF-κB 標的であり、予測されるよりも~20 倍高い頻度を示した。さらに、MDA-MB-231、MDA-MB-435S または U-251 細胞を用いる経時変化実験において、IR (10 Gy) は迅速(30分以内) かつ 持続性の (24時間までの) NF-κB サブユニット p65/RelAの核内蓄積を誘導し、これは NF-κB 活性化の特徴である (図2a)。さらに、照射後初期の時点において、核 p65/RelA は一過性にSer²⁷⁶ においてリン酸化された(図2a)。このリン酸化はプロテインキナーゼ Aを介して活性酸素種(ROS)により誘導されること、および初期標的遺伝子のサブセットの上方制御に必要である転写補助活性化因子 C BP/p300とのp65/RelA 相互作用を促進することが知られている。これらのデータは、IRがp65/RelA サブユニットの核内蓄積および初期の一過性のリン酸化を介してNF-κBの機能活性化を促進することを示す。

【0062】

MET ヒトプロモーターにおいて、配列 (GenBank 受入番号AF046925)の転写開始部位に対して、-1349/-1340 bpに位置するκB1と、-1149/-1136 bpに位置するκB2との2つの推定 NF-κB 結合部位がインシリコ分析により同定された。興味深いことに、κB2 部位はmet マウスプロモーターにおいて高度に保存されている (図7; 配列番号32に示すmet マウス (mus musculus) プロモーター配列および配列番号33に示すmet ヒト (homo sapiens) プロモーター配列)。クロマチン免疫沈降実験は、p65/RelAのいずれかの部位への結合(

association)が10 Gy に曝露された細胞において顕著に上昇したことを示し(図2b)、MET が、照射された細胞においてNF- κ B によって転写的に制御されていることが示された。これらの知見は、本発明者らが NF- κ B がIRによるMET 誘導のための絶対条件であるかどうかを調べることを促した。p65/RelAはいくつかのNF- κ B ヘテロダイマーのそれぞれの形成に関与しており、それにより全体のNF- κ B-駆動転写活性にとって重要であるため、p65/RelA 発現を RNA 干渉を介して消失させた(abrogated)。p65/RelAに対するsiRNA (SMA RT pool L-003533-00 Human RELA、配列番号1~8)で処理されたMDA-MB-231 またはMDA-MB-435Sにおいて、IRはもはや全長 MET プロモーター活性 (図2c)も Met タンパク質の蓄積も誘導することができなかった。これらをまとめると、これらのデータは、IR-誘導性 MET 上方制御が転写因子 NF- κ Bの活性化を必要とすることの説得力ある証拠を提供する。

10

【0063】

IR-誘導性 MET 転写における低酸素誘導因子-1 (HIF-1)の関与もまた考慮された。というのは、(a) HIF-1は照射された細胞においてROS 形成の結果として活性化されることが示されており、そして、(b) HIF-1はMET 発現の顕著な調節因子であるからである。しかし、HIF-1の関連性は相補的なアプローチにより示されるようにごくわずかであった。第一に、MDA-MB-231 およびMDA-MB-435Sにおいて、IRはHIF-1 活性化の特徴であるHIF-1 α サブユニットの核転座を誘導せず、それはそうではなく細胞を低酸素濃度において培養した場合に観察された (図2a)。HIF-1 活性化の欠如は照射された細胞における弱いROS 産生に起因するのではなかった。というのは、ROSは、10 Gyへの曝露の15分後に、平均して25 $\pm$ 3.5%上昇したからである。これは、1-10 Gyに曝露された細胞株における以前の観察によると、照射の2-5分後の平均80%のROS 誘導に対応すると見積もられた。さらに、IRは、低酸素状態-誘導性 MET 上方制御に必要な2つの機能的な低酸素応答性領域 (HRE)、およびAp-1 部位を含む、いわゆる「最小(minimal)」MET プロモーターを活性化することができないことが判明した。これらをまとめると、これらのデータは、HIF-1 がIRによるMET 上方制御に関与していないことを示す。しかし、低酸素状態がp65/RelA 核転座およびセリンリン酸化を誘導したことが観察された (図2a)。最後に、顕著な IR-標的である転写因子 p53の関与もまた除外された。実際、MDA-MB-435S および MDA-MB-231 (IRによる最高のMET 誘導を示す2つの細胞株)はp53 を不活性化する突然変異 (それぞれ、G266E およびR280K)を有している(harbour)。さらに、マウスプロモーターとは異なり、ヒト MET プロモーターは、p53の構成的に活性な形態によってはアップレギュレートされない。

20

30

【0064】

IR-誘導性 MET 発現はATM キナーゼ活性化により媒介される

NF- κ Bは、細胞外および細胞内シグナルの両方により惹起されるいくつかの経路の交差点である。後者にはDNA 損傷の検出の後にプロテインキナーゼ ATMによって引き起こされるものが含まれる。IR によるMET 誘導がATM キナーゼの活性化に依存するか否かを調べるために、MDA-MB-435S または MDA-MB-231を10 μ M の特異的低-分子阻害剤 CGK733により処理した。経時変化実験において、CGK733は特異的 ATM 基質である Chk2のIR-誘導性リン酸化、ならびに p65/RelA 核転座、およびMet タンパク質過剰発現を妨げた。これらのデータはATM キナーゼがIR-誘導性 MET 上方制御のために必要であることを示す (図3)。

40

【0065】

IR-誘導性浸潤性増殖はMetを必要とする

Met 過剰発現は、細胞外リガンドであるHGFの非存在下においてはキナーゼ活性化を意味しない。しかし、それはリガンド-依存性シグナル伝達活性における顕著な上昇を引き起こす (即ち、感作)。これは、低酸素状態が、照射によって誘導されるものに匹敵するまたはそれより低いレベルへとMet 発現をアップレギュレートした細胞において観察された。

【0066】

本発明者らはしたがって、IR-誘導性 Met 過剰発現がMet-依存的生物学的応答を引き起

50

こすかまたは増強することができるか否かを調べた。これらには浸潤性増殖の生理的および病理学的側面が含まれる。細胞が損傷した組織を再生する能力(即ち、生理的浸潤性増殖)を評価する創傷治癒アッセイにおいて、照射された MDA-MB-231、ならびにMDA-MB-435Sは、創傷の端から離れること、および傷ついた部位にわたって遊走することによって、治癒プログラムを自発的に行った。24時間モニターされたこの応答は、HGF によって刺激されたものと重複していた。HGFは、細胞解離および運動性を促進するので、「細胞分散因子 (Scatter Factor)」としても知られている。しかし、IRによって引き起こされた治癒応答はHGF自己分泌ループの誘導に起因するものではなかった。というのは照射された細胞は、定量的 PCRによって評価した場合にHGFを発現していなかったからである。本発明者らは、IR-誘導性 Met 過剰発現は1% 血清を補充された培地に存在する少量の HGFに対して細胞を感作すると結論づける。この条件はおそらくは細胞外マトリックスに遍在的に埋め込まれたHGFのインビボでの生理的存在を模倣しているようである。

10

【0067】

照射された細胞を次いでトランスウェルアッセイにおいて評価し、インビボ浸潤、即ち、悪性浸潤性増殖と緊密に関連する、人工基底膜をインビトロで侵す能力を測定した。実際、照射された細胞 (例えば、MDA-MB-231、MDA-MB-435S、またはU-251)は低血清濃度 (1%)の存在下で自発的にトランスウェル基底膜を横切り(図4a)、これもまたHGFによって引き起こされる挙動を模倣していた。

【0068】

IRはMet-誘導性形態形成を侵襲性プロセスへと向かわせる

20

分枝形態形成は、発達の際に三次元器官を生成するためにHGF によって誘導される複雑な生理的プロセスである。この多段階のプログラムは、細胞遊走、増殖および空間再編成を引き起こし、最終的には極性細胞によって覆われた中空の分枝管の生成を導く。研究した細胞株のいくつか、例えば、MDA-MB-435Sは、分枝形態形成プログラムをインビトロで完全に実行することができる。

【0069】

IR への曝露はこれらの細胞を最適以下の濃度の外因性 HGF (5 nM)に対して感作し、これは - 単独では - 分枝形態形成を誘導することができないものである (図4b)。重要なことに、HGFにより刺激された照射された細胞は、細胞が反管腔側面(abluminal surface)から離れ、周囲のマトリックスへと広がったため、顕著に構造変化した小管を作った(図4b)。この挙動は、TNF α に対する応答において起こる異常な形態形成の形態として説明される「三次元分散(scatter)」を想起させる。治療用量のIRは生理的分枝形態形成を異常な侵襲誘発性(pro-invasive)プロセスへと向かわせる可能性がある結論された。

30

【0070】

Met 阻害は細胞をIR-誘導性アポトーシスおよび増殖抑制に対して感作する

EMT/IG プログラムの一部として、Met はPI3-キナーゼ/AKTを含む下流の経路の持続的活性化を介して強力な抗-アポトーシスシグナルを発する。本発明者らはしたがって、MET 上方制御は照射によって誘導される細胞死を妨げることができること、および、逆に、Met 阻害は放射線治療の有効性を上昇させることができることを推論した。

【0071】

40

細胞生存能力の低下(75%まで)がDN30 抗-Met 抗体のFab 断片の存在下で維持された照射された細胞において観察された。DN30 抗-Met 抗体のFab 断片はMET ダウンレギュレーションを誘導し、したがってMET シグナル伝達および生物学的活性を阻害することが知られている(Petrelli et al., PNAS 103: 5090-5, 2006) (図5)。

【0072】

これらの結果は、Met 阻害活性は細胞死を上昇させ、治療後の増殖を再開させる能力を低減することにより、細胞を放射線治療に対して感作することを示す。

【0073】

当然のことであるが、本発明の原理は同じままであるが、構成の詳細および態様は、本発明の範囲を逸脱することなく、単に例示により記載および説明されたことに関して大幅

50

に変動しうる。

【図 1】

1/8

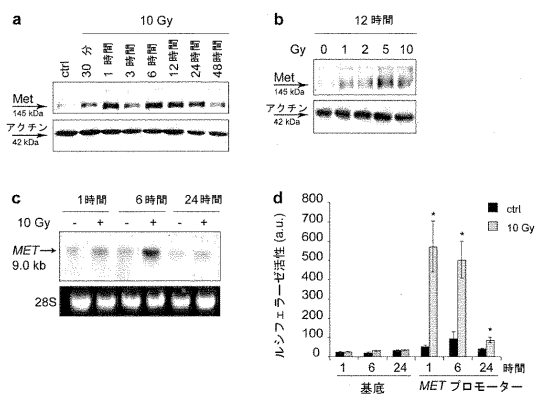


Figure 1

【図 2】

2/8

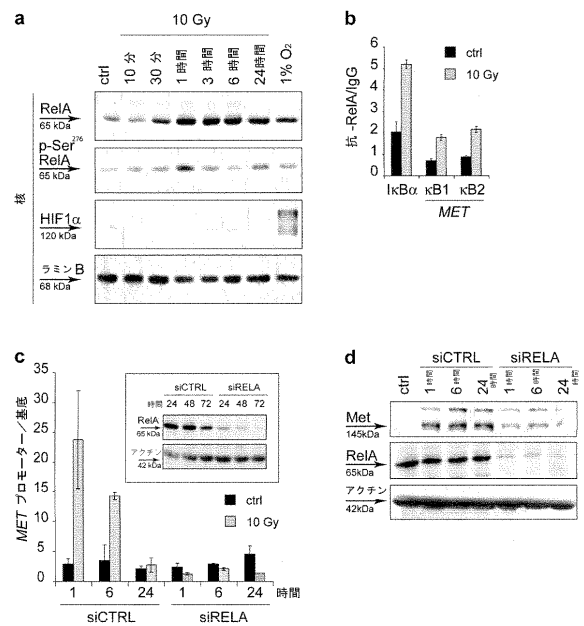


Figure 2

【図 3】

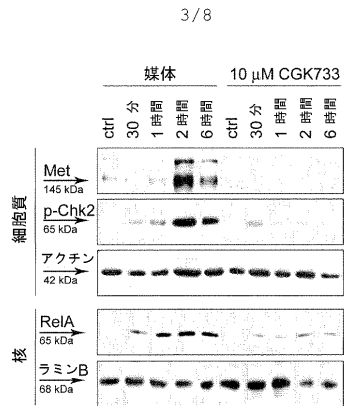


Figure 3

【図 4】

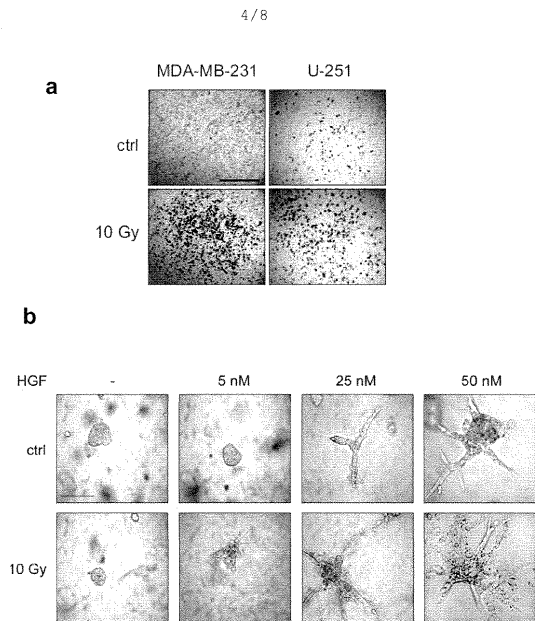


Figure 4

【図 5】

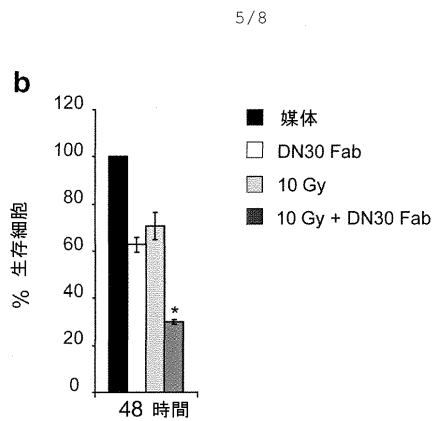


Figure 5

【図 7】

6/8

種別	位置	配列
マウス (Mus musculus)	-1285	ATGGTGTGAAGGACACCTGACTGGGCTGAAAGCTAAGTTCTAACTTTGCC
ヒト (Homo sapiens)	-1285	ATGGTGTGAAGGACACCTGACTGGGCTGAAAGCTAAGTTCTAACTTTGCC
マウス (Mus musculus)	-714	CGTACGGGCT-GT
ヒト (Homo sapiens)	-1235	CCTCTTACTAACCAGCTATGTGACTCTCCTGGGAACCTTTTAGGGACTCAG
マウス (Mus musculus)	-702	TTTATTGATCTGCAAAAT-GATTCCTGCGAGGCTCCAAACTGTAAATAG
ヒト (Homo sapiens)	-1185	TTTCTTTACCTGCAAAAT-GGTTCAATGCAAGACTTTAGTAACGTAATGG
マウス (Mus musculus)	-653	GAACTTTCCTTTTCCATCAAACTGAGGAGTGGTGAGGTAACCGCTCTTG
ヒト (Homo sapiens)	-1087	GAACTTTCCTTTTCCATCAAACTGAGGAGTGGTGAGGTAACCGCTCTTG

Figure 7

【図 6】

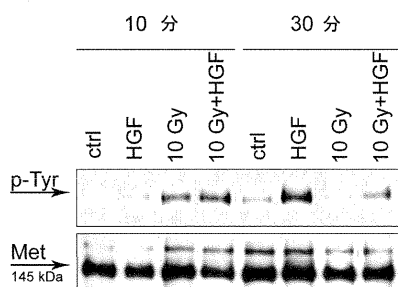


Figure 6

【図 8】

7/8

a) - 配列番号 1 1

```

atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagacaacag ctacagatgg ccactccacg 60
gtccaactgc agcagcctgg gactgaactg gtgaagctgt gggcttcagt gaagctgtcc 120
tgcaaggctt ctggctacac ctccaccagt tactggatac actgggtgaa gcagaggcct 180
ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatccctagca gcgctcgtag taactacaac 240
gagaaatcca agaaacaagg cactgtgact gtagacaagt ctccaccac agcctacatg 300
caactcaaga acctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag tagggggtac 360
tggggccaaag gcaccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacagcccc atcggtctat 420
ccactggccc ctgtgtgtgg aaatacaact gctcctcctg tgactctagg atgcctggtc 480
aagggttatt tccctgagcc agtgaacctg acctggaact ctggatccct gtccagtgg 540
gtgcacacct tcccagctgt cctgcagctc gactctcaca cctcagcag ctacgtgact 600
gtaacctcga gcacctggcc cagccagctc atcactcgca atgtggccca ccgggcaagc 660
agcaccaagg tggacaagaa aattgagccc agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca 720
tgcaaatgcc cagcaccata cctcttgggt ggaccatccg tcttcattct cctccaaag 780
atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc cccatagcca catgtgtgtt ggtgatgtg 840
agcgaagatg acccagatgt ccagatcagc tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca 900
gctcagacac aaacctcatg agaggattac aacagtactc tccgggtgtt cagtgcctcc 960
cccatccagc accaggactg gatgagtggc aaggagttca aatgcaaggt caacaacaaa 1020
gacctcccag cgcccatcga gagaacctc tcaaaaccca aagggtcagt aagagctcca 1080
cagggtatgt tcttgctccc accagaagaa gagatgacta agaaacaggt caactcgacc 1140
tgcatgggta cagacttcac gctgaagac atttactcgg agtgagccaa caacgggaaa 1200
acagagctaa actacaagaa cactgaacca gtccctggact ctgattgggt ttacttcagt 1260
tacagcaagc tgagagtga aaagaagaac tgggtggaaa gaaatagcta ctccgttca 1320
gtggtccacg aggggtctga caatcacacc acgactaaga gottctcccg gactccgggt 1380
aaatga 1386

```

b) - 配列番号 1 0

```

MGWSYIILFLVATADGHSQVLQQPOTELVKPGASVKLSCKASGYTFISYWHWVKQRPGQGLEWIGFINPSSGRIT
YNEKFRNKVTVTVDKSSTTAIMQLSNLTSEDSAVYYCARSGTWGGTILLVSSAKTTAPSVFIAPVCONITGSSYTL
GCLIKGYTFEFTILTNWGGLSGVHFFRAVLQSDLTLLSSSVTVVSSWFSQSDITCNVAHPASSTKYDKSIEPRGPT
IKPCPECKCPAENLLGGFSEVFIFFPKIKDVLMISLSPITVCVVVDVSEDDPDVQISMEVNNVEVHTAQTCQTHREDYNS
TLRVVSALPIQHQQWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKQVTLTCMVTDMPED
IYVEWINNGKTELNYKNTFVLDSGSEYFMYSKLREKKNMVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

```

Figure 8

【図 9】

8/8

a) - 配列番号 1 9

```

atggagacag acacaatect gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactgg 60
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 120
atctcctgca aggcagacca aagtattgat tatgatgggt gtatattatat gatttggttc 180
caacagagac caggacagcc acccaaatc ctoatctctg ctgcattccaa tctagaatct 240
gggatcccaag ccagggttag tggcagtggc tctgggacag acttaacct caatatecat 300
cctgtggag aggagagatg tgcaacctat tactgtcagc aaagtatatg ggaatccgctc 360
acgttcgggt ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 420
atcttccacc catcagtgca gcagttaaac tctggagggt cctcagtcgt gtgcttctg 480
aacaacttct accccaaga catcaatgtc aagtggaaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540
aatggcgctc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaa agacgaaccta cagcatgagc 600
agcacacctca cgttgaccaa ggacgagatg gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660
actcacaaga catctacttc acccattgtc aagagettca acaggaatga gtgttag 717

```

b) - 配列番号 1 8

```

METDTILLVLLLVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLQQRATISCKASQSVVDYDGGSYVSNFQQRPGQPKLLISAASNL
ESGIPARFSGSGSDTFTLNHPVEEDVATYYCQGSYEDPLTFGAGTKLELRRAADAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV
VCFLEWNIYFKDINVKKWIDGSEKQGVLSWTDQSRKSTISMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHRTSTSPIVKSFN
RNEC

```

Figure 9

【配列表】

2012196206000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)		A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 7
A 6 1 K 47/34 (2006.01)		A 6 1 K 47/34	4 H 0 4 5
A 6 1 K 47/48 (2006.01)		A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 47/42 (2006.01)		A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 9/08 (2006.01)		A 6 1 K 9/08	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)		A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)		A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)		A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)		A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)		A 6 1 P 11/00	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)		C 0 7 K 16/28	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/08	

- (72)発明者 カルラ・ボッカッチョ
イタリア、イー１０１３３トリノ、ストラーダ・デッラ・クレウサ８６番
- (72)発明者 パオロ・マリア・コモリオ
イタリア、イー１０１３３トリノ、ストラーダ・ヴァル・サリーチェ１８３／８番
- (72)発明者 フィオレッラ・ペトロンツェッリ
イタリア、イー００１２８ローマ、ヴィア・ルイジ・キアリーニ３１７番
- (72)発明者 リータ・デ・サンティス
イタリア、イー０００４０ポメツィア（ローマ）、ヴィア・カーサ・セレナ５６番

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA53 CA04 DA02 EA04 FA02 GA11 HA03
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01
4C076 AA12 BB11 CC27 EE23Q EE41Q EE59Q FF11 FF36 FF63
4C084 AA13 MA16 MA66 ZA011 ZA012 ZA591 ZA592 ZA891 ZA892 ZA941
ZA942 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC201 ZC202
4C085 AA14 BB31 BB41 CC02 CC23 DD13 DD21 DD62 EE01 EE07
GG01
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 MA16 MA66
NA13 NA14 ZA01 ZA59 ZA89 ZA94 ZB26 ZB27 ZC20
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA16 MA66 NA13 NA14 ZA01 ZA59
ZA89 ZA94 ZB26 ZB27 ZC20
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA20 FA74

MET inhibitors for enhancing radiotherapy efficacy

FIELD OF THE INVENTION

5 The present disclosure concerns the use of MET inhibitors for enhancing the efficacy of radiotherapy in patients suffering from cancers.

TECHNICAL BACKGROUND

10 Although successfully employed to treat cancer patients, radiotherapy can fail to eradicate the tumour, which relapses with a more aggressive phenotype. Consistently, a paradoxical pro-metastatic effect of ionizing radiation (IR) has been unveiled by classical
15 studies in animal models. Tumour progression after radiotherapy could result from positive selection of the "cancer stem cell" subpopulation, which is intrinsically radioresistant. However, striking evidence indicates that, aside from selection, IR
20 promotes an adaptive phenotype aimed at tissue regeneration, which can turn out in metastatic behaviour. This phenotype is defined as the "stress-and-recovery" response to DNA damage, occurring both at the single cell and tissue level. In single cells,
25 detection of DNA damage elicits specific molecular mechanisms, mostly orchestrated by the ATM-p53 axis, which block replication and activate DNA repair. If the damage is irreversible, a normal cell is programmed to execute apoptosis, or to hibernate its proliferative
30 ability through senescence. However, after death of mutant cells, tissues must restore an adequate cell number and pattern, so as to recover the original structure and function. Thus, regeneration (or "wound healing") is initiated by surviving cells, either
35 normal or neoplastic. As observed *in vitro*, this

- 2 -

process includes steps such as detachment from the wound border, acquisition of a fibroblast phenotype, migration into the scratched area, and, possibly, proliferation. The entire program has been referred to
5 as "epithelial-mesenchymal transition" (EMT), a terminology underscoring morphological features. More recently, this program has also been defined as "invasive growth" (IG), a wording that emphasizes functional aspects relevant for cancer. It is now
10 widely accepted that EMT/IG is a physiological program for tissue development and regeneration, which is usurped by cancer cells to perform invasion and metastasis. EMT/IG is activated in cancer cells (a) sometimes, as result of genetic lesions supporting
15 clonal selection; (b) more often, as result of an adaptive response to adverse environmental conditions.

Thus, EMT/IG is a genetic program ultimately controlled by a few specific transcription factors, and orchestrated by a handful of extracellular signals. The
20 latter include scatter factors, such as Hepatocyte Growth Factor (HGF) and Macrophage Stimulating Protein (MSP), which bind tyrosine kinase receptors belonging to the Met family.

25 **OBJECT AND SUMMARY OF THE INVENTION**

The need is therefore felt for improved solutions for enhancing efficacy of radiotherapy in patients suffering from tumors.

The object of this disclosure is providing such
30 improved solutions.

According to the invention, the above object is achieved thanks to the subject matter recalled specifically in the ensuing claims, which are understood as forming an integral part of this
35 disclosure.

- 3 -

An embodiment of the invention provides the use of a Met inhibitor in the treatment of a patient suffering from a tumor, preferably a tumor presenting a deregulated Met pathway, wherein the Met inhibitor is
5 selected from:

- i) an anti-Met monoclonal antibody,
- ii) a genetically engineered antibody containing the complementarity determining regions (CDRs) of the anti-Met monoclonal antibody, and
- 10 iii) a fragment of (i) or (ii) containing the complementarity determining regions (CDRs) of the anti-Met monoclonal antibody, or combinations thereof, wherein the Met inhibitor is able to induce down-regulation of the receptor encoded by the *MET* gene and
15 reduces and/or abrogates patient's resistance to radiotherapy.

In a preferred embodiment the anti-Met monoclonal antibody is DN30 anti-Met monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line ICLC PD 05006.

- 20 In a further preferred embodiment the complementarity determining regions (CDRs) contained in a) the genetically engineered antibody or b) the fragments of the anti-Met monoclonal antibody or of the genetically engineered antibody are the CDRs of DN30
25 anti-Met monoclonal antibody whose amino acid sequences are set forth in SEQ ID No.: 12 to 14 and 20 to 22.

Another embodiment of the present disclosure concerns a nucleotide sequence encoding a Met inhibitor for use in the treatment (e.g. by gene-therapy) of a
30 patient suffering from a tumor, preferably a tumor presenting a deregulated Met pathway, said Met inhibitor being selected from:

- i) an anti-Met monoclonal antibody,
- ii) a genetically engineered antibody containing
35 the complementarity determining regions (CDRs) of the

- 4 -

anti-Met monoclonal antibody, and

iii) a fragment of (i) or (ii) containing the complementarity determining regions (CDRs) of the anti-Met monoclonal antibody, or combinations thereof,

5 wherein said Met inhibitor is able to induce down-regulation of the receptor encoded by the *MET* gene and reduces and/or abrogates patient's resistance to radiotherapy.

10 In a preferred embodiment the anti-Met monoclonal antibody is DN30 anti-Met monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line ICLC PD 05006.

15 In a preferred embodiment the complementarity determining regions (CDRs) contained in the nucleotide sequences encoding a) the genetically engineered antibody or b) the fragments of the anti-Met monoclonal antibody or of the genetically engineered antibody are the CDRs of DN30 anti-Met monoclonal antibody whose amino acid sequences are set forth in SEQ ID No.: 12 to 14 and 20 to 22.

20 According to a preferred embodiment, the Met inhibitor is for administration i) in the form of soluble protein by injection or infusion or ii) by means of a vector for systemic or intra-tumor administration.

25 According to a further preferred embodiment, the Met inhibitor is in form of a Fab fragment optionally conjugated with at least one stabilizing molecule, wherein the stabilizing molecule is selected from polyethylenglycol, albumin binding domain, albumin.

30 The present disclosure discloses that irradiation upregulates *MET* expression (oncogene known to drive "invasive growth" of cancer), which in turn promotes cell invasion and protects cells from radiation-induced apoptosis. Thus, abrogation of *MET* expression or
35 inhibition of its kinase activity by specific compounds,

- 5 -

i.e. specific Met inhibitors, promote apoptosis and counteract radiation-induced invasiveness, thus enhancing efficacy of radiotherapy.

5 **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

The invention will now be described, by way of example only, with reference to the enclosed figures, wherein:

- **Figure 1. IR induces *MET* transcription.**

10 **a**, Met protein in MDA-MB-435S at the indicated time-points after irradiation (10 Gy). **ctrl**, Met at time zero. **b**, Met protein in MDA-MB-435S 12 h after irradiation (1-10 Gy). **c**, *MET* transcript in MDA-MB-435S at the indicated time-points after irradiation (10 Gy).
15 **d**, Luciferase activity driven by the *MET* promoter (basic, promoterless construct) in MDA-MB-231 at the indicated time-points after irradiation (10 Gy; **ctrl**, non-irradiated cells). Columns: mean of triplicate analyses of two independent experiments $\pm$ s.e.m. (*
20 $p < 0.05$, $n = 6$, paired t -test). a.u., arbitrary units.

- **Figure 2. IR-induced *MET* transcription requires NF- κ B.**

a, Protein nuclear accumulation in MDA-MB-435S analyzed at the indicated time-points after irradiation (10 Gy),
25 or after 24 h culture in hypoxia (1% O₂). **ctrl**, non-irradiated cells at time zero. **b**, Chromatin immunoprecipitation in irradiated MDA-MB-231 (10 Gy; **ctrl**, non irradiated cells). Columns represent the ratio between anti-p65/RelA and nonspecific IgG
30 immunoprecipitation of each NF- κ B binding sequence (κ B1 or κ B2) in the *MET* promoter (mean $\pm$ s.e.m. of triplicate analyses). The *NFKBIA* (I κ B α) promoter was used as positive control. **c**, *MET* promoter activity in MDA-MB-231, silenced for p65/RelA expression (siRELA;
35 siCTRL, control), and irradiated (10 Gy; **ctrl**, non-

- 6 -

irradiated cells). Columns represent the ratio between *MET* promoter-driven and promoterless (basic) luciferase expression (mean of triplicate analyses in three independent experiments $\pm$ s.e.m). Inset: p65/RelA protein after siRNA transfection. **d**, Met protein accumulation in MDA-MB-435S silenced for p65/RelA expression (siRELA; siCTRL, control), at the indicated time-points after irradiation (ctrl, non-irradiated cells at time zero).

10 - **Figure 3. IR-induced *MET* expression requires ATM kinase activation.**

Met protein expression, Chk2 phosphorylation (p-Chk2) and p65/RelA nuclear translocation in MDA-MB-435S treated with the ATM kinase inhibitor CGK733, and
15 extracted at the indicated time-points after irradiation. ctrl, non-irradiated cells at time zero.

- **Figure 4. IR-induced invasive growth requires Met.**

a, Basement membrane invasion by irradiated MDA-MB-231 or U-251 (10 Gy; ctrl, control). Micrographs of
20 transwell filters (10X). **b**, Aberrant Met-induced branching morphogenesis in irradiated MDA-MB- 435S (10 Gy; ctrl, control), cultured with or without (-) the indicated HGF concentrations. Scale bar: 100 μ m.

- **Figure 5. Met inhibition sensitizes cells to IR-induced apoptosis and proliferative arrest.**

Viability of U-251 irradiated with 10 Gy and/or cultured in the presence of the Fab fragment of the DN30 anti-Met antibody, for 48 h (vehicle: non-irradiated cells). Columns: mean of triplicate analyses
30 of three independent experiments $\pm$ s.e.m. (* $p < 0.05$, viability significantly reduced with respect to either Fab-DN30 or 10 Gy alone, $n = 9$, paired t -test). Columns: percentage of cells generating clones (mean of triplicate analyses of two independent experiments $\pm$
35 s.e.m., * $p < 0.05$, $n = 6$, paired t -test).

- 7 -

- **Figure 6. IR induces Met phosphorylation.**

Met phosphorylation in MDA-MB-231 treated with HGF (50 nM) and/or IR (10 Gy) Cells were immunoprecipitated with anti-Met antibodies at the indicated time-points and
5 analyzed by western blot with anti-phospho-Tyr antibodies (p-Tyr). Met was shown as control of protein immunoprecipitation. ctrl, cells treated with HGF negative control (see Methods)

- **Figure 7 Alignment of mouse and human *MET* promoter.**

10 The human *MET* promoter (GenBank accession N°: AF046925) was analyzed with the TRANSFAC 7.0 software (Biobase Biological Database GmbH, Wolfenbuttel, Germany) for identification of transcription factor binding sites. Two putative NF- κ B binding sites (κ B1 and κ B2) were
15 found. Alignment of the human and mouse (Gene ID: 17295) *MET* promoter shows that the κ B2 site (-1149/-1136 in the human sequence, rectangle) is highly conserved between the two species.

- **Figure 8: Nucleic acid (a) and amino acid (b) sequence of DN30 monoclonal antibody heavy chain.** The
20 CDR regions are underlined both in the nucleotide and amino acid sequences.

- **Figure 9: Nucleic acid (a) and amino acid (b) sequence of DN30 monoclonal antibody light chain.** The
25 CDR regions are underlined both in the nucleotide and amino acid sequences.

DETAILED DESCRIPTION OF EMBODIMENTS OF THE INVENTION

The present invention will now be described in
30 detail in relation to some preferred embodiments by way of non limiting examples.

In the following description, numerous specific details are given to provide a thorough understanding of embodiments. The embodiments can be practiced
35 without one or more of the specific details, or with

- 8 -

other methods, components, materials, etc. In other instances, well-known structures, materials, or operations are not shown or described in detail to avoid obscuring aspects of the embodiments.

5 The headings provided herein are for convenience only and do not interpret the scope or meaning of the embodiments.

 Besides damaging intracellular targets, ionizing radiation (mostly through generation of Reactive Oxygen
10 Species) tunes the activity of regulatory molecules, which control the stress-and-recovery biological response.

 Transcriptional upregulation of the *MET* oncogene emerges as a crucial event in this response, resulting
15 in the execution of a pro-survival and regenerative program that counteracts radiation-induced damage. This disclosure shows that IR-induced *MET* upregulation is controlled by a signal transduction pathway elicited by the protein kinase ATM following detection of DNA
20 lesions. This pathway involves nuclear export of the ATM kinase and release of the transcription factor NF- κ B from inhibition. Remarkably, it is known that activation of NF- κ B by DNA damage plays a key role in the defensive response against radiation, as NF- κ B is a
25 prominent regulator of anti-apoptotic genes. It has been proposed that cell survival promoted by NF- κ B is so effective as to induce "adaptive resistance" of cancer cells to radiotherapy. The present inventors now show that the adaptive response to radiation sustained
30 by NF- κ B crucially involves the *MET* proto-oncogene.

MET induction by IR is a biphasic transcriptional event, mediated by binding of NF- κ B to the two κ B specific response elements located in the *MET* promoter. The early transcriptional response occurring within 1-2
35 h after irradiation likely relies on activation of NF-

- 9 -

κB by the intrinsic pathway driven by the DNA damage sensor-ATM. Conceivably, IR-induced Met overexpression is *per se* sufficient to elicit signal transduction in the presence of physiological concentrations of the ubiquitous ligand HGF, as shown in the case of hypoxia-induced Met overexpression. The late and sustained *MET* upregulation - prolonged over 24 h - is also likely to be supported by multiple extrinsic signalling pathways impinging on NF-κB. In fact, irradiation promotes expression of cytokines including TNF-α, IL-1 and IL-10 that, on one hand, are NF-κB targets, and, on the other hand, stimulate NF-κB transcriptional activity. The present inventors consider that, in living tissues, irradiation induces autocrine/paracrine loops reverberating on NF-κB that propagate waves of survival signals throughout the damaged tissue.

Remarkably, it is known that the transcriptional response to NF-κB includes, in addition to pro-survival genes, molecules responsible for EMT/IG. The combined execution of pro-survival and EMT/IG genetic programs acts as a double-edge sword: in normal tissues, these programs result in survival and regeneration after damage; in cancer cells, they foster progression towards malignancy.

The *MET* proto-oncogene meets the criteria for being a critical NF-κB target, required for orchestrating both the bright and the dark side of the stress-and-recovery responses. As it is shown in the instant disclosure, on one hand, IR-induced Met overexpression enables cells to heal wounded monolayers. On the other hand, IR stimulates cells to cross basement membranes, a typical hallmark of malignant tumours. Even more strikingly, it is reported that IR turns the physiological process of Met-induced branching morphogenesis into disorganized cell

- 10 -

dissemination throughout a tridimensional matrix. In all cases, although several NF- κ B target genes are expressed in irradiated cells, through *MET* knock-down or functional inhibition, the present inventors show
5 that Met is required for both physiological invasive growth (wound healing) and malignant invasive growth (invasiveness). The reported aggressiveness of tumours relapsing after irradiation may, thus, involve activation of the EMT/IG program under a tight control
10 of the *MET* oncogene.

The observation that Met is implied in the anti-apoptotic, regenerative and invasive response to IR has important therapeutic consequences: combination of radiotherapy with Met inhibition radiosensitizes cancer
15 cells, while preventing pro-invasive collateral effects. Indeed the present disclosure shows that Met inhibition significantly impairs cell survival and clonogenic ability after exposure to therapeutic doses of IR. Most importantly, being expressed in the stem/progenitor compartment of several normal tissues, *MET* is
20 conceivably expressed also in cancer stem cells, which often derive from direct transformation of normal stem cells or proliferating progenitors. IR-induced Met expression and activation support cancer (stem) cell radioresistance and invasive ability, thus increasing
25 the chance of their positive selection and dissemination.

Therefore, Met inhibition (by means of administration of the Met inhibitor in form of soluble
30 protein or by gene-therapy i.e. administration of a vector encoding the Met inhibitor as defined in the following) in combination with conventional therapies, i.e. radiotherapy, is a further strategy to eradicate cancer.

35 In the present disclosure with the expression "Met

- 11 -

inhibitor" is meant an anti-Met monoclonal antibody, derivatives and/or fragments thereof able to induce down-regulation of the receptor encoded by the MET gene. In a preferred embodiment the "Met inhibitor" is DN30 anti-Met monoclonal antibody, derivatives and/or fragments thereof which are able to induce down-regulation of the receptor encoded by the MET gene

With the expression "antibody derivative" is meant a molecule containing the Complementary Determining Regions (CDRs) of the antibody, such as a genetically engineered or humanized antibody containing the CDRs of the antibody or a peptide containing the CDRs of the antibody.

With the expression "antibody fragment" is meant a fragment selected from Fv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ fragments of i) the anti-Met monoclonal antibody, and ii) genetically engineered or humanized antibody containing the Complementary Determining Regions (CDRs) of the anti-Met monoclonal antibody.

From a pharmacological viewpoint, the employment of a Fab fragment has both advantages and disadvantages. Fab molecules can be easily produced using simple expression systems including lower eukaryotes and prokaryotes (Chambers RS. *Curr Opin Chem Biol* 2005 9:46-50). Fab molecules are also less immunogenic compared to whole antibodies and their lower molecular weight improves tissue penetration.

A problem in the use of Fab fragments in clinics relates to the short plasma half-life of Fab fragments that is due to higher kidney clearance. This can be circumvented by local administration of the Fab molecule to the tumor site. For therapeutic applications that require systemic delivery and prolonged treatment, actions aimed at incrementing Fab half-life are necessary. In order to get an incremented

- 12 -

Fab half-life, a stabilized form of Fab obtained by conjugation with a stabilizing molecule (that does not modify the antigen binding properties of the Fab fragment) has been realized.

5 Although pegylation is the most consolidated technique (Chapman AP. *Adv Drug Deliv Rev* 2002 54:531-545.), pegylation is not the only possibility for implementing the stability of therapeutic proteins.

10 Alternatively to the chemical modification, the recombinant Fab molecules can be modified at the level of primary nucleotide sequence to incorporate sequences encoding peptides or domains capable to bind with high affinity the serum albumin (Dennis MS, et al., *J Biol Chem* 2002 277:35035-35043; Stork R, et al. *Protein Eng Des Sel* 2007 20:569-576) or can be generated as a chimeric molecule in which one of the chain encoding the Fab is fused in frame with a sequence encoding a protein biologically inactive (e.g. serum albumin (Subramanian GM, et al. *Nat Biotechnol* 2007 25:1411-1419)). Polyethylenglycol, albumin binding domain, 20 albumin, or any other sequence that does not modify the antigen binding properties of the Fab fragment can be used as stabilizing molecules capable to increase the *in vivo* plasma half-life of the Fab fragment.

25 DN30 anti-cMet monoclonal antibody is produced by the hybridoma cell line deposited by Advanced Biotechnology Center (ABC), Interlab Cell Line Collection (ICLC), S.S. Banca Cellule e Colture in GMP, Largo Rosanna Benzi 10, Genova, Italy with accession 30 number ICLC PD 05006.

 Tumors suitable for administration of a Met inhibitor in order to reduce and/or abrogate radiotherapy resistance according to instant disclosure include i) carcinomas, preferably selected between 35 bladder, breast, cholangiocarcinoma, colorectal,

- 13 -

endometrial, esophageal, gastric, head and neck, kidney, liver, lung, nasopharyngeal, ovarian, pancreas/gall bladder, prostate, thyroid, ii) soft tissue sarcoma, preferably selected among Kaposi's Sarcoma, 5 Leiomyosarcoma, MFH/Fibrosarcoma, iii) musculoskeletal sarcoma, preferably selected among osteosarcoma, rhabdomyosarcoma, synovial sarcoma, iv) hematopoietic malignancy, preferably selected among acute myelogenous leukemia, adult T cell leukemia, chronic myeloid 10 leukemia, lymphomas, multiple myeloma, v) other neoplasms preferably selected among brain tumors, melanoma, mesothelioma, Wilms' tumor.

All these tumors present, in fact, a "deregulated Met pathway", wherein this expression means that these 15 tumors are characterized by an aberrant Met signaling due to at least one of i) Met mutations, ii) Met protein overexpression, iii) Met gene amplification, iv) elevated levels of circulating HGF.

20 **Administration of Met inhibitors to human patients**

Anti-Met antibodies will be administered through regimens similar to those adopted for antibodies targeting other receptor tyrosine kinases involved in human malignancies (e.g. Trastuzumab, an antibody 25 against HER-2). Typically, the antibody or a derivative or fragment thereof is administered by intravenous infusion with weekly doses ranging between 5-10 mg/kg, preferably 4-8 mg/kg. For combination with radiotherapy, administration of the anti-Met antibodies will start 30 one week, more preferably one day, before irradiation and continue until one week, preferably until 6 to 48 hours, after the end of radiotherapy.

The cDNA sequences encoding the anti-Met antibody, or derivatives or fragments thereof can be also 35 administered to human patients through "gene therapy"

- 14 -

procedures. The cDNA sequence is cloned in a transduction vector of viral origin (lentiviral, retroviral, adenoviral, etc.) and assembled into a viral particle, capable of specifically targeting tumor
5 or tumor-associated cells, by means of specific surface binding proteins. The viral particle preparation is then produced in a GMP grade facility. This preparation can be either systemically or intratumorally delivered through one single or multiple injections. Tumor
10 tissues transduced by the viral vector will express the proteins encoded by the sequences of the anti-Met antibody, or derivatives or fragments thereof thus providing an auto-inhibitory circuit.

In the following experimental data are provided;
15 the experiments have been conducted using DN30 monoclonal antibody and/or derivatives and/or fragments thereof in order to provide a detailed description of some preferred embodiments without any limiting purpose of the instant invention.

20

Materials and Methods

Cell lines and siRNA. Cell lines (A549, MDA-MB-231, LoVo, MDAMB- 435S, U-87MG, U-251, PC3, SF295, DLD1, SK-N-SH) were from ATCC. For ATM kinase inhibition, cells
25 were pre-treated for 4 h before irradiation and then kept in the presence of CGK733 (10 μ M in DMSO). siRNAs targeting *RELA* (ON-TARGET plus SMART pool L-003533-00 Human *RELA*, NM_021975, Dharmacon, 100 nM), or control siRNAs (ON-TARGET plus SMART pool, siCONTROL Non
30 Targeting siRNA, Dharmacon) were transiently transfected.

The siRNA sequences were as follows.

"SMART pool L-003533-00 Human *RELA* NM_021975" was a 1:1:1:1: mixture of the following duplex sequences:

35

- 15 -

(1) sense: GGAUUGAGGAGAAACGUAAUU (SEQ ID No.:1),
antisense: 5'-NUUUCCUACAAGCUCGUGGGUU (SEQ ID No.:2),

(2) sense: CCCACGAGCUUGUAGGAAAUU (SEQ ID No.:3),
5 antisense: 5'-NUUUCCUACAAGCUCGUGGGUU (SEQ ID No.:4),

(3) sense: GGCUAUAACUCGCCUAGUGUU (SEQ ID No.:5),
antisense: 5'-NCACUAGGCGAGUUAUAGCCUU (SEQ ID No.:6),

10 (4) sense: CCACACAACUGAGCCCAUGUU (SEQ ID No.:7),
antisense: 5'-NCAUGGGCUCAGUUGUGUGGUU (SEQ ID No.:8).

SMART pool, siCONTROL Non Targeting siRNA (one single
duplex sequence):

15 sense: AUGUAUUGGCCUGUAUUAG (SEQ ID No.:9).

DN30 antibody and DN30 Fab fragment production.

DN30 monoclonal antibody was produced as described in
Prat M. et al., 1998, J. Cell Sci 111:237-247, and
20 deposited by Advanced Biotechnology Center with
accession number ICLC PD 05006. The DN30 Fab fragment
was obtained through DN30 papain digestion and affinity
purification (Immunopure Fab Preparation Kit, Pierce).

The aminoacid sequence of DN30 heavy chain is
25 illustrated in Figure 8b and set forth in SEQ ID No:10,
DN30 heavy chain nucleotide sequence is illustrated in
Figure 8a and set forth in SEQ ID No.:11.

The aminoacid sequences corresponding to DN30
heavy chain CDR regions are the following: CDR-H1:
30 GYTFTSYW (SEQ ID NO.:12); CDR-H2: INPSSGRT (SEQ ID
NO.:13); CDR-H3: ASRGY (SEQ ID NO.:14). The nucleotide
sequences corresponding to DN30 heavy chain CDR regions
are the following: CDR-H1: GGCTACACCTTCACCAGTTACTGGA
(SEQ ID NO.:15); CDR-H2: ATTAATCCTAGCAGCGGTCGTACT (SEQ
35 ID NO.:16); CDR-H3: GCAAGTAGG (SEQ ID NO.:17).

- 16 -

The aminoacid sequence of DN30 light chain is illustrated in Figure 9b and set forth in SEQ ID No:18, DN30 light chain nucleotide sequence is illustrated in Figure 9a and set forth in SEQ ID No.:19.

5 The aminoacid sequences corresponding to DN30 light chain CDR regions are the following: CDR-L1: QSVDYDGGSY (SEQ ID NO.:20); CDR-L2: AAS (SEQ ID NO.:21); CDR-L3: QQSYEDPLT (SEQ ID NO.:22). The nucleotide sequences corresponding to DN30 light chain
10 CDR regions are the following: CDR-L1: AAAGTGTGATTATGATGGTGGTAGTTATAT (SEQ ID NO.:23); CDR-L2: GCTGCATCC (SEQ ID NO.:24); CDR-L3: CAGCAAAGTTATGAGGATCCGCTCACG (SEQ ID NO.:25).

15 **In vitro irradiation.** X-rays were emitted by a linear particle accelerator (Clinac 600C/D, Varian) operating at 6 MV.

20 **Western Blot.** Protein expression was investigated in irradiated confluent, serum-starved cells. For fractionation in cytoplasmic and nuclear portions, cells were washed and incubated on ice for 10 min in "buffer A" (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM dithiothreitol, 1 mM
25 phenylmethylsulfonyl fluoride and a cocktail of protease inhibitors). Supernatants, containing the cytoplasmic extracts, were separated by centrifugation. Pellets were resuspended in "buffer B" (20 mM HEPES pH 7.9, 400 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 10%
30 glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and a cocktail of protease inhibitors) and incubated at 4°C for 1 h with vigorous mixing. The resulting nuclear lysates were clarified by high-speed centrifugation. Equal amount of proteins were resolved by SDS-PAGE and
35 analysed by western blot with the following primary

- 17 -

antibodies: mouse anti-human Met (DL21 disclosed in
Prat et al., *Int. J. Cancer* 49, 323-328 (1991)), mouse
anti-p65/RelA and mouse anti-HIF-1 α (BD Biosciences),
rabbit anti-phospho-Ser276 and rabbit anticaspace-3
5 (Cell Signaling), rabbit anti-phospho-Chk2 (T68, R&D
Systems). Goat anti-actin (C-11; Santa Cruz
Biotechnology) and mouse anti-lamin B (Calbiochem) were
used for control of equal cytoplasmic or nuclear
protein loading, respectively. Blot images were
10 captured using a molecular imager (GelDoc XR; Bio-Rad
Laboratories). Densitometric analysis was performed
with Quantity One 1-D (Bio-Rad Laboratories). Western
blots shown are representative of results obtained in
at least three independent experiments.

15

Northern Blot. Confluent cells were serum-starved
for 48 h and irradiated. Total RNA was resolved in 0.8%
agarose-formaldehyde gel, and transferred to nylon
membranes (Amersham) according to standard procedures.
20 The *MET* probe containing the whole coding sequence
(GenBank Accession N. J02958) was obtained from the
pCEV-MET plasmid (see Michieli et al., *Oncogene* 18,
5221-5231 (1999)), and labelled with [α -³²P]dCTP
(Megaprime, Amersham). Hybridization was carried out at
25 42°C for 16 h in the presence of 50% formamide. Nylon
membranes were washed twice with 2X SSC-0.1% SDS, and
twice with 0.1X SSC-0.1% SDS at 42°C, and
autoradiographed.

30

ROS detection. Intracellular ROS generation was
assessed using 5-(and 6)-carboxy-2'-7'-
dichlorofluorescein diacetate (carboxy-H₂DCFDA,
Molecular Probes) according to manufacturer's
instructions. Briefly, cells were seeded in black 96-
35 well plates (3 x 10⁴ cells/well) 24 h before treatment

- 18 -

(IR: 10 Gy; H₂O₂: 100 µM as control). Cells were incubated in the presence of carboxy-H₂DCFDA (10 µM) in phenol red-free DMEM for 1 h at 37°C. Cells were washed, incubated for additional 30 min in phenol red-free DMEM without carboxy-H₂DCFDA, and then irradiated. ROS generation was measured 15 min after irradiation using a fluorescence plate reader (λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 535 nm) (DTX 880 Multimode Detector).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP). 4 x 10⁷ cells were used for 10 ChIPs either for irradiated or control cells. After irradiation (10 Gy), cells were fixed in 1% formaldehyde for 15 min at room temperature, and reaction was stopped with glycine (0.125 M). Fixed cells were washed, collected in ice cold PBS supplemented with a cocktail of protease inhibitors and centrifuged. The cytoplasmic fraction was extracted as above and discarded, and nuclei were pelleted and resuspended in 1 ml of SDS-Lysis Buffer (1% SDS, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8, and a cocktail of protease inhibitors). Nuclei were then disrupted by sonication, yielding DNA fragments with a bulk size of 400-1000 bp. Cell debris were cleared by centrifugation at 14.000 rpm for 10 min at 4°C. The supernatants containing the chromatin preparation were diluted with Dilution Buffer 10X (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8, 167 mM NaCl). Chromatin was then pre-cleared for 1 h at 4°C by adding protein G-sepharose (Amersham, 50% gel slurry supplemented with 0.2 mg/ml of salmon sperm DNA, 0.1% BSA and 0.05% NaN₃). Beads were pelleted by a brief centrifugation at 4000 rpm at 4°C and supernatants were collected. 3% of chromatin preparation was used as Input for ChIP normalisation. ChIP was performed overnight at 4°C with 4 µg of antibodies (anti-p65/RelA, Santa Cruz; total mouse IgG,

- 19 -

Chemicon), followed by incubation with 50 µl of protein G-sepharose beads for 3 h. Beads were washed sequentially on a rotating platform at 4°C with the following solutions (10 min/each): twice with Low-Salt Buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl), twice with High-Salt Buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl), once with LiCl Buffer (0.25 M LiCl, 1% Deoxycholic Acid, 0.5% NP-40, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8), and twice with TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA). ChIPs were eluted twice in EB (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃) and kept overnight at 65°C to reverse formaldehyde cross-linking. Treatment with RNase (50 µg/ml, 37°C for 30 min) and Proteinase-K (500 µg/ml, 45°C for 2 h) were performed. Each sample was purified by phenol/chloroform extraction and finally resuspended in 40 µl of sterile water. 2 µl of each sample were used as template for Real-Time PCR with SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems) on ABI PRISM 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems).

Primers used were as follows:

- NFKBIA (fw: GAACCCAGCTCAGGGTTTAG - SEQ ID No.:26;
25 rev: GGGAATTTCCAAGCCAGTCA - SEQ ID No.:27);

- κB1 (fw: AGGCCAGTGCCTTATTACCA - SEQ ID No.:28; rev:
GCGGCCTGACTGGAGATTT - SEQ ID No.:29);

30 - κB2 (fw: GGGACTCAGTTTCTTTACCTGCAA - SEQ ID No.:30;
rev: GGGACTCAGTTTCTTTACCTGCAA - SEQ ID No.:31).

Wound healing assay. Cells were grown to confluence in 24-well plates, starved for 24 hr, and
35 scratched with a plastic tip. Culture medium was

- 20 -

replaced with fresh medium containing 1% FBS and the vehicle alone (DMSO), and immediately irradiated. After 24 h, cells were fixed with 11% glutaraldehyde (Sigma), and stained with crystal violet. Images were acquired with a Leica photcamera (Leica DFC320, Leica) connected with an inverted light microscope (DM IRB, Leica). Images are representative of results obtained in at least three independent experiments.

Transwell assay. Cell invasion was measured in Transwell™ chambers (BD Falcon). MDA-MB-231 and MDA-MB-435S cells (5×10^5 /transwell) were seeded on the filter upper sides coated with $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of reconstituted Matrigel basement membrane (Collaborative Research). U-251 (10^4 /transwell) were seeded on filters coated with $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Culture medium supplemented with 1% FBS was added to both chambers. 1 h after seeding, cells were irradiated (10 Gy) and incubated at 37°C for 24 h. Cells on the filter upper side were mechanically removed, and those migrated onto the lower side were fixed, stained, and photographed as above. For quantification of cell invasion, ten fields per experimental condition were randomly selected and micrographed as above with a 10X objective. Morphometric analysis was performed using MetaMorph 7.1 software. Images are representative of at least three independent experiments.

Branching morphogenesis assay. MDA-MB-435S spheroids were preformed by single-cell resuspension in 240 mg/ml methylcellulose (Sigma) and culture in nonadherent 96-well plates (Greiner) for 24 h. Spheroids were transferred into a matrix containing 1.3 mg/ml type I collagen from rat tail (BD Biosciences), 10% FBS, and 240 mg/ml methylcellulose. After 24 h,

- 21 -

cells were irradiated and/or cultured in the presence of HGF for 7 days. HGF was obtained as a baculovirus recombinant protein in SF9 cells. The conditioned medium from uninfected cells was used as negative control. Images are representative of results obtained in three independent experiments.

Cell viability assay with DN30 Fab. 10^3 cells were seeded in 96-well plates and grown for 24 h. Culture medium was replaced with medium containing 1% FBS and DN30 Fab (28 $\mu\text{g/ml}$) or the vehicle alone (PBS). After 24 h, cells were irradiated (10 Gy). Cell viability was assessed as above.

15 **Results**

IR induces *MET* transcription

The present inventors have previously shown that the *MET* proto-oncogene is transcriptionally regulated by extra- and intracellular specific signals, including growth factors and the oxygen sensor. Here it is investigated modulation of Met expression by exposure to therapeutic doses of IR (up to 10 Gy).

In ten cell lines derived from neoplastic tissues of different histological types (carcinomas of breast, lung, prostate and colon; melanoma; glioblastoma; neuroblastoma), it has been found that the Met protein level was significantly increased 24 h after irradiation. In representative cell lines (such as MDA-MB-435S and MDA-MB-231), detailed time course experiments revealed a biphasic profile of Met protein accumulation. This is characterized by an early peak of Met induction (~five fold) around 1-2 h, followed by a similar late peak or a plateau, appearing at 6 h, and decreasing 24 h after irradiation (Fig. 1a). Dose-response experiments showed that Met induction starts

- 22 -

after 1 Gy, and reaches a plateau at 5 Gy (Fig. 1b). In irradiated cells, *MET* mRNA accumulation, and activation of the full-length *MET* promoter were also observed (Fig. 1c-d), indicating that IR-induced *MET* overexpression involves a transcriptional mechanism. Interestingly, in MDA-MB-231, a transient and ligand-independent Met autophosphorylation was also detected, occurring within 10 min after exposure to IR, (Fig. 6). The intensity of IR-induced Met phosphorylation was comparable to that elicited by a non-saturating concentration of HGF (50 ng/ml). However, the kinetics of phosphorylation were different, as the peak induced by IR was reached after 10 min, while the peak induced by HGF was reached after 30 min. Concomitant stimulation by IR and HGF was not synergistic (Fig. 6).

IR-induced *MET* transcription requires NF- κ B

IR is known to modulate a few transcription factors including NF- κ B. Accordingly, genome-wide expression profiling showed that, in the cell lines examined, IR induces a prominent early NF- κ B response. For instance, in MDA-MB-231, 9 out of the 33 genes modulated 1 h after irradiation are NF- κ B targets, displaying a frequency ~20 fold higher than expected. Moreover, in time-course experiments with MDA-MB-231, MDA-MB-435S or U-251 cells, IR (10 Gy) induced rapid (within 30 min) and persistent (until 24 h) nuclear accumulation of the NF- κ B subunit p65/RelA, a hallmark of NF- κ B activation (Fig. 2a). Moreover, at early time-points after irradiation, nuclear p65/RelA was transiently phosphorylated at Ser²⁷⁶ (Fig. 2a). This phosphorylation is known to be induced by Reactive Oxygen Species (ROS) via protein kinase A, and to promote p65/RelA interaction with the transcriptional coactivator CBP/p300, which is required for

- 23 -

upregulation of a subset of early target genes. These data indicate that IR promotes functional activation of NF- κ B, through nuclear accumulation and early transient phosphorylation of the p65/RelA subunit.

5 In the *MET* human promoter, two putative NF- κ B binding sites, κ B1, located at -1349/-1340 bp, and κ B2, located at -1149/-1136 bp, with respect to the transcription start site of the sequence (GenBank accession No. AF046925) were identified through *in*
10 *silico* analysis. Interestingly, the κ B2 site is highly conserved in the *met* mouse promoter (Fig. 7; *met* mouse (*mus musculus*) promoter sequence set forth in SEQ ID No.:32 and *met* human (*homo sapiens*) promoter sequence set forth in SEQ ID No.:33). Chromatin
15 immunoprecipitation experiments showed that association of p65/RelA to either site was significantly increased in cells exposed to 10 Gy (Fig. 2b), indicating that *MET* is transcriptionally controlled by NF- κ B in irradiated cells. These findings prompted the present
20 inventors to investigate whether NF- κ B is an absolute requirement for *MET* induction by IR. As p65/RelA is involved in the formation of each of the several NF- κ B heterodimers, thus being critical for the entire NF- κ B-driven transcriptional activity, p65/RelA expression
25 was abrogated through RNA interference. In MDA-MB-231 or MDA-MB-435S treated with siRNA against p65/RelA (SMART pool L-003533-00 Human RELA, SEQ ID No.: 1 to 8), IR could no longer induce the full-length *MET* promoter activity (Fig. 2c), neither accumulation of the Met
30 protein. Taken together, these data provide convincing evidence that IR-induced *MET* upregulation requires activation of the transcription factor NF- κ B.

The involvement of Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) in IR-induced *MET* transcription was also
35 considered, since (a) HIF-1 was shown to be activated

- 24 -

in irradiated cells as result of ROS formation, and (b) HIF-1 is a prominent regulator of *MET* expression. However, the relevance of HIF-1 was minimal, as shown by complementary approaches. First, in MDA-MB-231 and
5 MDA-MB-435S, IR did not induce nuclear translocation of the HIF-1 α subunit, which is the hallmark of HIF-1 activation, otherwise observed when cells were cultured in low oxygen concentration (Fig. 2a). Lack of HIF-1 activation was not due to weak ROS production in
10 irradiated cells, as ROS were increased by $25 \pm 3.5\%$ on average, 15 min after exposure to 10 Gy. This was estimated to correspond to an average 80% ROS induction 2-5 min after irradiation, accordingly to previous observations in cell lines exposed to 1-10 Gy. Moreover,
15 it has been found that IR could not activate the so-called "minimal" *MET* promoter including the two functional Hypoxia Responsive Elements (HRE), and the Ap-1 site, which are responsible for hypoxia-induced *MET* upregulation. Taken together, these data indicate
20 that HIF-1 is not involved in *MET* upregulation by IR. However, it has been observed that hypoxia induced p65/RelA nuclear translocation and serine phosphorylation (Fig. 2a). Finally, the involvement of the transcription factor p53, a prominent IR-target,
25 was ruled out as well. In fact, MDA-MB-435S and MDA-MB-231 (two cell lines displaying the highest *MET* induction by IR) harbour p53 inactivating mutations (G266E and R280K, respectively). Moreover, unlike the mouse promoter, the human *MET* promoter is not
30 upregulated by constitutively active forms of p53.

IR-induced *MET* expression is mediated by ATM kinase activation

NF- κ B is a crossroad of several pathways initiated
35 both by extracellular and intracellular signals. The

- 25 -

latter include those elicited by protein kinase ATM following detection of DNA damage. To investigate whether *MET* induction by IR relies on activation of the ATM kinase, MDA-MB-435S or MDA-MB-231 were treated with
5 10 μ M of the specific small-molecule inhibitor CGK733. In time course experiments, CGK733 prevented IR-induced phosphorylation of the specific ATM substrate Chk2, as well as p65/RelA nuclear translocation, and Met protein overexpression. These data indicate that ATM kinase is
10 required for IR-induced *MET* upregulation (Fig. 3).

IR-induced invasive growth requires Met

Met overexpression does not imply kinase activation in the absence of the extracellular ligand
15 HGF. However, it entails a significant increase in ligand-dependent signalling activity (*i.e.* sensitization). This has been observed in cells where hypoxia upregulated Met expression to a level comparable to, or lower than that induced by
20 irradiation.

The present inventors thus investigated whether IR-induced Met overexpression could elicit or potentiate the Met-dependent biological responses. These include the physiological and pathological sides
25 of invasive growth. In wound-healing assay, assessing the ability of the cell to regenerate injured tissues (*i.e.* physiological invasive growth), irradiated MDA-MB-231, as well as MDA-MB-435S, spontaneously performed the healing program, by detaching from the edge of the
30 wound, and migrating throughout the scratched area. This response, monitored for 24 h, was overlapping with that stimulated by HGF, which is also known as "Scatter Factor", as it promotes cell dissociation and motility. However, the healing response elicited by IR was not
35 due to induction of a HGF autocrine loop, as irradiated

- 26 -

cells did not express HGF as assessed by quantitative PCR. The present inventors conclude that IR-induced Met overexpression sensitizes cells to the small amount of HGF present in the culture medium, which was supplied
5 with 1% serum. This condition likely mimics the physiological presence of HGF *in vivo*, which is ubiquitously embedded in extracellular matrices.

Irradiated cells were then assessed in transwell assays, measuring the ability to trespass an artificial
10 basement membrane *in vitro*, which tightly correlates with *in vivo* invasiveness, i.e. malignant invasive growth. Indeed, irradiated cells (such as MDA-MB-231, MDA-MB-435S, or U-251) spontaneously crossed the transwell basement membrane in the presence of a low
15 serum concentration (1%) (Fig. 4a), again mimicking the behaviour evoked by HGF.

IR turns Met-induced morphogenesis into an invasive process

20 Branching morphogenesis is a complex physiological process, induced by HGF as to generate tridimensional organs during development. This multistep program entails cell migration, proliferation and spatial reorganization, ending up with generation of hollow
25 branched tubules lined by polarized cells. Some of the cell lines studied, such as MDA-MB-435S, can fully execute the branching morphogenesis program *in vitro*.

Exposure to IR sensitized these cells to a suboptimal concentration of exogenous HGF (5 nM) that -
30 alone - is incapable of inducing branching morphogenesis (Fig. 4b). Importantly, irradiated cells stimulated with HGF built tubules with remarkable structural alterations, as cells disengaged from the abluminal surface and spread into the surrounding
35 matrix (Fig. 4b). This behaviour is reminiscent of the

- 27 -

"tridimensional scatter" described as a form of aberrant morphogenesis occurring in response to $\text{TNF}\alpha$. It was concluded that therapeutic doses of IR may turn physiological branching morphogenesis into an aberrant
5 pro-invasive process.

Met inhibition sensitizes cells to IR-induced apoptosis and proliferative arrest

As part of the EMT/IG program, Met emanates
10 powerful anti-apoptotic signals through sustained activation of downstream pathways including PI3-kinase/AKT. The present inventors thus reasoned that *MET* upregulation could prevent cell death induced by irradiation, and that, conversely, Met inhibition could
15 increase the efficacy of radiotherapy.

A cell viability decrease (up to 75%) was observed in irradiated cells that were kept in the presence of the Fab fragment of the DN30 anti-Met antibody, which is known to induce MET down-regulation, thus inhibiting
20 MET signalling and biological activities (Petrelli et al., PNAS 103: 5090-5, 2006) (Fig. 5).

These results indicate that Met inhibition activity sensitizes cells to radiotherapy, by increasing cell death and reducing the ability to
25 resume proliferation after treatment.

Naturally, while the principle of the invention remains the same, the details of construction and the embodiments may widely vary with respect to what has been described and illustrated purely by way of example,
30 without departing from the scope of the present invention.

CLAIMS

1. Met inhibitor for use in the treatment of a patient suffering from a tumor, said Met inhibitor
5 being selected from:

- i) an anti-Met monoclonal antibody,
- ii) a genetically engineered antibody containing the complementarity determining regions (CDRs) of the anti-Met monoclonal antibody, and
- 10 iii) a fragment of (i) or (ii) containing the complementarity determining regions (CDRs) of the anti-Met monoclonal antibody, or combinations thereof,

wherein said Met inhibitor is able to induce down-regulation of the receptor encoded by the *MET* gene and
15 reduces and/or abrogates patient's resistance to radiotherapy.

2. Nucleotide sequence encoding a Met inhibitor for use in the treatment of a patient suffering from a tumor, said Met inhibitor being selected from:

- 20 i) an anti-Met monoclonal antibody,
- ii) a genetically engineered antibody containing the complementarity determining regions (CDRs) of the anti-Met monoclonal antibody, and
- 25 iii) a fragment of (i) or (ii) containing the complementarity determining regions (CDRs) of the anti-Met monoclonal antibody,

wherein said Met inhibitor is able to induce down-regulation of the receptor encoded by the *MET* gene and
30 reduces and/or abrogates patient's resistance to radiotherapy.

3. Met inhibitor or nucleotide sequence encoding a Met inhibitor according to claim 1 or claim 2, wherein said Met inhibitor is selected from:

- i) DN30 anti-Met monoclonal antibody,
- 35 ii) a genetically engineered antibody containing

- 29 -

the complementarity determining regions (CDRs) of DN30 anti-Met monoclonal antibody, said CDRs having the amino acid sequences set forth in SEQ ID NO.: 12 to 14 and 20 to 22, and

5 iii) a fragment of (i) or (ii) containing the complementarity determining regions (CDRs) of DN30 anti-Met monoclonal antibody, said CDRs having the amino acid sequences set forth in SEQ ID NO.: 12 to 14 and 20 to 22, or combinations thereof,

10 wherein said DN30 anti-Met monoclonal antibody is produced by the hybridoma cell line ICLC PD 05006.

4. Met inhibitor according to claim 1 or claim 3, wherein said Met inhibitor is for administration in the form of soluble protein by injection or infusion.

15 5. Nucleotide sequence encoding said Met inhibitor according to claim 2 or claim 3, wherein said nucleotide sequence encoding said Met inhibitor is for administration by means of a vector, wherein said vector is in form of a particle.

20 6. Nucleotide sequence encoding said Met inhibitor according to claim 5, wherein said vector is suitable for targeting tumor or tumor-associated cells.

7. Nucleotide sequence encoding said Met inhibitor according to claim 5 or claim 6, wherein said vector is
25 for systemic or intra-tumor administration, preferably by injection.

8. Met inhibitor or nucleotide sequence encoding a Met inhibitor according to any one of the preceding claims, wherein said fragment is a Fab fragment,
30 preferably a Fab fragment comprising at least one stabilizing molecule.

9. Met inhibitor or nucleotide sequence encoding a Met inhibitor according to claim 8, wherein said at least one stabilizing molecule is selected from
35 polyethylenglycol, albumin binding domain, albumin.

10. Met inhibitor or nucleotide sequence encoding a Met inhibitor according to any one of the preceding claims, wherein said Met inhibitor and/or said nucleotide sequence encoding said Met inhibitor is for
5 administration at least one week before subjecting said patient to radiotherapy.

11. Met inhibitor or nucleotide sequence encoding a Met inhibitor according to any one of the preceding claims, wherein said Met inhibitor and/or said
10 nucleotide sequence encoding said Met inhibitor is for administration one day before subjecting said patient to radiotherapy.

12. Met inhibitor or nucleotide sequence encoding a Met inhibitor according to any one of the preceding
15 claims, wherein said Met inhibitor and/or said nucleotide sequence encoding said Met inhibitor is for administration until at least one week, preferably 6 to 48 hours, after the end of radiotherapy.

13. Met inhibitor or nucleotide sequence encoding
20 a Met inhibitor according to any one of the preceding claims, wherein said tumor is selected among a carcinoma, a musculoskeletal sarcoma, a soft tissue sarcoma, a hematopoietic malignancy, a brain tumor, melanoma, mesothelioma, Wilms' tumor.

ABSTRACT

Met inhibitor and/or nucleotide sequence encoding
a Met inhibitor for use in the treatment of patients
5 suffering from a cancer for reducing and/or abrogating
patients' resistance to radiotherapy, wherein the Met
inhibitor is selected among: i) an anti-Met monoclonal
antibody, ii) a genetically engineered antibody
containing the complementarity determining regions
10 (CDRs) of the anti-Met monoclonal antibody, and iii) a
fragment of (i) or (ii) containing the complementarity
determining regions (CDRs) of the anti-Met monoclonal
antibody, or combinations thereof.

15 (Figure 5)

1/8

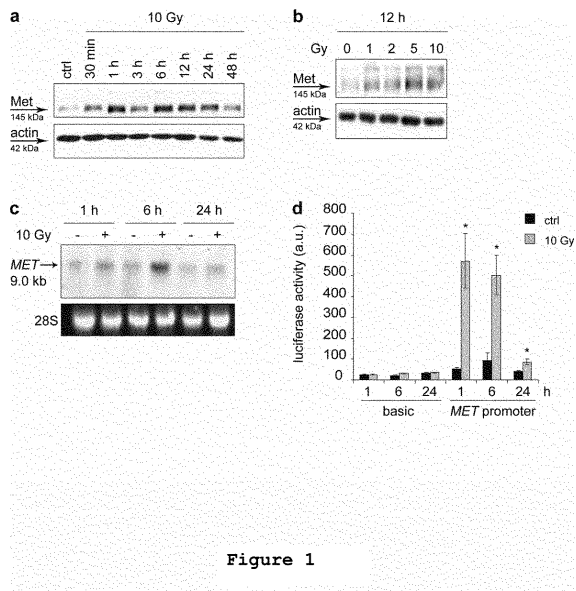


Figure 1

2/8

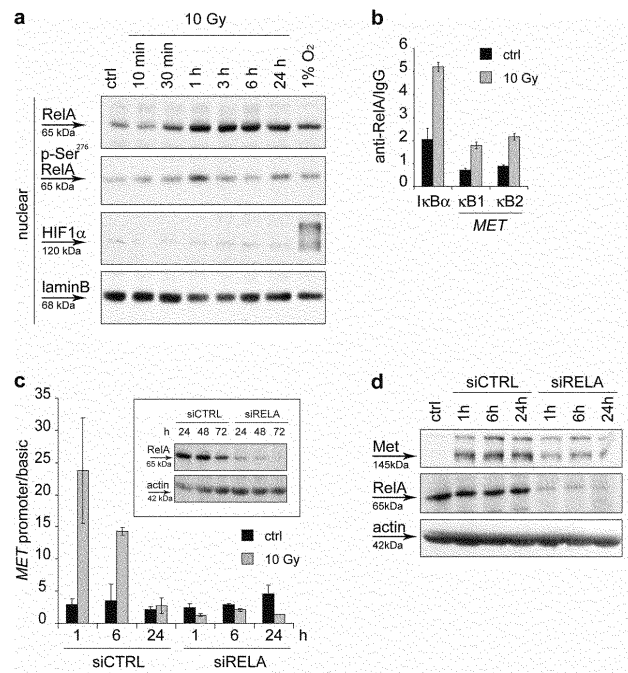


Figure 2

3/8

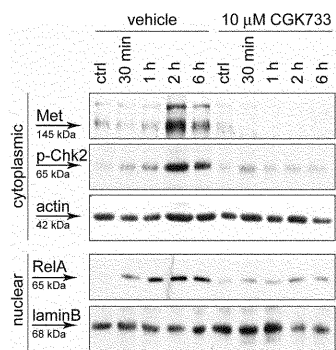


Figure 3

4/8

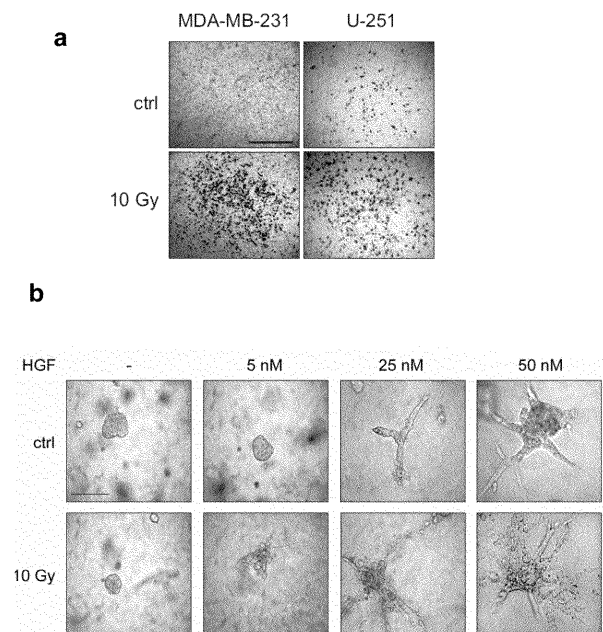


Figure 4

5/8

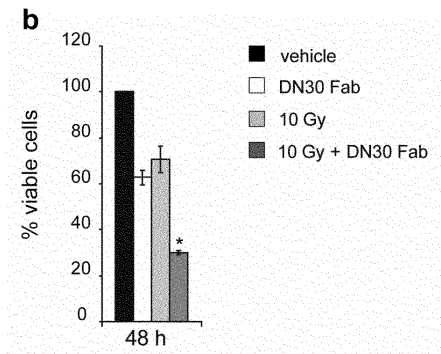


Figure 5

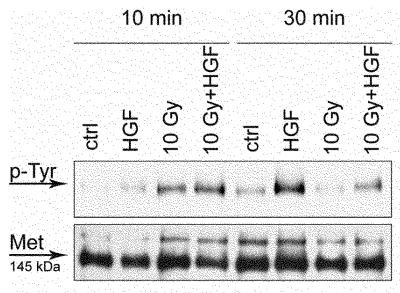


Figure 6

7/8

a) - SEQ ID No.:11

```
atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtatcaacag ctacagatgg ccactcccag 60
gtccaactgc agcagccctg gactgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagctgtcc 120
tgcaaggctt ctgggtacac ctccaccagt tactggatac actgggtgaa gcagagccct 180
ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctagca ggggtcgtac taactacaac 240
gagaattca agaacaaggt cacagtgaat gtatgacaaat ctccaccac agcctacatg 300
caactcagca acctgacatc tgaggactct ggggtctatt actgtgcaag taggggtcac 360
tggggccaag gcaacctctc cacagtctcc tcagccaaaa caacagcccc atcgtcttat 420
ccactggccc ctgtgtgtgg aaatacaact ggctcctcgg tgactctagg atgcctgttc 480
aagggttatt tccttgagcc agtgaccttg acctggaact ctggatccct gtccagtgtg 540
gtgcacacct tcccagctgt cctgcaagtc gacctctaca cctcagcag ctacagtgaat 600
gtaacctcga gcaacctggc cagcgaagtc atcactctga atgtggccca cccggcaagc 660
agcaccgaag tggacaagaa aattgagccc agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca 720
tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttggtt ggaacctcgg tcttcatctt cctccaaaag 780
atcaaggatg tactcatgat ctccctgago cccatagtca catgtgtgtt ggtggtgtg 840
agcgagatg acccagatgt ccagatcagc tggtttgtga acaactgtga agtaacaca 900
gtccagacac aaacccatag agaggattac aacgaacttc tccgggtgtt cagtgccctc 960
cccatccagc accaggactg gatgagtgc aaggagttoa aatgcaaggt caacaacaaa 1020
gacctcccag cgcacctaga gagaaccatc tcaaaacca aagggtcagt aagagctcca 1080
caggatatat tcttgctccc accagaagaa gagatgacta agaaacaggt cactctgacc 1140
tgcatggtca cagacttcat gctcgaagac attacgttgg agtggaacca caacgggaaa 1200
acagagctaa actacaagaa cactgaacca gtccctgagt ctgagtgttc ttaactcatg 1260
tacagcaagc tgagagtga aaagaagaac tgggtgaaa gaaatagcta ctctgttcca 1320
gtgttccagc agggctctga caatcaccac acgactaaga gctctccggc gactccgggt 1380
aatga 1386
```

b) - SEQ ID No.:10

```
MGMSYIILFLVATADGHSQVLQGPTELKPKASVLSKSKASGYTFTSYWIIHWVKQRPQGGLIEWIGFINPSSGRTN
YNEKFNKRVITVDSSTTAYMQLSNLTSEDSAVYYASRGYNGGTTLVSSAKTTAPSVYFLAPVCGNTTSSVTL
GCLVRGYFPEPVLITWNSGLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSVYVTSSTWFGSITCNVAHPASTKVDKRIEPRGPT
IKRPFCKPAPKLLGGSVTFPEKIKVIMLSPIVTCVVDVSDGDPVLQSLWVFNVEVHTAQCTHREDYNS
TLRVSAIPIGHQDNMSGEKFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKQVTLTGMVTFMFPED
IYVETWNGKTELNYKNTEFVLDSGYSYFMHYKLRVEKNVVERNSYSQSVVHEGLNHHHTKFSRTPGK
```

Figure 8

6/8

<i>Mus musculus</i>	-----
<i>Homo sapiens</i>	-1285 ATGGTGTGAAGGACACCTGACTGGGCTGAAAGCTAAGTCTAACTTTGCC
<i>Mus musculus</i>	-714 -----CGTACGGGCT-GT
<i>Homo sapiens</i>	-1235 CCTCTTACTAACCAGCTATGTGACTCTCTGGGAACCTTTTAGGGACTCAG
<i>Mus musculus</i>	-702 TTTATTTCATCTGCAAAAT-GATTCCGTGCAGGCCCTCCAAAACGTAAATAG
<i>Homo sapiens</i>	-1185 TTTCTTTACCTGCAAAAT-GGTTCAATGCAAGACTTTAGTAACGTAATGG
<i>Mus musculus</i>	-653 GAACTTTCCTTTTCCATCAAACAGGAGTGAGTGAAGGTAAACCGCTCTTG
<i>Homo sapiens</i>	-1087 GAACTTTCCTTTTCCATAAAACGGGAATCAAGAGGTAATCTCTTTTGA

Figure 7

8/8

a) - SEQ ID No.:19

```
atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttgctgtgt ctctagggca gagggccacc 120
atctctcga aggccagcca aagtgttgat tatgatgggt gtagttatat gaggtggttc 180
caacagagac caggacagcc acccaactc ctcatctctg ctgcacccaa tctagaatct 240
gggattccag ccaggttttg tggcagtggc tctgggacag acttcaacct caatatccat 300
cctgtggagg aggaggtatg tgcaacctat tactgtcagc aaagtattga ggatccgctc 360
agcttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgtgcacc aactgtatcc 420
atcttccac catccagtga gcagttaaca tctggaggtg cctcagctgt gctgtctctg 480
aacaacttct accccaaga catcaatgtc aagtgaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540
aatggcgtcc tgaacagttg gactgtcag gacagcaag acagcaacct cagcatgagc 600
agcaccctca cgttgaccaa ggacagatg gaacgacata acagctatac ctgtgagccc 660
actcaaca ga catctacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttag 717
```

b) - SEQ ID No.:18

```
METDTILLWVLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGORATISCKASQSDYDCSSYMSWFOQRPGQPPKILLISAASV
ESGIPARFSGSGSTOPTLNHPVEEDWATYYQSSYEDPLTFGACTKLELRADAAPTYSIFPPSSQELTSGASV
VCLFLNFFPKDINVKKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKOSTYSMSSTLTITKDEYERHNSYTCETHKSTSTSPIVKSFN
RNEC
```

Figure 9

【配列表】

2012196206000002.app