

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 489 475**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2011** **E 11158861 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014** **EP 2500036**

54 Título: **Inhibidores MET para potenciar la eficacia de la radioterapia**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.09.2014

73 Titular/es:

**METHERESIS TRANSLATIONAL RESEARCH SA
(100.0%)
Via alla Campagna 2/a
6900 Lugano, CH**

72 Inventor/es:

**COMOGLIO, PAOLO MARIA;
BOCCACCIO, CARLA;
PETRONZELLI, FIORELLA y
DE SANTIS, RITA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 489 475 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores MET para potenciar la eficacia de la radioterapia

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere al uso de inhibidores MET para potenciar la eficacia de la radioterapia en pacientes que padecen cánceres.

10 Antecedentes técnicos

Aunque se emplea con éxito para tratar a pacientes con cáncer, la radioterapia puede que no logre erradicar el tumor, que recae con un fenotipo más agresivo. Consecuentemente, se ha descubierto un efecto prometastásico paradójico de la radiación ionizante (RI) por estudios clásicos en modelos animales. La progresión del tumor después de la radioterapia podía resultar de la selección positiva de la subpoblación de "células madre cancerosas", que es intrínsecamente radioresistente. Sin embargo, pruebas destacadas indican que, además de la selección, la RI promueve un fenotipo adaptivo destinado a la regeneración adaptiva, que puede resultar en un comportamiento metastásico. Este fenotipo se define como la respuesta "estrés-y-recuperación" a daños en el ADN, que se producen tanto a nivel de una única célula como de tejido. En células individuales, la detección de daños en el ADN provoca mecanismos moleculares específicos, la mayoría orquestados por el eje ATM-p53, que bloquean la replicación y activan la reparación del ADN. Si el daño es irreversible, se programa una célula normal para ejecutar la apoptosis, o para hibernar su capacidad proliferativa a través de la senescencia. Sin embargo, después de la muerte de células mutantes, los tejidos deben restablecer un número y patrón de células adecuados, para recuperar la estructura y función originales. Por lo tanto, se inicia la regeneración (o "cicatrización") por las células supervivientes, normales o bien neoplásicas. Como se observa *in vitro*, este proceso incluye etapas tales como desprendimiento del borde de la herida, adquisición de un fenotipo fibroblástico, migración en el área rascada, y, posiblemente, proliferación. Todo el programa se ha denominado "transición epitelial-mesenquimal" (TEM), una terminología que destaca las características morfológicas. Más recientemente, este programa también se ha definido como "crecimiento invasivo" (CI), una expresión que enfatiza aspectos funcionales relevantes para el cáncer. Ahora se acepta ampliamente que el TEM/CI es un programa fisiológico para el desarrollo y la regeneración del tejido, que se usurpa por células cancerosas para realizar la invasión y la metástasis. El TEM/CI se activa en células cancerosas (a) a veces, como resultado de lesiones genéticas que apoyan la selección clonal; (b) más a menudo, como resultado de una respuesta adaptiva a condiciones ambientales adversas.

Por tanto, el TEM/CI es un programa genético finalmente por unos pocos factores de transcripción específicos, y orquestado por un puñado de señales extracelulares. Esto último incluye factores de dispersión, tales como factor de crecimiento de hepatocitos (FCH) y proteína estimulante de macrófagos (PEM), que se unen a receptores de tirosina cinasas que pertenecen a la familia Met.

40 Objeto y sumario de la invención

Por lo tanto, se siente la necesidad de obtener soluciones mejoradas para potenciar la eficacia de la radioterapia en pacientes que padecen tumores.

El objetivo de la presente divulgación es proporcionar dichas soluciones mejoradas.

De acuerdo con la invención, el objetivo anterior se logra gracias a la materia objeto reclamada específicamente en las reivindicaciones siguientes, que se entiende que forman una parte integral de la presente divulgación.

Un modo de realización de la invención proporciona el uso de un inhibidor Met en la potenciación de la eficacia de la radioterapia, reduciendo y/o anulando la resistencia del paciente a la radioterapia, en el tratamiento de un paciente que padece un tumor, preferentemente un tumor que presenta una ruta Met desregulada, en el que el inhibidor Met se selecciona de:

i) anticuerpo monoclonal anti-Met DN30,

ii) un anticuerpo modificado genéticamente que contiene las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-Met DN30, teniendo dichas CDR las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID No.: 12 a 14 y 20 a 22, y

iii) un fragmento de (i) o (ii) que contiene las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-Met DN30, teniendo dichas CDR las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID No.: 12 a 14 y 20 a 22, en el que el anticuerpo monoclonal anti-Met DN30 se produce por la línea celular de hibridoma ICLC PD 05006, y en el que el inhibidor Met inhibidor puede inducir la regulación por disminución del receptor codificado por el gen MET.

Otro modo de realización de la presente divulgación se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica un

inhibidor Met para su uso en la potenciación de la eficacia de la radioterapia, reduciendo y/o anulando la resistencia del paciente a la radioterapia, en el tratamiento (por ejemplo, por tratamiento génico) de un paciente que padece un tumor, preferentemente un tumor que presenta una ruta Met desregulada, estando seleccionado dicho inhibidor Met de:

i) anticuerpo monoclonal anti-Met DN30,

ii) un anticuerpo modificado genéticamente que contiene las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-Met DN30, teniendo dichas CDR las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID No.: 12 a 14 y 20 a 22, y

iii) un fragmento de (i) o (ii) que contiene las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-Met DN30, teniendo dichas CDR las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID No.: 12 a 14 y 20 a 22,

en el que el anticuerpo monoclonal anti-Met DN30 se produce por la línea celular de hibridoma ICLC PD 05006, y en el que dicho inhibidor Met inhibidor puede inducir la regulación por disminución del receptor codificado por el gen MET.

De acuerdo con un modo de realización preferente, el inhibidor Met es para su administración i) en forma de proteína soluble por inyección o infusión o ii) por medio de un vector para administración sistémica o intratumoral.

De acuerdo con otro modo de realización preferente, el inhibidor Met está en forma de un fragmento Fab opcionalmente conjugado con al menos una molécula estabilizadora, en el que la molécula estabilizadora se selecciona de polietilenglicol, dominio de unión a albúmina, albúmina.

La presente divulgación divulga que la irradiación regula por incremento la expresión de *MET* (oncogén conocido por conducir el "crecimiento invasivo" del cáncer), que a su vez promueve la invasión celular y protege a las células de la apoptosis inducida por radiación. Por lo tanto, la anulación de la expresión de *MET* o la inhibición de su actividad cinasa por compuestos específicos, es decir, inhibidores Met específicos, promueve la apoptosis y contrarresta la invasividad inducida por radiación, potenciando de este modo la eficacia de la radioterapia.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora, a modo de ejemplo sólo, con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- Figura 1. La RI induce la transcripción de *MET*.

a, proteína Met en MDA-MB-435S en los puntos temporales indicados después de la irradiación (10 Gy). ctrl, Met a tiempo cero. b, proteína Met en MDA-MB-435S 12 h después de la irradiación (1-10 Gy). c, transcrito *MET* en MDA-MB-435S en los puntos temporales indicados después de la irradiación (10 Gy). d, actividad de luciferasa conducida por el promotor de *MET* (construcción sin promotor, básica) en MDA-MB-231 en los puntos temporales indicados después de la irradiación (10 Gy; ctrl, células no irradiadas). Columnas: media de análisis triplicados de dos experimentos independientes $\pm$ e.e.m. (* $p < 0,05$, $n = 6$, prueba de la t para datos emparejados). u.a., unidades arbitrarias.

- Figura 2. La transcripción de *MET* inducida por RI requiere NF- κ B.

a, Acumulación nuclear de proteína en MDA-MB-435S analizado en los puntos temporales indicados después de la irradiación (10 Gy), o después de 24 h de cultivo en hipoxia (1 % O_2). ctrl, células no irradiadas a tiempo cero. b, Inmunoprecipitación de cromatina en MDA-MB-231 irradiada (10 Gy; ctrl, células no irradiadas). Las columnas representan la proporción entre anti-p65/RelA e inmunoprecipitación de IgG no específica de cada secuencia de unión a NF- κ B (κ B1 o κ B2) en el promotor *MET* (media $\pm$ e.e.m. de análisis triplicados). Se usó el promotor *NFKBIA* (IkB α) como control positivo. c, Actividad del promotor *MET* en MDA-MB-231, silenciada por la expresión de p65/RelA (siRELA; siCTRL, control), e irradiada (10 Gy; ctrl, células no irradiadas). Las columnas representan la proporción entre expresión de luciferasa conducida por promotor *MET* y sin promotor (básica) (media de análisis triplicados en tres experimentos independientes $\pm$ e.e.m). Recuadro: proteína p65/RelA después de transfección de ARNip. d, Acumulación de proteína Met en MDA-MB-435S silenciada por la expresión de p65/RelA (siRELA; siCTRL, control), en los puntos temporales indicados después de la irradiación (ctrl, células no irradiadas a tiempo cero).

- Figura 3. La expresión *MET* inducida por RI requiere la activación de ATM cinasa.

Expresión de proteína Met, fosforilación Chk2 (p-Chk2) y translocación nuclear p65/RelA en MDA-MB-435S tratado con el inhibidor de ATM cinasa CGK733, y extraído en los puntos temporales indicados después de la irradiación. ctrl, células no irradiadas a tiempo cero.

- Figura 4. El crecimiento invasivo inducido por RI requiere Met.

a, Invasión de la membrana basal por MDA-MB-231 irradiado o U-251 (10 Gy; ctrl, control). Micrográficos de filtros Transwell (10X). b, Morfogénesis de ramificación inducida por Met aberrante en MDA-MB-435S irradiada (10 Gy; ctrl, control), cultivada con o sin (-) las concentraciones de HGF indicadas. Barra de escala: 100 μ M

- Figura 5. La inhibición de Met sensibiliza las células para la apoptosis inducida por RI y la detención proliferativa.

Viabilidad de U-251 irradiada con 10 Gy y/o cultivada en presencia del fragmento Fab del anticuerpo anti-Met DN30, durante 48 h (vehículo: células no irradiadas). Columnas: media de análisis triplicados de tres experimentos independientes $\pm$ e.e.m. (* $p < 0,05$, viabilidad significativamente reducida con respecto a Fab-DN30 o bien 10 Gy solo, $n = 9$, prueba de la t para datos emparejados). Columnas: porcentaje de células que generan clones (media de análisis triplicados de dos experimentos independientes $\pm$ e.e.m., * $p < 0,05$, $n = 6$, prueba de la t para datos emparejados).

- Figura 6. La RI induce la fosforilación de Met.

Fosforilación de Met en MDA-MB-231 tratada con HGF (50 nM) y/o IR (10 Gy) se inmunoprecipitaron células con anticuerpos anti-Met en los puntos temporales indicados y se analizaron por transferencia de bandas Western con anticuerpos anti-fosfo-Tyr (p-Tyr). Met se mostró como control de inmunoprecipitación de proteínas. ctrl, células tratadas con HGF control negativo (véase Métodos)

- Figure 7. Alineación de promotor *MET* de ratón y humano.

El promotor *MET* humano (GenBank, número de acceso: AF046925) se analizó con el programa informático TRANSFAC 7.0 (Biobase Biological Database GmbH, Wolfenbuttel, Alemania) para la identificación de sitios de unión a factores de transcripción. Se encontraron dos sitios de unión a NF-KB putativos (KB1 y KB2). La alineación del promotor *MET* humano y de ratón (ID génico: 17295) muestra que el sitio κ B2 (-1149/- 1136 en la secuencia humana, rectángulo) está altamente conservado entre las dos especies.

- Figura 8: Secuencia de ácidos nucleicos (a) y aminoácidos (b) de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal DN30. Las regiones CDR están subrayadas tanto en las secuencias de nucleótidos como de aminoácidos.

- Figura 9: Secuencia de ácidos nucleicos (a) y aminoácidos (b) de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal DN30. Las regiones CDR están subrayadas tanto en las secuencias de nucleótidos como de aminoácidos.

Descripción detallada de modos de realización de la invención

La presente invención se describirá ahora en detalle con relación a algunos modos de realización preferentes a modo de ejemplos no limitantes.

En la siguiente descripción, se dan numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de los modos de realización. Los modos de realización se pueden practicar sin uno o más de los detalles específicos, o con otros métodos, componentes, materiales, etc. En otros ejemplos, no se muestran ni se describen en detalle estructuras, materiales u operaciones bien conocidos para evitar confundir los aspectos de los modos de realización.

Los títulos proporcionados en el presente documento son únicamente por conveniencia y no interpretan el alcance o significado de los modos de realización.

Además de dañar las dianas intracelulares, la radiación ionizante (mayormente a través de la generación de especies reactivas del oxígeno) ajusta la actividad de moléculas reguladoras, que controlan la respuesta biológica de estrés-y-recuperación.

La regulación por incremento transcripcional del oncogén *MET* emerge como un acontecimiento crucial en esta respuesta, dando como resultado la ejecución de un programa de prosupervivencia y regenerativo que contrarresta el daño inducido por radiación. Esta divulgación muestra que la regulación por incremento de *MET* inducida por RI está controlada por una ruta de transducción de señal provocada por la proteína cinasa ATM seguido de la detección de lesiones de ADN. Esta ruta implica la exportación nuclear de la ATM cinasa y la liberación del factor de transcripción NF- κ B de la inhibición. De forma remarcable, se sabe que la activación de NF- κ B por daño de ADN desempeña un papel fundamental en la respuesta defensiva frente a la radiación, ya que NF- κ B es un regulador prominente de los genes antiapoptóticos. Se ha propuesto que la supervivencia celular promovida por NF- κ B es tan eficaz como para inducir la "resistencia adaptiva" de células cancerosas a la radioterapia. Los presentes inventores demuestran ahora que la respuesta adaptiva a la radiación sostenida por NF-KB implica de forma crucial el protooncogén *MET*.

La inducción de *MET* por RI es un acontecimiento transcripcional bifásico, mediado por la unión de NF- κ B a los dos elementos de respuesta específicos de κ B situados en el promotor *MET*. La respuesta transcripcional temprana que

se produce dentro de 1-2 h después de la irradiación probablemente se basa en la activación de NF- κ B por la ruta intrínseca conducida por el sensor de daño de ADN-ATM. Posiblemente, la sobreexpresión de Met inducida por RI es *per se* suficiente para provocar una transducción de señal en presencia de concentraciones fisiológicas del ligando ubicuo HGF, como se muestra en el caso de la sobreexpresión de Met inducida por hipoxia. La regulación por incremento de *MET* tardía y sostenida (prolongada durante 24 h) también es probable que esté soportada por múltiples rutas de señalización extrínsecas que afectan a NF- κ B. De hecho, la irradiación promueve la expresión de citocinas incluyendo TNF- α , IL-1 y IL-10 que, por una parte, son dianas de NF- κ B, y, por otra parte, estimulan la actividad transcripcional de NF- κ B. Los presentes inventores consideran que, en tejidos vivos, la irradiación induce bucles autocrinos/paracrinos que reverberan en NF- κ B que propaga ondas de señales de supervivencia por todo el tejido dañado.

De forma remarcable, se sabe que la respuesta transcripcional a NF- κ B incluye, además de genes prosupervivencia, moléculas responsables de TEM/CI. La ejecución combinada de la pro-supervivencia y los programas genéticos TEM/CI actúa como una espada de doble filo: en tejidos normales, estos programas dan como resultado la supervivencia y regeneración después del daño; en células cancerosas, fomentan la progresión hacia la neoplasia maligna.

El protooncogén *MET* cumple los criterios para ser una diana de NF- κ B crítica, requerido para orquestar tanto los aspectos positivos como negativos de las respuestas de estrés-y-recuperación. Como se muestra en la presente divulgación, por una parte, la sobreexpresión de Met inducida por RI permite que las células curen las monocapas heridas. Por otra parte, la RI estimula las células para cruzar las membranas basales, un rasgo característico típico de los tumores malignos. Aún más sorprendente, se informa de que la RI cambia el proceso fisiológico de la morfogénesis de ramificación inducida por Met en una diseminación celular desorganizada en toda la matriz tridimensional. En todos los casos, aunque se expresan varios genes diana de NF- κ B en células irradiadas, a través de la atenuación génica o inhibición funcional de *MET*, los presentes inventores muestran que se requiere Met tanto para el crecimiento invasivo fisiológico (cicatrización) como para el crecimiento invasivo maligno (invasividad). La agresividad informada de los tumores que recae después de la irradiación puede implicar, por tanto, la activación del programa TEM/CI bajo un control estricto del oncogén *MET*.

La observación de que Met está implicado en la respuesta anti-apoptótica, regenerativa e invasiva a RI tiene consecuencias terapéuticas importantes: la combinación de la radioterapia con la inhibición de Met radiosensibiliza las células cancerosas, mientras que previene los efectos colaterales proinvasivos. De hecho, la presente divulgación muestra que la inhibición de Met afecta significativamente a la supervivencia celular y a la capacidad clonogénica después de la exposición a dosis terapéuticas de IR. De la forma más importante, al expresarse en el compartimento de células madre/progenitoras de varios tejidos normales, *MET* también se expresa de forma concebible en células madre cancerosas, lo que a menudo deriva de la transformación directa de células madre normales o progenitores proliferantes. La expresión de Met inducida por RI y la activación soportan la radioresistencia de células (madre) cancerosas y la capacidad invasiva, incrementando la posibilidad de su selección positiva y diseminación.

Por lo tanto, la inhibición de Met (por medio de la administración del inhibidor de Met en forma de proteína soluble o por tratamiento génico, es decir, administración de un vector que codifica el inhibidor de Met como se define a continuación) en combinación con tratamientos convencionales, es decir, radioterapia, es otra estrategia para erradicar el cáncer.

En la presente divulgación con la expresión "inhibidor de Met" se quiere decir un anticuerpo monoclonal anti-Met, derivados y/o fragmentos del mismo, que puede inducir la regulación por disminución del receptor codificado por el gen *MET*. En un modo de realización preferente, el "inhibidor de Met" es un anticuerpo monoclonal anti-Met DN30, derivados y/o fragmentos del mismo, que pueden inducir la regulación por disminución del receptor codificado por el gen *MET*.

Con la expresión "derivado de anticuerpo" se quiere decir una molécula que contiene las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo, tal como un anticuerpo modificado genéticamente o humanizado que contiene las CDR del anticuerpo o un péptido que contiene las CDR del anticuerpo.

Con la expresión "fragmento de anticuerpo" se quiere decir un fragmento seleccionado de fragmentos Fv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ de i) anticuerpo monoclonal anti-Met, y ii) anticuerpo modificado genéticamente o humanizado que contiene las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-Met.

Desde un punto de vista farmacológico, el empleo de un fragmento Fab tiene tanto ventajas como desventajas. Las moléculas de Fab se pueden producir fácilmente usando sistemas de expresión sencillos incluyendo eucariotas y procariotas inferiores (Chambers RS. Curr Opin Chem Biol 2005 9:46-50). Las moléculas de Fab también son menos inmunógenas en comparación con los anticuerpos completos y su menor peso molecular mejora la penetración del tejido.

Un problema en el uso de fragmentos Fab en clínica se refiere a la breve semivida en plasma de los fragmentos Fab que es debido a una mayor eliminación renal. Esto se puede evitar por la administración local de la molécula de Fab

en el sitio del tumor. Para aplicaciones terapéuticas que requieren una administración sistémica y un tratamiento prolongado, son necesarias acciones dirigidas a incrementar la semivida de Fab. Para conseguir un incremento en la semivida de Fab, se ha realizado una forma estabilizada de Fab obtenida por conjugación con una molécula estabilizadora (que no modifica las propiedades de unión a antígeno del fragmento Fab).

Aunque la pegilación es la técnica más consolidada (Chapman AP. *Adv Drug Deliv Rev* 2002 54:531-545.), la pegilación no es la única posibilidad para implementar la estabilidad de las proteínas terapéuticas.

De forma alternativa a la modificación química, las moléculas de Fab recombinantes se pueden modificar al nivel de la secuencia de nucleótidos primaria para incorporar secuencias que codifican péptidos o dominios que se pueden unir con alta afinidad a la seroalbúmina (Dennis MS, et al., *J Biol Chem* 2002 277:35035-35043; Stork R, et al. *Protein Eng Des Sel* 2007 20:569-576) o se pueden generar como una molécula quimérica en la que una de las cadenas que codifican el Fab está condensada en marco con una secuencia que codifica una proteína biológicamente inactiva (por ejemplo, seroalbúmina (Subramanian GM, et al. *Nat Biotechnol* 2007 25:1411-1419)). Se puede usar polietilenglicol, dominio de unión a albúmina, albúmina, o cualquier otra secuencia que no modifique las propiedades de unión a antígeno del fragmento Fab como moléculas estabilizadoras que pueden incrementar la semivida en plasma *in vivo* del fragmento Fab.

El anticuerpo monoclonal anti-cMet DN30 se produce por la línea celular de hibridoma depositada por Advanced Biotechnology Center (ABC), Interlab Cell Line Collection (ICLC), S.S. Banca Cellule e Colture in GMP, Largo Rosanna Benzi 10, Genova, Italia, con el número de acceso ICLC PD 05006.

Los tumores adecuados para la administración de un inhibidor de Met para reducir y/o anular la resistencia a la radioterapia de acuerdo con la presente divulgación incluyen i) carcinomas, preferentemente seleccionados entre vejiga, mama, colangiocarcinoma, colorrectal, endometrial, esofágico, gástrico, cabeza y cuello, riñón, hígado, pulmón, nasofaríngeo, ovárico, páncreas/vesícula biliar, próstata, tiroides, ii) sarcoma de tejidos blandos, preferentemente seleccionado de entre sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, MFH/fibrosarcoma, iii) sarcoma musculoesquelético, preferentemente seleccionado de entre osteosarcoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial, iv) neoplasias malignas hematopoyéticas, preferentemente seleccionadas de entre leucemia mielógena aguda, leucemia de linfocitos T adultos, leucemia mielógena crónica, linfomas, mieloma múltiple, v) otros neoplasmas preferentemente seleccionados de entre tumores cerebrales, melanoma, mesotelioma, tumor de Wilm.

Todos estos tumores presentan, de hecho, una "ruta de Met desregulada", en la que esta expresión quiere decir que estos tumores se caracterizan por una señalización de Met aberrante debida a al menos una de i) mutaciones de Met, ii) sobreexpresión de proteína Met, iii) amplificación del gen Met, iv) niveles elevados de HGF en circulación.

Administración de inhibidores de Met a pacientes humanos

Todos los anticuerpos anti-Met se administrarán a través de regímenes similares a los adoptados para anticuerpos que dirigen otras tirosina cinasas receptoras implicadas en neoplasias malignas humanas (por ejemplo, Trastuzumab, un anticuerpo contra HER-2). Típicamente, el anticuerpo, o un derivado o fragmento del mismo, se administra por infusión intravenosa con dosis semanales que varían entre 5-10 mg/kg, preferentemente 4-8 mg/kg. Para la combinación con radioterapia, la administración de los anticuerpos anti-Met empezará una semana, más preferentemente un día, antes de la irradiación y continuará hasta una semana, preferentemente hasta de 6 a 48 horas, después del final de la radioterapia.

Las secuencias de ADNc que codifican el anticuerpo anti-Met, o derivados o fragmentos del mismo también se pueden administrar a pacientes humanos a través de procedimientos de "tratamiento génico". La secuencia de ADNc se clona en un vector de transducción de origen vírico (lentivírico, retrovírico, adenovírico, etc.) y se monta en una partícula vírica, que se puede dirigir específicamente al tumor o a células asociadas al tumor, por medio de proteínas de unión a superficie. A continuación, se produce la preparación de partículas víricas en un centro de grado GMP. Esta preparación puede se puede administrar por vía sistémica o bien intratumoral a través de una única inyección o de múltiples inyecciones. Los tejidos tumorales transducidos por el vector vírico expresarán las proteínas codificadas por las secuencias del anticuerpo anti-Met, o derivados o fragmentos del mismo proporcionando así un circuito auto-inhibidor.

A continuación, se proporcionan datos experimentales; los experimentos se han llevado a cabo usando anticuerpo monoclonal DN30 y/o derivados y/o fragmentos del mismo para proporcionar una descripción detallada de algunos modos de realización preferentes sin ningún propósito limitante de la presente invención.

Materiales y métodos

Líneas celulares y ARNip. La líneas celulares (A549, MDA-MB-231, LoVo, MDAMB- 435S, U-87MG, U-251, PC3, SF295, DLD1, SK-N-SH) fueron de ATCC. Para la inhibición de ATM cinasa, se pretrataron las células durante 4 h antes de la irradiación y a continuación se mantuvieron en presencia de CGK733 (10 μ M en DMSO). Los ARNip que dirigen *RELA* (ON-TARGET plus SMART pool L-003533-00 Human *RELA*, NM_021975, Dharmacon, 100 nM), o los ARNip de control (ON-TARGET plus SMART pool, siCONTROL Non Targeting siRNA, Dharmacon) se transfectaron

de forma transitoria.

Las secuencias de ARNip fueron las que siguen.

5 "SMART pool L-003533-00 Human RELA NM_021975" fue una mezcla 1:1:1:1 de las siguientes secuencias dúplex:

(1) sentido: GGAUUGAGGAGAAACGUAAUU (SEQ ID No.:1), antisentido: 5'-NUUUCUACAAGCUCGUGGGUU (SEQ ID No.:2),

10 (2) sentido: CCCACGAGCUUGUAGGAAAUU (SEQ ID No.:3), antisentido: 5'-NUUUCUACAAGCUCGUGGGUU (SEQ ID No.:4),

(3) sentido: GGCUAUAACUCGCCUAGUGUU (SEQ ID No.:5), antisentido: 5'-NCACUAGGCGAGUUAUAGCCUU (SEQ ID No.:6),

15 (4) sentido: CCACACAACUGAGCCCAUGUU (SEQ ID No.:7), antisentido: 5'-NCAUGGGCUCAGUUGUGUGGUU (SEQ ID No.:8).

SMART pool, siCONTROL Non Targeting siRNA (una única secuencia dúplex):

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

Producción del anticuerpo DN30 y fragmento Fab de DN30. El anticuerpo monoclonal DN30 se produjo como se describe en Prat M. et al., 1998, J. Cell Sci 111:237-247, y se depositó por Advanced Biotechnology Center con el número de acceso ICLC PD 05006. El fragmento Fab de DN30 se obtuvo a través de digestión con papaína de DN30 y purificación por afinidad (kit Immunopure Fab Preparation Kit, Pierce).

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de DN30 se ilustra en la figura 8b y se establece en SEQ ID No.:10, la secuencias de nucleótidos de la cadena pesada de DN30 se ilustra en la figura 8a y se establece en SEQ ID No.:11.

Las secuencias de aminoácidos correspondientes a las regiones CDR de la cadena pesada de DN30 son las siguientes: CDR-H1: GYTFTSYW (SEQ ID NO.:12); CDR-H2: INPSSGRT (SEQ ID NO.:13); CDR-H3: ASRGY (SEQ ID NO.:14). Las secuencias de nucleótidos correspondientes a las regiones CDR de la cadena pesada de DN30 son las siguientes: CDR-H1: GGCTACACCTTCACCACTTACTGGA (SEQ ID NO.:15); CDR-H2: ATTAATCCTAGCAGCGGTCTGACT (SEQ ID NO.:16); CDR-H3: GCAAGTAGG (SEQ ID NO.:17).

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de DN30 se ilustra en la figura 9b y se establece en SEQ ID No.:18, la secuencias de nucleótidos de la cadena ligera de DN30 light se ilustra en la figura 9a y se establece en SEQ ID No.:19.

Las secuencias de aminoácidos correspondientes a las regiones CDR de cadena ligera de DN30 son las siguientes: CDR-L1: QSVDDYDGGSY (SEQ ID NO.:20); CDR-L2: AAS (SEQ ID NO.:21); CDR-L3: QQSYEDPLT (SEQ ID NO.:22). Las secuencias de nucleótidos correspondientes a las regiones CDR de cadena ligera de DN30 son las siguientes: CDR-L1: AAAGTGTTGATTATGATGGTGGTAGTTATAT (SEQ ID NO.:23); CDR-L2: GCTGCATCC (SEQ ID NO.:24); CDR-L3: CAGCAAAGTTATGAGGATCCGCTCAG (SEQ ID NO.:25).

Irradiación *in vitro*. Se emitieron rayos X por un acelerador de partículas lineal (Clinac 600C/D, Varian) que funcionaba a 6 MV.

Bandas Western Se investigó la expresión de proteínas en células privadas de suero, confluentes, irradiadas. Para el fraccionamiento en porciones citoplásmicas y nucleares, las células se lavaron y se incubaron en hielo durante 10 min en el "tampón A" (HEPES 10 mM pH 7,9, KCl 10 mM KCl, EDTA 0,1 mM, NP-40 al 0,5 %, ditiotretol 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y un cóctel de inhibidores de proteasas). Los sobrenadantes, que contenían los extractos citoplásmicos, se separaron por centrifugación. Se resuspendieron los sedimentos en el "tampón B" (HEPES 20 mM pH 7,9, KCl 400 mM, EDTA 1 mM, ditiotretol 1 mM, glicerol al 10 %, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y un cóctel de inhibidores de proteasas) y se incubó a 4 °C durante 1 h con mezclado vigoroso. Se aclararon los lisados nucleares resultantes por centrifugación de alta velocidad. Se redisolvió una cantidad igual de proteínas por SDS-PAGE y se analizó por bandas Western con los siguientes anticuerpos primarios: Met anti-humano de ratón (DL21 divulgado en Prat et al., Int. J. Cancer 49, 323-328 (1991)), anti-p65/RelA de ratón y anti-HIF-1α de ratón (BD Biosciences), anti-fosfo-Ser276 de conejo y anticaspasa-3 de conejo (Cell Signaling), anti-fosfo-Chk2 de conejo (T68, R&D Systems). Se usaron anti-actina de cabra (C-11; Santa Cruz Biotechnology) y anti-lamina B de ratón (Calbiochem) para el control de la carga de proteína citoplásmica o nuclear igual, respectivamente. Se capturaron imágenes de bandas usando un tomógrafo molecular (GelDoc XR; Bio-Rad Laboratories). Se realizó el análisis densitométrico con Quantity One 1-D (Bio-Rad Laboratories). Las bandas Western mostradas son representativas de los resultados obtenidos en al menos tres experimentos independientes.

Bandas Northern. Las células confluentes se privaron de suero durante 48 h y se irradiaron. El ARN total se redisolvió en gel de agarosa-formaldehído al 0,8 %, y se transfirió a membranas de nailon (Amersham) de acuerdo con procedimientos estándar. La sonda de *MET* que contenía la secuencia codificante completa (GenBank, n.º acceso J02958) se obtuvo del plásmido pCEV-MET (véase Michieli et al., *Oncogene* 18, 5221-5231 (1999)), y se marcó con [α -³²P]dCTP (Megaprime, Amersham). Se llevó a cabo la hibridación a 42 °C durante 16 h en presencia de formamida al 50 %. Las membranas de nailon se lavaron dos veces con 2X SSC-SDS 0,1 %, y dos veces con 0,1X SSC-SDS 0,1 % a 42 °C, y se autoradiografió.

Detección ROS. Se evaluó la generación de ROS intracelular usando diacetato de 5-(y 6)-carboxi-2'-7'-diclorofluoresceína (carboxi-H₂DCFDA, Molecular Probes) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las células se sembraron en placas negras de 96 pocillos (3 x 10⁴ células/pocillo) 24 h antes del tratamiento (RI: 10 Gy; H₂O₂: 100 µM como control). Las células se incubaron en presencia de carboxi-H₂DCFDA (10 µM) en DMEM libre de rojo fenol durante 1 h a 37 °C. Las células se lavaron, se incubaron durante 30 min adicionales en DMEM libre de rojo fenol sin carboxi-H₂DCFDA, y a continuación, se irradiaron. Se midió la generación de ROS 15 min después de la irradiación usando un lector de placas de fluorescencia (λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 535 nm) (DTX 880 Multimode Detector).

Inmunoprecipitación con cromatina (ChIP). Se usaron 4 x 10⁷ células para 10 ChIP para células irradiadas o bien de control. Después de la irradiación (10 Gy), las células se fijaron en formaldehído al 1 % durante 15 min a temperatura ambiente, y la reacción se detuvo con glicina (0,125 M). Las células fijadas se lavaron, se recogieron en PBS helado complementado con un cóctel de inhibidores de proteasas y se centrifugó. La fracción citoplásmica se extrajo como antes y se desechó, y los núcleos se sedimentaron y se resuspendieron en 1 ml de SDS-tampón de lisis (SDS 1 %, EDTA 1 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8, y un cóctel de inhibidores de proteasas). A continuación se rompieron los núcleos por sonicación, proporcionando fragmentos de ADN con un tamaño en masa de 400-1000 pb. Los restos celulares se aclararon por centrifugación a 14.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes que contenían la preparación con cromatina se diluyeron con tampón de dilución 10X (SDS 0,01 %, Triton X-100 1,1 %, EDTA 1,2 mM, Tris-HCl 16,7 mM pH 8, NaCl 167 mM). A continuación, se preacloró la cromatina durante 1 h a 4 °C añadiendo proteína G-sefarosa (Amersham, suspensión en gel al 50 % complementada con 0,2 mg/ml de ADN de esperma de salmón, BSA al 0,1 % y Na₃ al 0,05 %). Las perlas se sedimentaron por una centrifugación breve a 4000 rpm a 4 °C y se recogieron los sobrenadantes. Se usó una preparación al 3 % de cromatina como entrada para la normalización de ChIP. Se realizó la ChIP durante la noche a 4 °C con 4 µg de anticuerpos (anti-p65/RelA, Santa Cruz; IgG de ratón total, Chemicon), seguido de incubación con 50 µl de perlas de proteína G-sefarosa durante 3 h. Las perlas se lavaron secuencialmente sobre una plataforma giratoria a 4 °C con las siguientes soluciones (10 min/cada una) : dos veces con tampón de baja concentración salina (SDS 0,1 %, Triton X-100 1 %, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM), dos veces con tampón de alta concentración salina (SDS 0,1 %, Triton X-100 1 %, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM), una vez con tampón de LiCl (LiCl 0,25 M, ácido desoxicólico 1 %, NP-40 0,5 %, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8), y dos veces con TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). Las ChIP se eluyeron dos veces en EB (SDS 1 %, NaHCO₃ 0,1 M) y se mantuvieron durante la noche a 65 °C para invertir la reticulación de formaldehído. Se realizó el tratamiento con RNasa (50 µg/ml, 37 °C durante 30 min) y Proteinasa-K (500 µg/ml, 45 °C durante 2 h). Se purificó cada muestra por extracción con fenol/cloroformo y finalmente se resuspendió en 40 µl de agua estéril. Se usaron 2 µl de cada muestra como molde para la PCR en tiempo real con SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems) en el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) .

Los cebadores usados fueron los siguientes:

NFKBIA (d: GAACCCAGCTCAGGGTTAG - SEQ ID No.:26; inv: GGGAATTTCCAAGCCAGTCA - SEQ ID No.:27);

KB1 (d: AGGCCAGTGCCTTATTACCA - SEQ ID No.:28; inv: GCGGCCTGACTGGAGATTT - SEQ ID No.:29);

KB2 (d: GGGACTCAGTTTCTTTACCTGCAA - SEQ ID No.:30; inv: GGGACTCAGTTTCTTTACCTGCAA - SEQ ID No.:31).

Ensayo de cicatrización. Se hicieron crecer las células hasta confluencia en placas de 24 pocillos, privadas durante 24 h, y se rascó con una punta de plástico. Se reemplazó el medio de cultivo con medio recién preparado que contenía FBS al 1 % y el vehículo solo (DMSO), y se irradió de inmediato. Después de 24 h, las células se fijaron con glutaraldehído al 11 % (Sigma), y se tiñó con violeta cristal. Se obtuvieron las imágenes con una cámara de fotos Leica (Leica DFC320, Leica) conectada con un microscopio de luz invertido (DM IRB, Leica). Las imágenes son representativas de los resultados obtenidos en al menos tres experimentos independientes.

Ensayo Transwell. Se midió la invasión celular en cámaras Transwell™ (BD Falcon). Se sembraron células MDA-MB-231 y MDA-MB-435S (5 x 10⁵/transwell) en los lados superiores del filtro recubiertas con 20 µg/cm² de membrana basal Matrigel reconstituida (Collaborative Research). Se sembraron U-251 (10⁴/transwell) en filtros recubiertos con 50 µg/cm². Se añadió medio de cultivo complementado con FBS al 1 % en ambas cámaras. 1 h después de sembrar, las células se irradiaron (10 Gy) y se incubó a 37 °C durante 24 h. Las células en el lado

superior del filtro se retiraron mecánicamente, y las que migraron sobre el lado inferior se fijaron, se tiñeron y se fotografiaron como antes. Para la cuantificación de la invasión celular, se seleccionaron aleatoriamente diez campos por condición experimental y se micrografió como antes con un objetivo 10X. Se realizó el análisis morfométrico usando el programa informático MetaMorph 7.1. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes.

Ensayo de morfogénesis de ramificación. Se preformaron esferoides de MDA-MB-435S por resuspensión células individuales en 240 mg/ml de metilcelulosa (Sigma) y se cultivó en placas no adherentes de 96 pocillos (Greiner) durante 24 h. Se transfirieron los esferoides en una matriz que contenía 1,3 mg/ml de colágeno tipo I de cola de rata (BD Biosciences), FBS 10 %, y 240 mg/ml de metilcelulosa. Después de 24 h, las células se irradiaron y/o se cultivaron en presencia de HGF durante 7 días. Se obtuvo el HGF como proteína recombinante de baculovirus en células SF9. El medio condicionado de células no infectadas se usó como control negativo. Las imágenes son representativas de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

Ensayo de viabilidad celular con DN30 Fab. Se sembraron 10^3 células en placas de 96 pocillos y se hicieron crecer durante 24 h. Se reemplazó el medio de cultivo con medio que contenía FBS 1 % y DN30 Fab (28 µg/ml) o el vehículo solo (PBS). Después de 24 h, las células se irradiaron (10 Gy). La viabilidad celular se evaluó como antes.

Resultados

La RI induce la transcripción de *MET*

Los presentes inventores han mostrado previamente que el protooncogén *MET* está regulado de forma transcripcional por señales específicas extra- e intracelulares, incluyendo factores de crecimiento y el sensor de oxígeno. Aquí se investiga la modulación de la expresión de Met por exposición a dosis terapéuticas de RI (hasta 10 Gy).

En diez líneas celulares derivadas de tejidos neoplásicos de diferentes tipo histológicos (carcinomas de mama, pulmón, próstata y colon; melanoma; glioblastoma; neuroblastoma), se ha descubierto que el nivel de proteína Met se incrementó significativamente 24 h después de la irradiación. En líneas celulares representativas (tales como MDA-MB-435S y MDA-MB-231), los experimentos de la evolución temporal detallada revelaron un perfil bifásico de acumulación de proteína Met. Esto se caracteriza por un pico temprano de inducción de Met (~ cinco veces) alrededor de 1-2 h, seguido de un pico o meseta tardío similar, que aparece a las 6 h, y que decrece 24 h después de la irradiación (Fig. 1a). Los experimentos de respuesta a la dosis mostraron que la inducción de Met comienza después de 1 Gy, y alcanza una meseta a 5 Gy (Fig. 1b). En células irradiadas, también se observaron la acumulación de ARNm de *MET*, y la activación del promotor de *MET* de longitud completa (Fig. 1c-d), lo que indica que la sobreexpresión de *MET* inducida por RI implica un mecanismo transcripcional. De forma interesante, en MDA-MB-231, también se detectó una autofosforilación de Met transitoria e independiente de ligando, que se produce en los 10 min después de la exposición a RI, (Fig. 6). La intensidad de la fosforilación de Met inducida por RI era comparable a la provocada por una concentración distinta a la de saturación de HGF (50 ng/ml). Sin embargo, las cinéticas de fosforilación eran diferentes, ya que el pico inducido por RI se alcanzó después de 10 min, mientras que el pico inducido por HGF se alcanzó después de 30 min. La estimulación concomitante por RI y HGF no fue sinérgica (Fig. 6).

La transcripción de *MET* inducida por RI requiere NF-κB

Se sabe que la RI modula unos pocos factores de transcripción incluyendo NF-κB. En consecuencia, el perfil de expresión amplio del genoma mostró que, en las líneas celulares examinadas, la RI induce una respuesta temprana prominente de NF-κB. Por ejemplo, en MDA-MB-231, 9 de los 33 genes modulados 1 h después de la irradiación son dianas de NF-κB, lo que presenta una frecuencia -20 veces mayor que la esperada. Además, en experimentos de evolución temporal con células MDA-MB-231, MDA-MB-435S o U-251, la RI (10 Gy) indujo una acumulación nuclear rápida (en 30 min) y persistente (hasta 24 h) de la subunidad de NF-κB p65/RelA, un rasgo característico de la activación de NF-κB (Fig. 2a). Además, en puntos temporales tempranos después de la irradiación, se fosforiló de forma transitoria la p65/RelA nuclear en Ser²⁷⁶ (Fig. 2a). Se sabe que esta fosforilación se induce por especies reactivas del oxígeno (ROS) por medio de la proteína cinasa A, y promueve la interacción de p65/RelA con coactivador transcripcional CBP/p300, lo que se requiere para la regulación por incremento de un subconjunto de genes diana tempranos. Estos datos indican que la RI promueve la activación funcional de NF-κB, a través de la acumulación nuclear y la fosforilación transitoria temprana de la subunidad p65/RelA.

En el promotor humano de *MET*, se identificaron dos sitios de unión putativos de NF-κB, κB1, situado en -1349/-1340 pb, y κB2, situado en -1149/-1136 pb, con respecto al sitio de inicio de la transcripción de la secuencia (GenBank, n.º de acceso AF046925) a través de análisis *in silico*. De forma interesante, el sitio κB2 está altamente conservado en el pro de ratón de *met* (Fig. 7; secuencia promotora de ratón de *met* (mus musculus) establecida en SEQ ID No:32 y secuencia promotora humana de *met* (homo sapiens) establecida en SEQ ID No:33). Los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina mostraron que la asociación de p65/RelA en cada sitio se incrementó significativamente en células expuestas a 10 Gy (Fig. 2b), lo que indica que *MET* se controla de forma

transcripcional por NF- κ B en células irradiadas. Estos hallazgos llevaron a los presentes inventores a investigar si NF- κ B es un requisito absoluto para la inducción de *MET* por RI. Puesto que p65/RelA está implicado en la formación de cada uno de los diversos heterodímeros de NF- κ B, lo que es crítico para toda la actividad transcripcional conducida por NF- κ B, se anuló la expresión de p65/RelA a través de interferencia de ARN. En MDA-MB-231 o MDA-MB-435S tratado con ARNip frente a p65/RelA (SMART pool L-003533-00 Human RELA, SEQ ID No.: 1 a 8), la RI ya no pudo inducir la actividad promotora de *MET* de longitud completa (Fig. 2c), ni la acumulación de la proteína Met. Tomados conjuntamente, estos datos proporcionan pruebas convincentes de que la regulación por incremento de *MET* inducida por RI requiere la activación del factor de transcripción NF- κ B.

También se consideró la implicación del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) en la transcripción de *MET* inducida por RI, ya que (a) se demostró que HIF-1 se activaba en células irradiadas como resultado de la formación de ROS, y (b) HIF-1 es un regulador prominente de la expresión de *MET*. Sin embargo, la relevancia de HIF-1 era mínima, como se muestra por enfoques complementarios. En primer lugar, en MDA-MB-231 y MDA-MB-435S, la RI no indujo la translocación nuclear de la subunidad HIF-1 α , que es el rasgo característico de la activación de HIF-1, observado de otro modo cuando se cultivaron las células en una concentración de oxígeno baja (Fig. 2a). La ausencia de activación de HIF-1 no se debía a una producción de ROS débil en células irradiadas, ya que ROS se incrementó en un $25 \pm 3,5$ % en promedio, 15 min después de la exposición a 10 Gy. Esto se estimó que correspondía a un promedio de un 80 % de inducción de ROS 2-5 min después de la irradiación, en consecuencia con observaciones previas en líneas celulares expuestas a 1-10 Gy. Además, se ha descubierto que la RI no pudo activar el denominado promotor *MET* "mínimo" que incluye los dos elementos responsables de hipoxia funcionales (HRE), y el sitio Ap-1, que son responsables de la regulación por incremento de *MET* inducida por hipoxia. Tomados conjuntamente, estos datos indican que HIF-1 no está implicado en la regulación por incremento de *MET* por RI. Sin embargo, se ha observado que la hipoxia indujo la translocación nuclear de p65/RelA y la fosforilación de serina (Fig. 2a). Finalmente, también se descartó la implicación del factor de transcripción p53, una diana de RI prominente. De hecho, MDA-MB-435S y MDA-MB-231 (dos líneas celulares que presentan la mayor inducción de *MET* por RI) albergan mutaciones inactivadoras de p53 (G266E y R280K, respectivamente). Además, a diferencia del promotor de ratón, el promotor de *MET* humano no se regula por incremento por formas constitutivamente activas de p53.

La expresión de *MET* inducida por RI está mediada por la activación de ATM cinasa

El NF- κ B es un cruce de varias rutas iniciado por señales tanto extracelulares como intracelulares. Estas últimas incluyen las provocadas por la proteína cinasa ATM seguido de la detección del daño de ADN. Para investigar si la inducción de *MET* por RI se basa en la activación de la ATM cinasa, se trataron MDA-MB-435S o MDA-MB-231 con 10 μ M del inhibidor de moléculas pequeñas específico CGK733. En experimentos de evolución temporal, el CGK733 evitó la fosforilación inducida por RI del sustrato específico de ATM Chk2, así como la translocación nuclear de p65/RelA, y la sobreexpresión de proteína Met. Estos datos indican que se requiere la ATM cinasa para la regulación por incremento de *MET* inducida por RI (Fig. 3).

El crecimiento invasivo inducido por RI requiere Met

La sobreexpresión de Met no implica la activación de cinasa en ausencia del ligando extracelular HGF. Sin embargo, implica un incremento significativo en la actividad de señalización dependiente de ligando (es decir, sensibilización). Esto se ha observado en células donde la hipoxia reguló por incremento la expresión de Met hasta un nivel comparable a, o menor que el inducido por irradiación.

Por lo tanto, los presentes inventores investigaron si la sobreexpresión de Met inducida por RI podía provocar o potenciar las respuestas biológicas dependientes de Met. Estas incluyen los lados fisiológico y patológico del crecimiento invasivo. En el ensayo de cicatrización, que evalúa la capacidades de la célula para regenerar tejidos dañados (es decir, crecimiento fisiológico invasivo), la MDA-MB-231 irradiada, así como MDA-MB-435S, realizó de forma espontánea el programa de curación, por desprendimiento del borde de la herida, y por migración en toda el área rascada. Esta respuesta, monitorizada durante 24 h, se superpone con la estimulada por HGF, que también se conoce como "factor de dispersión", ya que promueve la disociación y motilidad celular. Sin embargo, la respuesta de curación provocada por la RI no se debía a la inducción de un bucle autocrino de HGF, ya que las células irradiadas no expresaron HGF como se evaluó por PCR cuantitativa. Los presentes inventores concluyeron que la sobreexpresión de Met inducida por RI sensibiliza las células para una pequeña cantidad de HGF presente en el medio de cultivo, que se suministra con suero al 1 %. Esta condición probablemente imita la presencia fisiológica de HGF *in vivo*, que se incrusta de forma ubicua en las matrices extracelulares.

A continuación, las células irradiadas se evaluaron en ensayos Transwell, que miden la capacidad para invadir una membrana basal artificial *in vitro*, lo que se correlaciona estrechamente con la invasividad *in vivo*, es decir, el crecimiento invasivo maligno. De hecho, las células irradiadas (tales como MDA-MB-231, MDA-MB-435S, o U-251) cruzan de forma espontánea la membrana basal Transwell en presencia de una concentración sérica baja (1 %) (Fig. 4a), imitando de nuevo el comportamiento provocado por HGF.

La RI convierte la morfogénesis inducida por Met en un proceso invasivo

La morfogénesis de ramificación es un proceso fisiológico complejo, inducido por HGF para generar órganos

tridimensionales durante el desarrollo. Este programa de múltiples etapas implica migración, proliferación y reorganización espacial celular, que finaliza con la generación de túbulos ramificados huecos alineados por células polarizadas. Algunas de las líneas celulares estudiadas, tales como MDA-MB-435S, pueden ejecutar totalmente el programa de morfogénesis de ramificación *in vitro*.

La exposición a la RI sensibilizó estas células hasta una concentración subóptima del HGF exógeno (5 nM) que (sola) no puede inducir la morfogénesis de ramificación (Fig. 4b). De forma importante, las células irradiadas estimuladas con HGF construyeron túbulos con alteraciones estructurales extraordinarias, a medida que las células se desacoplaron de la superficie albuminar y se propagaron en la matriz circundante (Fig. 4b). Este comportamiento es reminiscente de la "dispersión tridimensional" descrita como una forma de morfogénesis aberrante que se produce en respuesta al TNF α . Se concluyó que las dosis terapéuticas de RI pueden convertir la morfogénesis de ramificación fisiológica en un proceso proinvasivo aberrante.

La inhibición de Met sensibiliza las células para la apoptosis inducida por RI y la detención proliferativa

Como parte del programa TEM/CI, Met emana potentes señales antiapoptóticas a través de la activación sostenida de rutas posteriores que incluyen PI3-cinasa/AKT. Por lo tanto, los presentes inventores razonaron que la regulación por incremento de *MET* podía prevenir la muerte celular inducida por la irradiación, y que, a la inversa, la inhibición de Met podía incrementar la eficacia de la radioterapia.

Se observó una disminución en la viabilidad celular (de hasta un 75 %) en células irradiadas que se mantuvieron en presencia del fragmento Fab del anticuerpo anti-Met DN30, que se sabe que induce la regulación por disminución de *MET*, inhibiendo así la señalización y las actividades biológicas de *MET* (Petrelli et al., PNAS 103: 5090-5, 2006) (Fig. 5).

Estos resultados indican que la actividad de inhibición de Met sensibiliza células para radioterapia, incrementando la muerte celular y reduciendo la capacidad de reanudar la proliferación después del tratamiento.

Listado de secuencias

<110> Methersis Translational Research SA
 <120> Inhibidores MET para potenciar la eficacia de la radioterapia
 <130> BEP14021-CF
 <160> 33
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ARNip contra p65/RelA
 <400> 1
 ggauugagga gaaacguau u 21
 <210> 2
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ARNip 2 inv. contra p65/RelA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es a, c, g, o u
 <400> 2
 nuuuccuaca agcucguggg uu 22
 <210> 3
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ARNip 3 - contra p65/RelA
 <400> 3
 cccacgagcu uguaggaaau u 21
 <210> 4
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> artificial

<220>
 <223> ARNip 4 - inv - contra p65/RelA
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(1)
 <223> n es a, c, g, o u
 <400> 4
 nuuuccuaca agcucguggg uu 22
 <210> 5
 10 <211> 21
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ARNip 5 - contra p65/RelA
 15 <400> 5
 ggcuauaacu cgccuagugu u 21
 <210> 6
 <211> 22
 <212> ARN
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> ARNip 6 - inv. contra p65/RelA
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(1)
 <223> n es a, c, g, o u
 <400> 6
 ncacuaggcg aguauagcc uu 22
 <210> 7
 30 <211> 21
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ARNip 7 - contra p65/RelA
 35 <400> 7
 ccacacaacu gagcccaugu u 21
 <210> 8
 <211> 22
 <212> ARN
 40 <213> artificial
 <220>
 <223> ARNip 8 - inv- contra p65/RelA
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (1)..(1)
 <223> n es a, c, g, o u
 <400> 8
 ncaugggcuc aguugugugg uu 22
 <210> 9
 50 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ARNip - secuencia de control
 55 <400> 9
 auguauuggc cuguauuag 19
 <210> 10
 <211> 461
 <212> PRT
 60 <213> artificial
 <220>
 <223> cadena pesada DN30
 <400> 10

ES 2 489 475 T3

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

ES 2 489 475 T3

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> 11

<211> 1386

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> DN30 - cadena pesada

<400> 11

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 agaacaaggt cacagtgact gtagacaaat cttccaccac agcctacatg	300
caactcagca acctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag taggggctac	360
tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacagcccc atcgggtctat	420
ccactggccc ctgtgtgtgg aaatacaact ggctcctcgg tgactctagg atgcctgggtc	480
aagggttatt tccctgagcc agtgacctg acctggaact ctggatccct gtccagtgggt	540
gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct gacctctaca ccctcagcag ctcaagtgact	600
gtaacctcga gcacctggcc cagccagtcc atcacctgca atgtggccca cccggcaagc	660
agcaccaagg tggacaagaa aattgagccc agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca	720
tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttgggt ggaccatccg tcttcatctt cctccaaag	780
atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc cccatagtc aatgtgtggt ggtggatgtg	840
agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca	900
gctcagacac aaacctatag agaggattac aacagtactc tccgggtgggt cagtgccttc	960
cccatccagc accaggactg gatgagtggc aaggagtcca aatgcaaggt caacaacaaa	1020
gacctcccag cggccatcga gagaaccatc tcaaaaccca aagggtcagt aagagctcca	1080
caggtatatg tcttgctcc accagaagaa gagatgacta agaaacaggt cactctgacc	1140
tgcatggtca cagacttcat gcctgaagac atttacgtgg agtggaccaa caacgggaaa	1200
acagagctaa actacaagaa cactgaacca gtcctggact ctgatggttc ttacttcatg	1260
tacagcaagc tgagagtgga aaagaagaac tgggtggaaa gaaatagcta ctctgttca	1320
gtggtccacg aggtctgca caatcaccac acgactaaga gcttctcccg gactccgggt	1380

10 aaatga

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

15 <220>

<223> cadena pesada DN30 - CDR-H1

<400> 12

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
 1 5
 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> cadena pesada DN30 - CDR-H2
 <400> 13
 Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr
 1 5
 10 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> cadena pesada DN30 - CDR-H3
 <400> 14
 Ala Ser Arg Gly Tyr
 1 5
 <210> 15
 <211> 25
 20 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> nucleótido CDR-H1
 <400> 15
 25 ggctacacct tcaccagta ctgga 25
 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> nucleótido CDR-H2
 <400> 16
 attaataccta gcagcggtcg tact 24
 <210> 17
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> nucleótido CDR-H3
 40 <400> 17
 gcaagtagg 9
 <210> 18
 <211> 238
 <212> PRT
 45 <213> artificial
 <220>
 <223> cadena ligera DN30
 <400> 18
 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

ES 2 489 475 T3

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> 19

<211> 717

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> cadena ligera DN30

<400> 19

atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 120

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatgggtg gtagttatat gagttgggtc 180

caacagagac caggacagcc acccaaatc ctcatctctg ctgcatccaa tctagaatct 240

gggatcccag ccagggttag tggcagtggc tctgggacag acttcaccct caatatccat 300

cctgtggagg aggaggatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagttatga ggatccgctc 360

acgttcgggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 420

atcttccac catccagtga gcagttaaca tctggagggtg cctcagtcgt gtgcttcttg 480

aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtgaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540

aatggcgctc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc 600

agcacctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660

10 actcacaaga catctacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttag 717

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

15 <220>

<223> cadena ligera DN30 - CDR-L1

<400> 20

Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Gly Ser Tyr
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 3
 <212> PRT
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> cadena ligera DN30 - CDR-L2
 <400> 21
 Ala Ala Ser
 1
 10 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> cadena ligera DN30 - CDR-L3
 <400> 22
 Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 23
 <211> 31
 20 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> nucleótido CDR-L1
 <400> 23
 25 aaagtgttga ttatgatggt ggtagtata t 31
 <210> 24
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> nucleótido CDR-L2
 <400> 24
 gctgcatcc 9
 <210> 25
 35 <211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> nucleótido CDR-L3
 40 <400> 25
 cagcaaagtt atgaggatcc gctcacg 27
 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 45 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador NFKBIA
 <400> 26
 gaaccccagc tcagggttta g 21
 50 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 55 <223> cebador inv. NFKBIA
 <400> 27
 gggaatttcc aagccagtca 20
 <210> 28
 <211> 21
 60 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador kB1
 <400> 28

aggccagtg ccttattacc a 21
 <210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador kB1 inv.
 <400> 29
 gcggcctgac tggagattt 19
 10 <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> cebador kB2
 <400> 30
 gggactcagt ttctttacct gcaa 24
 <210> 31
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador kB2 inv.
 <400> 31
 25 gggactcagt ttctttacct gcaa 24
 <210> 32
 <211> 199
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 32
 atgggtgtgaa ggacacctga ctgggctgaa agctaagttc taactttgcc cctcttacta 60
 accagctatg tgactctcct gggaactttt agggactcag tttctttacc tgcaaaatgg 120
 ttcaatgcaa gacttttagta acgtaatggg aactttcctt ttccataaaa ctggggaatc 180
 aagaggtaat ctcttttga 199
 <210> 33
 <211> 111
 <212> ADN
 35 <213> Mus musculus
 <400> 33
 cgtacgggct gttttattca tctgcaaaat gattccgtgc aggcctcaa aactgtaata 60
 ggaactttcc ttttccatca aactgaggag tggtaggta aaccgctctt g 111

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de Met para su uso en la potenciación de la eficacia de la radioterapia, reduciendo y/o anulando la resistencia del paciente a dicha radioterapia, en el tratamiento de un paciente que padece un tumor, estando seleccionado dicho inhibidor de Met de:
 - i) anticuerpo monoclonal anti-Met DN30,
 - ii) un anticuerpo modificado genéticamente que contiene las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-Met DN30, teniendo dichas CDR las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID No.: 12 a 14 y 20 a 22, y
 - iii) un fragmento de (i) o (ii) que contiene las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-Met DN30, teniendo dichas CDR las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID No.: 12 a 14 y 20 a 22,
 en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-Met DN30 está producido por la línea celular de hibridoma ICLC PD 05006, en el que dicho inhibidor Met inhibidor es capaz de inducir la regulación por disminución del receptor codificado por el gen MET y contrarrestar la invasividad tumoral inducida por radiación.
2. Secuencia de nucleótidos que codifica un inhibidor de Met para su uso en la potenciación de la eficacia de la radioterapia, reduciendo y/o anulando la resistencia del paciente a dicha radioterapia, en el tratamiento de un paciente que padece un tumor, estando seleccionado dicho inhibidor de Met de:
 - i) anticuerpo monoclonal anti-Met DN30,
 - ii) un anticuerpo modificado genéticamente que contiene las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-Met DN30, teniendo dichas CDR las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID No.: 12 a 14 y 20 a 22, y
 - iii) un fragmento de (i) o (ii) que contiene las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-Met DN30, teniendo dichas CDR las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID No.: 12 a 14 y 20 a 22,
 en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-Met DN30 se produce por la línea celular de hibridoma ICLC PD 05006, en el que dicho inhibidor Met inhibidor puede inducir la regulación por disminución del receptor codificado por el gen MET y contrarresta la invasividad tumoral inducida por radiación.
3. Inhibidor de Met de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor de Met es para la administración en forma de proteína soluble por inyección o infusión.
4. Secuencia de nucleótidos que codifica dicho inhibidor de Met de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicha secuencia de nucleótidos que codifica dicho inhibidor de Met se para la administración por medio de un vector, en la que dicho vector está en forma de partícula.
5. Secuencia de nucleótidos que codifica dicho inhibidor de Met de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicho vector es adecuado para dirigirse al tumor o a células asociadas al tumor.
6. Secuencia de nucleótidos que codifica dicho inhibidor de Met de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en la que dicho vector es para una administración sistémica o intratumoral, preferentemente por inyección.
7. Inhibidor de Met o secuencia de nucleótidos que codifica un inhibidor de Met de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho fragmento es un fragmento Fab, preferentemente un fragmento Fab que comprende al menos una molécula estabilizadora.
8. Inhibidor de Met o secuencia de nucleótidos que codifica un inhibidor de Met de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha al menos una molécula estabilizadora se selecciona de polietilenglicol, dominio de unión a albúmina, albúmina.
9. Inhibidor de Met o secuencia de nucleótidos que codifica un inhibidor de Met de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho inhibidor de Met y/o dicha secuencia de nucleótidos que codifica dicho inhibidor de Met es para la administración al menos una semana antes de someter a dicho paciente a radioterapia.
10. Inhibidor de Met o secuencia de nucleótidos que codifica un inhibidor de Met de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho inhibidor de Met y/o dicha secuencia de nucleótidos que codifica dicho inhibidor de Met es para la administración un día antes de someter a dicho paciente a radioterapia.

11. Inhibidor de Met o secuencia de nucleótidos que codifica un inhibidor de Met de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho inhibidor de Met y/o dicha secuencia de nucleótidos que codifica dicho inhibidor de Met es para la administración hasta al menos una semana, preferentemente de 6 a 48 horas, después de la finalización de la radioterapia.

5 12. Inhibidor de Met o secuencia de nucleótidos que codifica un inhibidor de Met de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho tumor se selecciona de entre un carcinoma, un sarcoma musculoesquelético, un sarcoma de tejido blando, una neoplasia maligna hematopoyética, un tumor cerebral, melanoma, mesotelioma, tumor de Wilms.

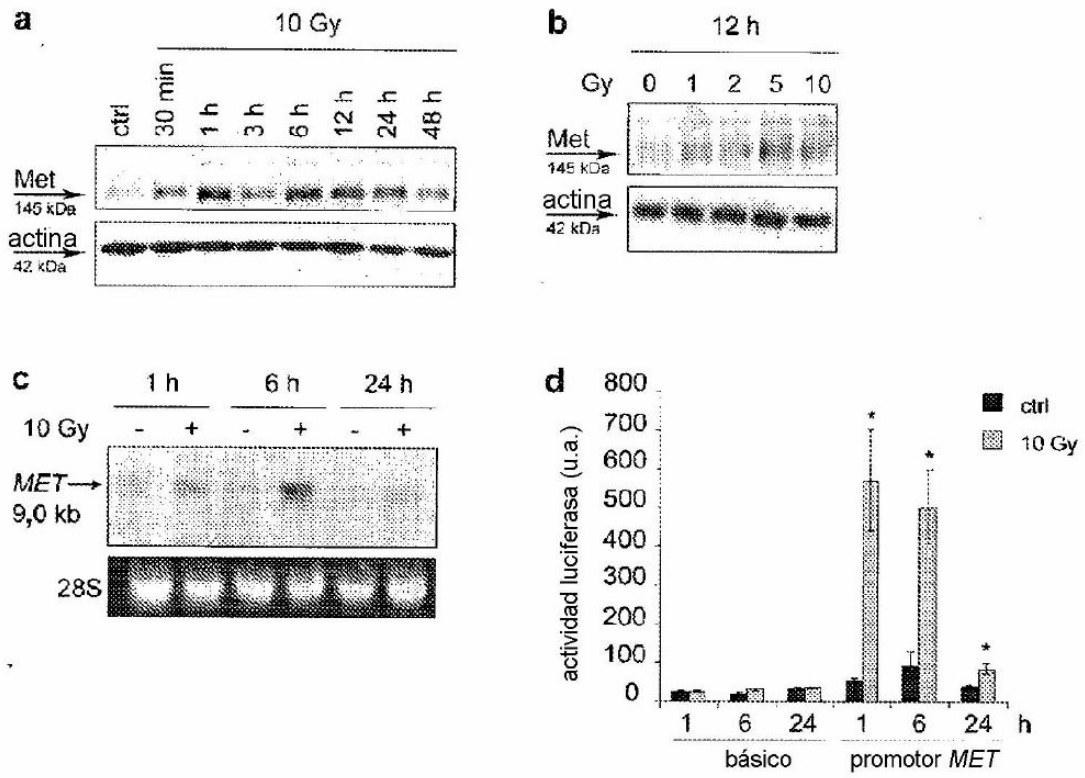


Figura 1

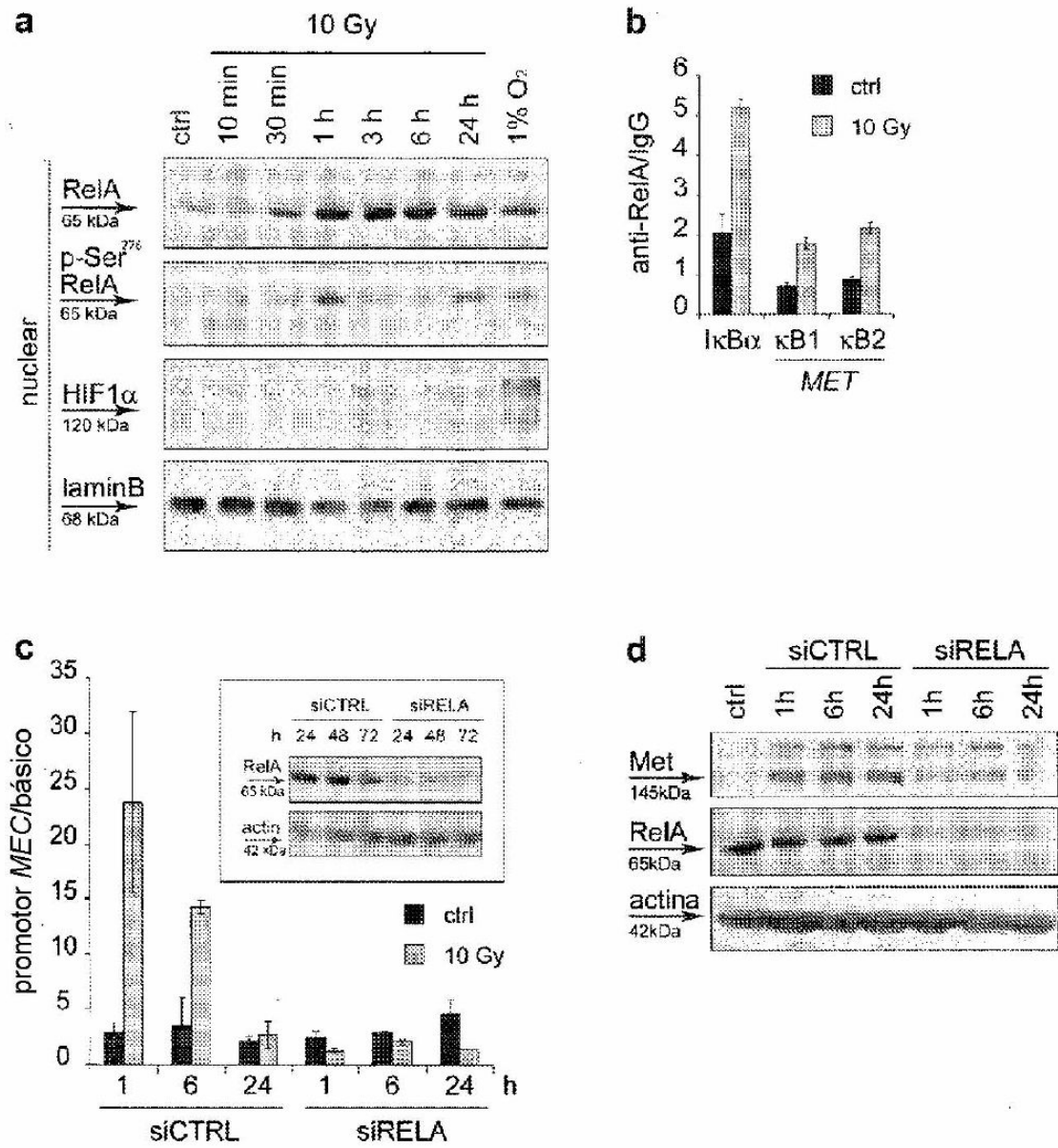


Figura 2

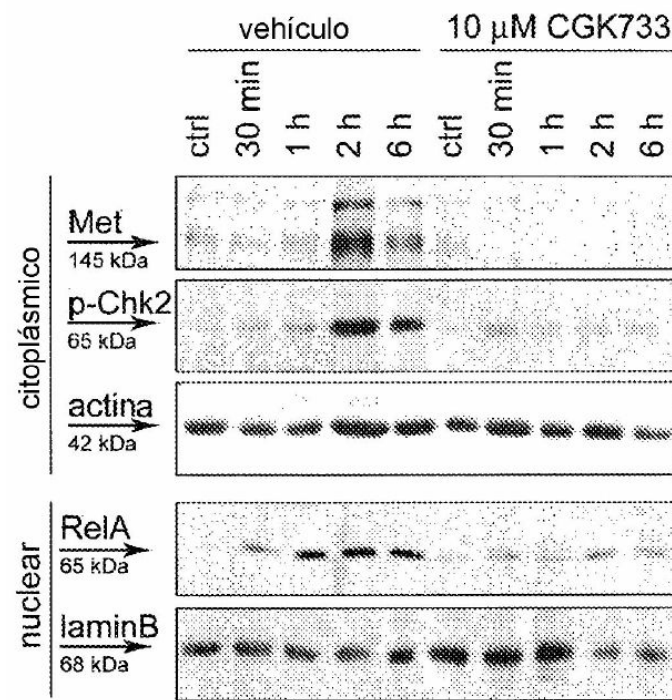


Figura 3

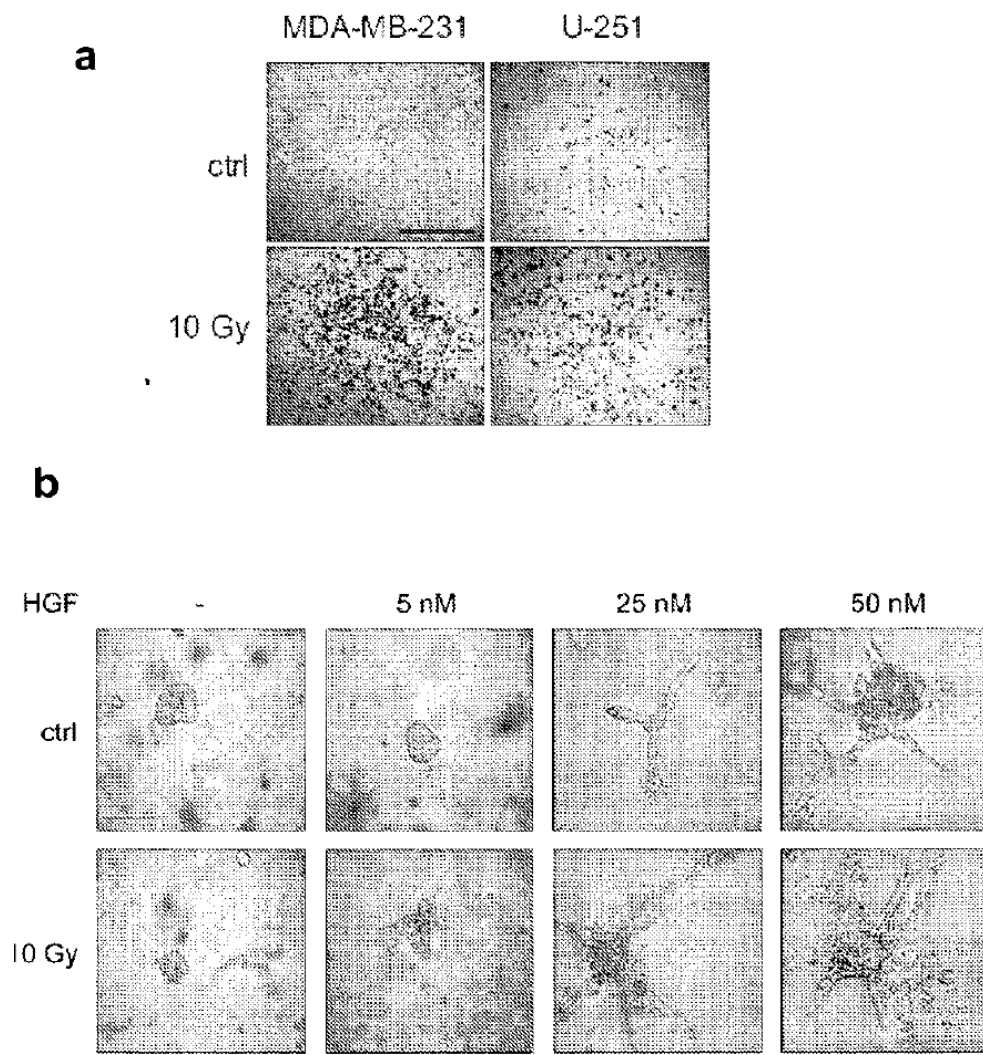


Figura 4

b

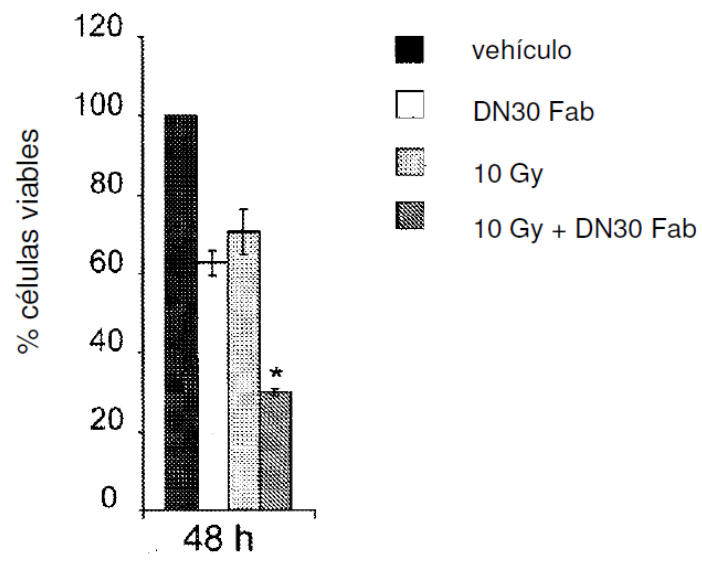


Figura 5

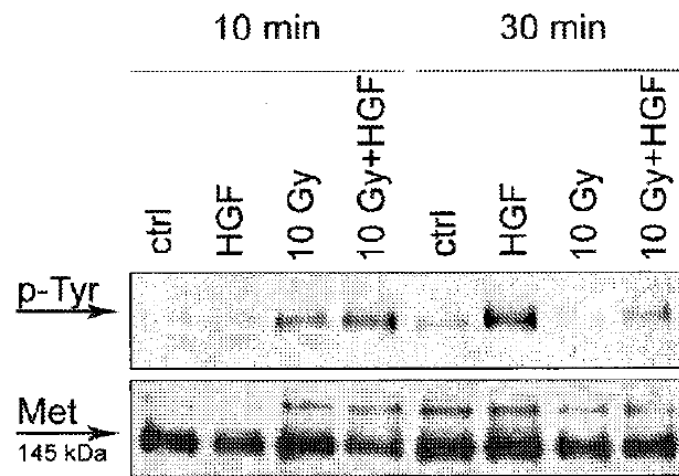


Figura 6

ES 2 489 475 T3

<i>Mus musculus</i>		-----
<i>Homo sapiens</i>	-1285	ATGGTGTGAAGGACACCTGACIGGGCTGAAAGCTAAGTTCTAACTTGTCC
<i>Mus musculus</i>	-714	-----CGTACGGGGCT-GT
<i>Homo sapiens</i>	-1235	CCTCTTACTAACCAGCTATGTGACTCTCTGGAACCTTTAGGGACTCAG
<i>Mus musculus</i>	-702	TTTATTGATCTGCAAAAT-GATTCCGTGCAGGCCCTCCAAAACGTAAATAG
<i>Homo sapiens</i>	-1185	TTTCTTTACCTGCAAAAT-GGTTCAATGCAAGACTTTAGTAACGTAAATGG
<i>Mus musculus</i>	-653	GAACTTTCTTTTTCATCAAACTGAGGAGTGGTGAGGTAAACCGCTCTTG
<i>Homo sapiens</i>	-1087	GAACTTTCTTTTTCATCAAACTGGGGAATCAAGAGGTAAATCTCTTTTGA

Figura 7

a) - SEQ ID No.:11

```

atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgg ccactcccag      60
gtccaactgc agcagcctgg gactgaactg gtgaagcctg gggttcagtg gaagctgtcc      120
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagt tactggatac actgggtgaa gcagaggcct      180
ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctagca gcggtcgtac taactacaac      240
gagaaattca agaacaaggt cacagtgact gtagacaaat ctccaccac agcctacatg      300
caactcagca acctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag taggggctac      360
tggggccaaag gaccactct caccgtctcc tcagccaaaa caacagcccc atcggtctat      420
ccactggccc ctgtgtgtgg aaatacaact ggctcctcgg tgactctagg atgcttggtc      480
aagggttatt tccctgagcc agtgaccttg acctggaact ctggatccct gtccagtggc      540
gtgcacacct tccagctgt cctgcagtct gacctctaca cctcagcag ctccagtact      600
gtaacctcga gcaacctggc cagccagtc atcaacctga atgtggccca cccggcaagc      660
agcaccgaag tggacaagaa aattgagccc agagggccca caatcaagcc ctgtcctcga      720
tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttgggt ggaccatccg tcttcattct cctccaaaag      780
atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc cccatagtca catgtgtggt ggtggatgtg      840
agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca      900
gtccagacac aaaccatag agaggattac aacagtactc tccgggtggt cagtgccttc      960
cccctccagc accaggactg gatgagtggc aaggagttca aatgcaaggt caacaacaaa      1020
gacctcccag cgcctatcga gagaaccatc tcaaaaccca aagggtcagt aagagctcca      1080
caggtatatg tcttgctcc accagaagaa gagatgacta agaaacaggt cactctgacc      1140
tgcatggtca cagacttcat gctgaagac atttacgtgg agtggaccaa caacgggaaa      1200
acagagctaa actacaagaa cactgaacca gtcctggact ctgatggttc ttacttcatg      1260
tacagcaagc tgagagtggg aaagaagaac tgggtggaaa gaaatagcta ctctgttca      1320
gtggtccacg agggctcga caatcaccac acgactaaga gcttctccc gactccgggt      1380
aatga                                             1386

```

b) - SEQ ID No.:10

```

MGWQYIILFLVATATDGHQVQLQQPGTELVKFGASVKLSCKASGYTFTSYWIIHWVKQRPGGLEWICEINPSSGRTN
YNEKFKNKVTVTVDKSSTTAYMQLSNLTSEDSAVYYCASRGYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGNTTGSSTL
GCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPT
IKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIAPPRIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFFVNNVEVHTAQTQTHREDYNS
TLRVVSALPIQHQQDWMSCGEKFKCKVNNKDLPAPIERTISKPCKSVRAPQVYVLPPEEEMTKQVTLTCMVTDFMPED
IYVEWTNNGKTELHYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHHHTTKSFSRTPGK

```

Figura 8

a) - SEQ ID No.:19

```

atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt    60
gacattgtgc tgaaccaate tccagcttct ttggtgtgt ctctagggca gagggccacc    120
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatgggt gtagttatat gagtgggttc    180
caacagagac caggacagcc acccaaaact ctcctctctg ctgcattccaa tctagaatct    240
gggatcccag ccaggtttag tggcagtggc tctgggacag acttcaccct caatatccat    300
cctgtggagg aggaggatgt tgcaacctat tactgtcagg aaagttatga ggatccgctc    360
acgttcgggt ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc    420
atcttccacc catccagtga gcagttaaca tctggaggtg cctcagtcgt gtgctctctg    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

```

b) - SEQ ID No.:18

```

METDTILLWVLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVYDGGSYMSWFQQRPGQPPKLLISAASNL
ESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDVATYYCQSYEDPLTFGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV
VCFLLNNFYPKDINVKKIDGSEKQNGVLNSWTDQSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTTSTPIVKSFN
RNEC

```

Figura 9