

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 319**

51 Int. Cl.:
A61K 31/38 (2006.01)
A61K 31/16 (2006.01)
A61K 38/55 (2006.01)
A61K 38/05 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00951521 .4**
96 Fecha de presentación: **16.08.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1207876**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.05.2002**

54 Título: **USO DE UN AGENTE MODULADOR QUE ACTÚA SOBRE UN PRECURSOR DE FACTOR DE CRECIMIENTO CON EL FIN DE INHIBIR EL TRATAMIENTO DEL PRECURSOR DE FACTOR DE CRECIMIENTO.**

30 Prioridad:
16.08.1999 EP 99116056
14.12.1999 US 461090

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2011

73 Titular/es:
MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.
HOFGARTENSTRASSE 8
80539 MÜNCHEN, DE

72 Inventor/es:
ULLRICH, Axel;
PRENZEL, Norbert;
DAUB, Henrik y
ZWICK-WALLASCH, Esther

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 368 319 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

Uso de un agente modulador que actúa sobre un precursor de factor de crecimiento con el fin de inhibir el tratamiento del precursor de factor de crecimiento.

5 El presente invento se refiere al uso de un agente modulador que actúa sobre un precursor de factor de crecimiento, concretamente el HB-EGF para la producción de un medicamento destinado al tratamiento de un cáncer.

10 La diafonía entre diferentes sistemas de señalización permite la integración de una gran diversidad de estímulos que una célula recibe en situaciones fisiológicas variables. La transactivación de trayectorias de señalización dependientes de receptores de EGF después de una estimulación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR acrónimo de G protein coupled receptor), que son críticos para la actividad mitogénica de ligandos tales como LPA, endotelina, trombina, bombesina y carbacol, representa una evidencia de dicha red de comunicación interconectada. No se comprende el mecanismo de esta comunicación cruzada, pero basándose en los datos informados, se propuso que ésta es transmitida por elementos intracelulares¹⁻⁴.

15 Dong y colaboradores (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, volumen 96, páginas 6235-6240, 1999) describen que la liberación de ligandos mediada por una metaloproteínasa regula la señalización autocrina a través del receptor del factor de crecimiento epidérmico.

20 Los autores del invento informamos aquí de que la activación de receptores de factores de crecimiento, tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), después de una estimulación de los GPCR, requiere el dominio extracelular del receptor. Como elemento clave de este mecanismo hemos identificado a un precursor de ligando de factor de crecimiento que pasa a través de las membranas, tal como el proHB-EGF, y a una actividad de proteínasa que es inducida rápidamente después de una interacción entre un GPCR y un ligando. Nosotros hemos mostrado que la inhibición del tratamiento de un precursor de factor de crecimiento bloquea la transactivación del receptor de factor de crecimiento inducida por un GPCR y señales situadas corriente abajo. Como evidencia acerca de la importancia patofisiológica de este mecanismo, hemos demostrado una inhibición de la actividad constitutiva del EGFR después de un tratamiento de células humanas de carcinoma de próstata PC-3 con el agente inhibidor de metaloproteinasas batimastato. Juntos, estos resultados establecen un nuevo concepto mecanístico para la diafonía entre diferentes sistemas de señalización.

25 Además, los resultados demuestran la importancia de las proteinasas como dianas para el tratamiento o la prevención de enfermedades que están asociadas con una sobreexpresión patológica de receptores de factores de crecimiento.

30 El presente invento es definido por el adjunto conjunto de reivindicaciones.

35 En un primer aspecto, el invento se refiere al uso de agentes moduladores de la transducción de señales mediada por proteínas G para la producción de un agente que modula la activación de un receptor de factor de crecimiento como se define en la reivindicación 1. La activación del receptor de factor de crecimiento es mediada por su dominio extracelular y por la vía de una trayectoria de señales extracelulares. Por lo tanto, el agente modulador puede actuar sobre células que son heterólogas con respecto a las células diana portadoras del receptor de factor de crecimiento. La activación del receptor de factor de crecimiento se realiza preferiblemente mediante una fosforilación en tirosina, por la cual se media una cascada de señales extracelulares. Ejemplos de apropiados receptores de factores de crecimiento son el EGFR, y otros miembros de la familia del EGFR tales como HER-2, HER-3 o HER-4, pero también otros receptores de factores de crecimiento tales como el receptor 1 de TNF, el receptor 2 de TNF, y los receptores de CD 30 y de IL-6.

40 El agente modulador de la transducción de señales mediada por proteínas G actúa sobre un precursor de factor de crecimiento que es un elemento clave de la trayectoria de transducción de señales. Como comparación, se describen unos agentes moduladores que actúan sobre una proteína G, un receptor acoplado con una proteína G y una proteínasa.

45 El substrato que ha sido sometido a disociación por la proteasa es un proHB-EGF que es disociado para dar el HB-EGF y el receptor de factor de crecimiento es el EGFR. Se hace referencia al hecho de que otros ejemplos de ligandos de factores de crecimiento que son disociados a partir de precursores son otros miembros de la familia del EGF tales como el TGF α , anfiregulina, epiregulina, el EGF, betacelulina, miembros de la familia de heregulina/NDF incluyendo isoformas de la misma y el TNF α .

50 La proteínasa que se describe como referencia y que ha sido modulada, es usualmente una proteínasa asociada a membranas, preferiblemente una metaloproteínasa tal como una proteínasa dependiente del zinc. Ejemplos de estas proteinasas son miembros de la familia de ADAM. La modulación de la actividad de una proteínasa puede

comprender una estimulación o una inhibición. La actividad de una proteinasa puede ser inhibida, lo cual a su vez da como resultado una inhibición de la activación de un receptor de factor de crecimiento.

La modulación de la actividad de proteinasa se puede efectuar añadiendo al sistema un agente activador o inhibidor de la actividad de proteinasa, que en una forma de realización particularmente preferida modula directamente la actividad de proteinasa. Un ejemplo de dicho agente modulador para la actividad de proteinasa es el agente inhibidor de proteinasa batimastato. Otros ejemplos adicionales son el marimastato (de British Biotech), el TAPI (de Immunex) y las TIMP-1, -2, -3 o -4, particularmente laTIMP-3³¹. Un ejemplo de acuerdo con el invento es el CRM197, que es una forma inactiva catalíticamente de la toxina de difteria, que se fija específicamente a un proHB-EGF y que es capaz de bloquear el tratamiento del proHB-EGF por metaloproteinasas.

La modulación de la transducción de señales mediada por proteínas G tiene una gran importancia para aplicaciones de diagnóstico y clínicas. Por ejemplo, la modulación de la transducción de señales mediada por proteínas G es una diana para la prevención o el tratamiento de trastornos que están asociados con, o acompañados por, una activación de receptores de factores de crecimiento, intensificada patológicamente. Se describen unos métodos para prevenir o tratar, entre otras enfermedades, unas enfermedades hiperproliferativas tales como tumores de colon, riñón, hígado, vejiga, pancreáticos, de próstata, gástricos, de mama, pulmón, tiroides, pituitaria, adrenales y de ovario o glioblastomas, así como también hiperplasia de tiroides, retinitis pigmentosa, pubertad precoz, acromegalia y asma. Más particularmente, el crecimiento de células humanas de cáncer de próstata puede ser inhibido mediante un tratamiento con agentes inhibidores de proteinasas tales como el batimastato (BB-94). En investigaciones adicionales se encontró que los agentes inhibidores de proteinasas son eficaces contra células humanas de cáncer gástrico, de ovario, riñón, hígado, colon, mama, páncreas, pulmón y vejiga y células humanas de glioblastoma.

Se describe además un método para modular la activación de factores de crecimiento, que comprende poner en contacto una célula o un organismo que contiene un receptor de factor de crecimiento, capaz de ser activado con un agente modulador de la transducción de señales mediada por proteínas G. La etapa de puesta en contacto puede realizarse in vitro, p.ej. en un cultivo de células, o in vivo, p.ej. en un individuo que tiene la necesidad de un tratamiento médico, tal como un ser humano. El agente activo es añadido en una cantidad suficiente para modular la activación del receptor de factor de crecimiento, particularmente en una cantidad suficiente para inhibir por lo menos parcialmente la activación del receptor de factor de crecimiento.

Preferiblemente, el agente activo es administrado como una composición aceptable farmacéuticamente, que puede contener apropiados diluyentes, vehículos y agentes auxiliares. La composición puede contener también otros agentes activos farmacéuticamente, p.ej. agentes citotóxicos para el tratamiento de un cáncer.

Las composiciones farmacéuticas que son apropiadas para el uso en el presente invento, incluyen unas composiciones en los que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para conseguir su finalidad pretendida. El concepto de "una dosis efectiva terapéuticamente" se refiere a la cantidad del compuesto que da como resultado un mejoramiento de los síntomas o una prolongación de la supervivencia en un paciente. La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos se pueden determinar mediante procesos farmacéuticos clásicos en cultivos de células o en animales experimentales, p.ej. para determinar la DL50 (la dosis que es letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis que es efectiva terapéuticamente en un 50 % de la población). Para cualquier compuesto usado en el método del invento, la dosis efectiva terapéuticamente puede ser estimada inicialmente a partir de ensayos en cultivos de células. Por ejemplo, una dosis se puede formular en modelos con animales para conseguir un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la CI50 que se ha determinado en un cultivo de células (es decir la concentración de un compuesto sometido a ensayo que consigue una inhibición semi-máxima de la actividad de un receptor de factor de crecimiento). Dicha información se puede usar para determinar con mayor exactitud unas dosis útiles en seres humanos. La relación de las dosis entre los efectos tóxicos y los efectos terapéuticos es el índice terapéutico y puede ser expresada como la relación entre la DL50 y la DE50. Son preferidos los compuestos que exhiben unos altos índices terapéuticos. La formulación, la ruta de administración y la dosificación exactas pueden ser escogidas por el médico individual a la vista de la condición del paciente (véase p.ej. Fingl y colaboradores 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics" [la base farmacológica de la terapéutica], capítulo 1, página 1).

La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar unos niveles en plasma del residuo activo, que son suficientes para mantener los efectos moduladores del receptor o la concentración efectiva mínima (MEC, acrónimo de minimal effective concentration). La MEC variará para cada compuesto, pero puede ser estimada a partir de datos in vitro, p.ej. la concentración que es necesaria para conseguir una inhibición de 50-90 % del receptor usando los ensayos que aquí se describen. Los compuestos se deberían administrar usando un régimen que mantenga los niveles en plasma por encima de la MEC durante un 10-90 % del tiempo, preferiblemente entre un 30-90 % y de manera sumamente preferible entre un 50-90 %. Las dosificaciones necesarias para conseguir la MEC dependerán de las características individuales y de la ruta de administración. En los casos de una administración local o de una absorción selectiva, la concentración local efectiva del fármaco puede no estar relacionada con la concentración en plasma.

La cantidad real de una composición administrada será dependiente, desde luego, del individuo que esté siendo tratado, del peso del individuo, de la gravedad de la afección, de la manera de administración y del juicio del médico que recete.

5 Unas apropiadas rutas de administración pueden incluir, por ejemplo, una administración por la vía oral, rectal, transmucosal o intestinal; un suministro por vía parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas o intramedulares así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

10 Alternativamente, se puede administrar el compuesto de una manera local en vez de una manera sistemática (¿sistémica?), por ejemplo, por la vía de una inyección del compuesto directamente dentro de un tumor sólido, con frecuencia en una formulación de depósito o de liberación prolongada.

Además, se puede administrar el fármaco en un sistema de suministro de fármacos dirigido hacia una diana, por ejemplo en un liposoma revestido con un anticuerpo específico para el tumor. Los liposomas serán dirigidos hacia el tumor y absorbidos selectivamente por éste.

15 También se describe un método para identificar y proporcionar agentes moduladores de la transducción de señales mediada por proteínas G, que comprende poner en contacto una célula que contiene un receptor de factor de crecimiento capaz de ser activado con un compuesto sometido a ensayo, del que se sospecha que es un agente modulador de la transducción de señales mediada por proteínas G, y determinar el grado de activación del receptor de factor de crecimiento. Este método es apropiado como un proceso de escrutinio de alto rendimiento de realización para identificar nuevos compuestos o nuevas clases de compuestos, que sean capaces de modular la transducción de señales mediada por proteínas G.

Unos linajes celulares que expresan receptores acoplados con proteínas G y/o metaloproteinasas se pueden usar para escrutar e identificar unos compuestos que inhiban la actividad de receptores de factores de crecimiento.

25 La capacidad de los compuestos sometidos a ensayo para inhibir la actividad de receptores de factores de crecimiento activados extracelularmente por trayectorias de señalización mediadas por receptores acoplados con proteínas G, se puede determinar tal como se describe en los Ejemplos.

Además, el presente invento se describe con detalle por las Figuras y los Ejemplos siguientes:

Descripción de las Figuras

30 Figura 1 La transactivación de EP-R inducida por GPCR redefine la señalización endógena mediada por un EGFR para señales específicas para PDGFR. Las proteínas se sometieron a inmunotransferencia de borrones con el anticuerpo α PY (4G10).

- 35 a) Unas células de Rata-1/EP-R fueron tratadas durante 3 minutos con ET-1 (200 nM), trombina (2 U/ml) y EGF (2 ng/ml) o
 b) fueron incubadas previamente con tirfostinas (inhibidoras de la fosforilación en tirosina) tal como se ha indicado antes de la estimulación de trombina y el EP-R fue precipitado selectivamente con el anticuerpo monoclonal mAb 108.1.
 40 c) Diferentes linajes estables de células de Rata-1 quedaron sin tratar o
 d) fueron incubados previamente durante 1 h con el anticuerpo EGFR-E Ab ICR-3R (20 μ g/ml), estimulados durante 3 minutos con agentes agonistas de GPCR, EGF o PDGF-BB (25 ng/ml) tal como se ha indicado, y la SHP-2 fue precipitada.
 e) Unos receptores de Rata-1/EP-R fueron tratados igual que en b) y la SHC fue inmunoprecipitada.

45 Figura 2 Transactivación intercelular inducida por carbacol del receptor de EGF. Unos linajes de células estables de Rata-1 que expresaban o bien el M1R o el HERc y unas células testigos se mezclaron en una relación de 1:3. En

- 50 a) Después de una estimulación con carbacol (1 mM), el HERc fue precipitado y tratado por inmunotransferencia de borrones con el anticuerpo α PY.
 b) Cultivos concomitantes de células de Rata-1/M1R y de Rata-1/HERc se plantaron en diferentes densidades y se incubaron previamente con el Ab ICR-3R (20 μ g/ml) que bloquea al EGFR-E y el HERc fue precipitado a continuación de una estimulación con carbacol.
 c) Cultivos concomitantes de alta densidad de células de Rata-1/M1R y de Rata-1/HERc se incubaron con heparitinasa o un clorato y el HERc fue precipitado a continuación de una estimulación con carbacol o con EGF.

Figura 3 La transactivación de EGFR inducida por GPCR y la fosforilación en tirosina de proteínas adaptadoras son dependientes de la función de HB-EGF. a), c), d) Unas células COS-7 y b) unas células HEK 293, transfectadas con el M1R o el ET-R, respectivamente, sin tratar o incubadas previamente con CRM 197, fueron estimuladas durante 3 minutos con los agentes agonistas de GPCR LPA (10 μ M) o carbacol (1 mM), EGF (2 ng/ml) o TPA 1 μ M (durante 5 min) como se ha indicado. Subsiguientemente, el EGFR (a, b), la SHC (c) o el Gab-1 (d) se inmunoprecipitaron y las proteínas fueron sometidas a inmunotransferencia de borrones con el anticuerpo α PY (4G10).

Figura 4 El tratamiento proteolítico de proHB-EGF inducido por GPCR y la transactivación de EGFR son dependientes críticamente de la función de una metaloproteinasa.

- a) Unas células COS-7 fueron transfectadas concomitantemente o bien con el M1R o con el BombR (con 0,5 μ g de cada uno) y con el VSV-proHB-EGF (0,7 μ g) y fueron estimuladas con carbacol (1 mM), bombesina (200 nM), TPA (1 μ M) o EGF (2 ng/ml). Un proHB-EGF fue analizado con el Ab anti α HB-EGF (parte superior), el VSV-HB-EGF disociado fue vigilado mediante inmunotransferencia de borrones con el anti VSV (parte inferior).
- b) Unas células COS-7 transfectadas como en a) fueron incubadas previamente con el batimastato (5 μ M, 30 min), estimuladas tal como se ha indicado y los inmunoprecipitados con el anti-VSV fueron sometidos a inmunotransferencia de borrones de α HB-EGF.
- c) Análisis por citometría de flujo de un proHB-EGF en células COS-7 tratadas durante 10 minutos con LPA, TPA, EGF o por incubación previa con el batimastato después de una estimulación con LPA.
- d, e) Células COS-7 transfectadas con el M1R, sin tratar o incubadas previamente con el BB-94 fueron estimuladas tal como en la Fig. 3a) y fueron inmunoprecipitadas con EGFR (d) o SHC (e). Las proteínas fueron sometidas a inmunotransferencia de borrones con el anticuerpo α PY (4G10).
- f) Unas células PC-3 fueron privadas de suero durante 36 horas, incubadas previamente con el batimastato y estimuladas durante 3 minutos con bombesina, TPA o EGF (7 ng/ml) tal como se ha indicado. El EGFR fue inmunoprecipitado y sometido a inmunotransferencia de borrones con el anticuerpo α PY.
- g) Unas células PC-3 no privadas fueron tratadas durante los períodos de tiempo indicados con DMSO o batimastato y la fosforilación en tirosina del EGFR se vigiló con una inmunotransferencia de borrones con el α PY.

Ejemplos

Ejemplo 1

1. Métodos

2.

Clonación y plásmidos

Los siguientes plásmidos han sido descritos: pcDNA1-BombR y pcDNA3-M1R¹. Para una expresión estable del M1R en células de Rata-1 el receptor fue subclonado dentro de pLXSN. El pro-HB-EGF y el receptor de endotelina fueron amplificados por una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a partir de una biblioteca de ADNc (cromosomal) de MCF-7 o de Rata-1 y fueron subclonados dentro de pcDNA3-VSV o pcDNA3, respectivamente.

Células y transfecciones

Células de Rata-1 y células de COS-7 se hicieron crecer y se infectaron o transfectaron, respectivamente tal como se ha descrito^{1,2}. Las células de Rata-1-HERc han sido descritas en un algún otro lugar¹. Las células HEK 293 se hicieron crecer en un medio DMEM que contenía 10 % de suero de ternero fetal (FCS de fetal calf serum) y se llevaron a cabo unas transfecciones usando el método del fosfato de Ca. Se añadieron el CRM197 (10 μ g/ml, de Sigma) o el batimastato (BB-94) (5 μ M, de British Biotech) 20 minutos antes que el respectivo factor de crecimiento. Se añadieron las tirfostinas AG 1478 (250 nM, de Calbiochem) y AG 1295 (1 μ M, de Calbiochem) 15 minutos antes de la estimulación.

Inmunoprecipitación y transferencia de borrón Western.

Los anticuerpos contra EGFR humano (108.1), SHP-2, Shc y Gab1 han sido caracterizados^{1,12,19,2}. La transferencia de borrón Western contra las quimeras del EP-R se realizó usando el anticuerpo policlonal de conejo α -hPDGFR β (de Upstate Biotechnology). Las células fueron lisadas y las proteínas fueron inmunoprecipitadas subsiguientemente tal como se ha descrito¹. Para precipitar el HB-EGF marcado con VSV, se usó un anticuerpo de VSV monoclonal (P5D4, de Boehringer) en combinación con Proteína G-Sepharose, el HB-EGF fue detectado con el anticuerpo C-18 (de Santa Cruz). Debido al pequeño tamaño del pro-HB-EGF y de la forma tratada del HB-EGF, nosotros hemos usado el sistema de SDS-PAGE con Tricina establecido por Schlägger tal como se ha descrito³⁰

Análisis por citometría de flujo

Se sembraron células COS-7 en platos de 6 cm: 20 h más tarde, las células se lavaron y cultivaron durante 24 h adicionales en un medio exento de suero hasta el tratamiento con factores de crecimiento tal como se ha indicado. Después de la recolección, las células fueron incubadas con un anticuerpo anti α HB-EGF de cabra (de R&D Systems) durante 30 minutos sobre hielo. Después de haber lavado con una PBS (solución salina tamponada con fosfato), las células fueron incubadas con un anticuerpo anti-cabra de conejo conjugado con FITC (de Sigma) durante 20 minutos sobre hielo. Las células fueron analizadas con el FACSCalibur (de Becton Dickinson).

2. Resultados

La transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se identificó como un elemento crítico en una señalización mitogénica^{1,5,6} inducida por receptores acoplados con proteínas G (GPCR), en la regulación de canales de cloruro⁷, así como en la modulación de la actividad de canales de potasio⁸. Puesto que se encontró que el proceso era muy rápido^{1,7,9} y no se podría detectar una liberación inducida por GPCR de ligandos de EGFR dentro del medio de cultivo de células^{5,8}, se ha supuesto generalmente que la transactivación del EGFR era mediada exclusivamente por la vía de señales intracelulares^{3,4}.

Sorprendentemente, sin embargo, incluso aunque los receptores de PDGF no son transactivados después de un tratamiento de células de Rata-1 con ligandos de GPCR², éste era el caso para un EP-R quimérico que se componía de un EGFR extracelular y del dominio de señalización transmembranal y citoplasmático del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)⁴¹⁰ (Fig. 1a). Esta quimera de receptores se inmunoprecipita con el anticuerpo monoclonal 108.1 que reconoce a la parte extracelular del EGFR humano pero no a la del de rata. El tratamiento de células de Rata-1/EP-R con el agente inhibidor de PDGFR AG1295¹¹, pero no con el agente antagonista de la cinasa de EGFR AG1478¹, bloqueaba a la fosforilación en tirosina inducida por trombina del receptor quimérico (Fig. 1 b), lo cual demostraba claramente una función crítica del dominio de EGFR extracelular para una transactivación mediada por GPCR. Como se muestra en la Fig. 1c, esta transactivación del EP-R da como resultado una señal corriente abajo característica del PDGF, puesto que la fosfatasa 2 que contiene el dominio de SH2 (SHP-2), que es una mediadora preferida de la señalización con PDGFR¹², fue fosforilada en tirosina después de una estimulación con endotelina (ET-1) y con trombina de células de Rata-1/EP-R, mientras que una exposición a los mismos ligandos no induce la fosforilación en tirosina de SHP-2 en células de Rata-1 que sobreexpresan el PDGFR o en células testigo. Un tratamiento previo de células de Rata-1/EP-R con el anticuerpo monoclonal ICR-3R¹³ que bloquea la fijación de ligandos al EGFR humano, dio como resultado una completa inhibición de la fosforilación en tirosina de SHP-2, inducida por ET-1 y EGF, mientras que la respuesta mediada por PDGF no fue afectada (Fig. 1d), confirmando que la transactivación inducida por GPCR de la quimera de EP-R depende del dominio de EGFR extracelular. En contraste con los resultados obtenidos para la SHP-2 (Fig. 1c), la fosforilación en tirosina de la proteína adaptadora SHC, a continuación de una estimulación con trombina, fue bloqueada completamente por un tratamiento previo de células de Rata-1/EP-R con el AG1478, pero quedó sin afectar por una incubación previa con el agente antagonista de PDGFR AG1295 (Fig. 1e). Esto confirma que la trombina transactiva al EGFR endógeno de rata en células de Rata-1/EP-R dando como resultado una fosforilación en tirosina de la SHC, mientras que la activación de la quimera de EP-R redefine la estimulación con trombina para generar una señal de SHP-2 característica de PDGFR.

Para abordar la cuestión de si la señal extracelular que activa a la quimera de EP-R actúa a través de un modo autocrino o paracrino, nosotros hemos realizado un experimento de cultivo concomitante con células de Rata-1 que o bien sobreexpresan establemente al receptor de acetilcolina muscarínico M1 (M1R) o al EGFR humano (HERc) en una relación de uno por uno. La estimulación del cultivo concomitante de Rata-1/M1R + Rata-1/HERc con el agente agonista de M1R carbacol antes de una inmunoprecipitación con el anticuerpo humano 108.1 específico para EGFR, indujo rápidamente la fosforilación en tirosina del HERc (Fig. 2a). Puesto que ninguna de las células testigos respondían al carbacol, este resultado demuestra claramente la posibilidad de una transactivación entre dos células. Para investigar la influencia de la densidad de células sobre este proceso paracrino, el HERc fue inmunoprecipitado a partir de cultivos concomitantes subconfluentes frente a confluentes de células de Rata-1/M1R y Rata-1/HERc después de una estimulación con carbacol. Tal como se muestra en las Fig. 2b y 2c, la fosforilación en tirosina de EGFR como respuesta a un agente agonista de M1R solamente se realizaba en cultivos concomitantes confluentes y era inhibida completamente por una incubación previa con el anticuerpo 1CR-3R, heparitinasa o clorato. Esto demostraba además el requisito de la fijación del ligando de EGFR para la transmisión de señales intercelulares y la necesidad de un estrecho contacto de células con células. En conjunto, estos resultados nos condujeron a sacar la conclusión de que los ligandos similares a EGF, sintetizados como precursores transmembranales y convertidos en la forma madura por una disociación proteolítica¹⁴, pueden estar implicados en una transactivación mediada por GPCR. La discrepancia entre los resultados anteriores obtenidos a partir de experimentos de transferencia de medios^{5,8} en los que unos ligandos similares a EGF no podrían ser detectados después de una activación por GPCR, y nuestro hallazgo de una diafonía intercelular dependiente de la densidad puede ser debida a un escenario

en el que, después de un tratamiento proteolítico, los ligandos similares a EGF permanecen con la matriz del proteoglicano sulfato de heparina antes de una interacción con sus receptores de alta afinidad, como se muestra para factores de crecimiento de fibroblastos¹⁵.

Se ha mostrado que el derramamiento de ectodominios ha de ser inducido por estímulos tales como los activadores de las proteínas G heterotriméricas, AlF_4^- y $\text{GTP}\gamma\text{S}^{16}$, así como el activador de PKC tetradecanoil-formol-13-acetato (TPA) y el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina^{17,18}. Esta última, que induce la liberación del HB-EGF en células epiteliales de próstata¹⁸, se ha mostrado recientemente que es una potente activadora de la transactivación de EGFR en células PC12¹⁹, y se ha informado que el TPA induce la fosforilación en tirosina de EGFR en células HEK 293⁸. El HB-EGF, que es un miembro de la familia de los EGF, tiene la capacidad de fijarse a los proteoglicanos de sulfato de heparán en la superficie de las células²⁰, lo que impide la liberación inmediata del factor de crecimiento y aumenta la concentración local del factor de crecimiento en el microentorno celular. Basándose en estas propiedades, el precursor de factor de crecimiento proHB-EGF concordaba con nuestro requisito propuesto para la transactivación de EGFR inducida por GPCR. Además de su función como precursor de factor de crecimiento, el proHB-EGF sirve como un receptor con alta afinidad para la toxina de difteria (DT)²¹. Se mostró que el CRM197, que es un mutante no tóxico de la DT, inhibía fuerte y específicamente a la actividad mitogénica del HB-EGF²². Por lo tanto, nosotros hemos ensayado la influencia del CRM197 sobre la transactivación de EGFR mediada por GPCR. Hemos encontrado que el tratamiento previo con CRM197 inhibe completamente a la fosforilación en tirosina del EGFR, inducida por los agentes agonistas de GPCR ácido lisofosfatídico (LPA) o carbacol así como TPA en células COS-7 (Fig. 3a). Se observó también una inhibición para células HEK 293 estimuladas con ET-1 o TPA, transfectadas transitoriamente con el receptor de endotelina (Fig. 3b). En contraste, la fosforilación en tirosina del receptor inducida por EGF estaba inalterada, demostrando la especificidad para el CRM197. Además la abrogación (abolição) completa de la fosforilación en tirosina de receptores inducida por LPA y carbacol sugería que el HB-EGF es el único factor de crecimiento que media en la transactivación con EGFR en los linajes celulares que aquí se presentan.

Se considera que la fosforilación en tirosina de la proteína adaptadora SHC es una etapa crítica en acoplamiento de la activación por GPCR con trayectorias de señalización dependientes de Ras²³. Con el fin de investigar el cometido del HB-EGF en este proceso, hemos examinado el efecto del mutante de toxina de difteria CRM197 sobre el ligando de GPCR y la fosforilación en tirosina de SHC mediada por TPA. Como se muestra en la Fig. 3c, en células COS-7, la fosforilación en tirosina de SHC inducida por LPA, carbacol y TPA fue reducida espectacularmente por un tratamiento previo con el CRM197, mientras que la respuesta mediada por EGF no fue afectada. El mismo efecto inhibitorio del CRM197 fue observado en células HEK 293 (datos no mostrados). Similarmente, en células COS-7, la fosforilación en tirosina de la proteína de múltiples dominios de interacción Gab-1 como respuesta a LPA o trombina no era detectada en la presencia del CRM 197 (Fig. 3d), con lo que se confirma la posición de señalización situada corriente abajo del EGFR².

Seguidamente, con el fin de examinar si el proHB-EGF es tratado proteolíticamente después de una estimulación de GPCR's, hemos transfectado unos plásmidos que contenían el proHB-EGF marcado con VSV en células COS-7 juntamente con el M1R o el receptor de bombesina (BombR) y los hemos estimulado con los respectivos ligandos durante diferentes períodos de tiempo. El TPA, que es un potente agente inductor del tratamiento de proHB-EGF, o el EGF se añadieron como testigos positivos y negativos respectivamente. La Figura 4a muestra que, como antes se ha descrito, el proHB-EGF es expresado en forma de productos de traducción heterogéneos de 20 a 30 Kda¹⁷, lo cual puede ser detectado con anticuerpos contra el extremo terminal de C (panel superior) o la marca de VSV (panel inferior). La estimulación con carbacol o bombesina condujo a una descomposición rápida del precursor de factor de crecimiento anclado a una membrana y la disociación proteolítica era concomitante con la aparición del fragmento de HB-EGF marcado con VSV de 9 KDa, que contenía el ancla transmembranal. De manera interesante, en estas condiciones la señal de GPCR inducía un tratamiento proteolítico del proHB-EGF tan rápida y potentemente como el TPA. Igual que para el TPA¹⁷, la conversión del proHB-EGF inducida por GPCR es un proceso extremadamente rápido que genera el HB-EGF maduro. En contraste con la fosforilación en tirosina de EGFR endógena inducida por GPCR, que es rápida y transitoria^{1,7,9}, la sobreexpresión del sustrato de proteasa VSV-proHB-EGF condujo a una disociación de ectodominios del proHB-EGF, rápida pero más prolongada.

Puesto que las metaloproteinasas dependientes de zinc han sido implicadas en el derramamiento de proHB-EGF por el TPA²⁴, hemos analizado el tratamiento inducido por carbacol en la presencia del batimastato (BB-94)²⁵, un agente inhibidor de proteasas que recientemente se ha mostrado que bloquea la maduración proteolítica de anfregulina humana²⁶. Como se muestra en la Fig. 4b, el tratamiento con BB-94 reducía significativamente el tratamiento del HB-EGF como respuesta al carbacol, apoyando nuestra conclusión de que las metaloproteinasas son unos elementos críticos en la generación de HB-EGF inducida por GPCR y en la activación de EGFR. En contraste con esto, el hidroxamato de PGL que es un inhibidor específico para MMP, no tiene ningún efecto sobre la transactivación inducida por LPA o carbacol (no mostrado).

Para confirmar el tratamiento del proHB-EGF inducido por GPCR, hemos usado un anticuerpo específico para ectodominios y una citometría de flujo después de un tratamiento de células COS-7 no transfectadas con LPA, TPA o EGF. En el intervalo de 10 minutos después de la adición de LPA y TPA, el contenido de proHB-EGF en la superficie de las células fue reducido, mientras que la estimulación con EGF no mostró ningún efecto (Fig. 4c). En

contraste con los experimentos con células transfectadas, que se muestran en las Figs. 4a y b, la activación de receptores de LPA endógenos no era tan potente como el TPA para inducir la disociación proteolítica del proHB-EGF. No obstante, de modo consistente o compatible con la Fig. 4b, el modesto efecto inducido por el LPA era inhibido completamente por el batimastato.

5 Nuestros resultados demuestran que la disociación del proHB-EGF, dependiente de metaloproteinasas, es inducida rápidamente después de una activación de los GPCR's y consiguientemente sugieren un cometido crítico y general de este proceso en una transactivación de EGFR. Hemos investigado por lo tanto el efecto del agente inhibidor de metaloproteinasas batimastato en una transactivación de EGFR inducida por GPCR así como por TPA. En células COS-7 un tratamiento previo con BB-94 abrogó completamente la fosforilación inducida por LPA y carbacol del EGFR, así como la activación del receptor mediada por TPA (Fig. 4d). Puesto que la fosforilación en tirosina de EGFR mediada por TPA pero no por GPCR es sensible a una inhibición de PKC en células COS-7 (datos no mostrados), se pone de manifiesto que existen por lo menos dos distintas trayectorias de transactivación dependientes de metaloproteinasas. Se obtuvieron unos resultados análogos para una transactivación inducida por ET-1 en células HEK 293 y la fosforilación en tirosina de EGFR estimulada por bradicinina en células PC12 (datos no mostrados). Finalmente, la implicación general de un tratamiento proteolítico en una transactivación de EGFR y una transmisión de señales corriente abajo es demostrada por la abrogación completa por el batimastato de la fosforilación en tirosina de SHC inducida por GPCR y TPA (Fig. 4e).

Puesto que el cometido bien establecido de los miembros de la familia de los EGFR en la patogénesis de una diversidad de cánceres y la abundancia fisiológica de ligandos de GPCR tales como LPA, hemos abordado la importancia patofisiológica de una transactivación con el linaje de células humanas de cáncer de próstata PC-3, que se ha informado que utiliza trayectorias dependientes de EGFR para la promoción del crecimiento y es capaz de responder también al ligando de GPCR bombesina^{27,28}. La Figura 4f muestra que en células PC-3 que habían sido privadas de suero durante 36 horas, la bombesina, el TPA y el EGF inducen la fosforilación por tirosina del EGFR que es completamente bloqueada por un tratamiento con batimastato. Más aun, incluso un alto contenido constitutivo de fosfotirosina del EGFR en células PC-3 que no habían sido privadas, es reducido por un tratamiento a largo plazo con BB-94 (Fig. 4g). En definitiva, nuestros resultados permiten sacar la conclusión de que una disociación de un precursor mediada por metaloproteinasas representa un enlace directo entre la activación con BombR, la fosforilación constitutiva en tirosina del EGFR y la proliferación de células humanas de cáncer de próstata. Recientemente, se ha informado que el ADAM9, que es un miembro de la familia de las desintegrinas – metaloproteinasas, trata al proHB-EGF después de un tratamiento con TPA de células Vero-H²⁴. Fuimos incapaces, sin embargo, de bloquear la transactivación de EGFR con mutantes de ADAM9 negativos predominantemente en células COS-7 y HEK 293 (datos no mostrados) dejando sin resolver la identidad de la proteasa que efectúa el tratamiento del precursor.

Nuestros hallazgos identifican al precursor de HB-EGF expresado ubicuamente y a una actividad de metaloproteinasas como elementos críticos de la trayectoria entre señales de GPCR y la activación del EGFR y extienden nuestra comprensión de los mecanismos que subyacen en los múltiples procesos biológicos, que se conoce que son regulados por proteínas G heterotriméricas. Basándose en nuestro estado actual de comprensión, la transactivación de señales de EGFR inducida por GPCR representa un nuevo paradigma, puesto que implica a tres diferentes sucesos de transmisión de señales transmembranales: En primer lugar, un ligando activa a las proteínas G heterotriméricas por interacción con un GPCR que da como resultado una señal intracelular que induce la actividad extracelular de una metaloproteinasas transmembranal. Esto da como resultado entonces un tratamiento extracelular de un precursor de factor de crecimiento transmembranal y una liberación del factor maduro que, directamente o a través de la matriz de proteoglicano, interactúa con el ectodominio del EGFR, conduciendo a una autofosforilación intracelular y a una generación de señales. Nuestros hallazgos anteriores indican que esta trayectoria puede ser utilizada por una diversidad de GPCR's en diversos tipos de células y que la preferida diana de transactivación es el EGFR y sus relativos¹⁻⁴. La demostración de la relevancia patofisiológica de este nuevo mecanismo en células de cáncer de próstata nos conduce a proponer que una transactivación de EGFR a través de un tratamiento proteolítico mediado por proteínas G de un precursor de factor de crecimiento, constituye un mecanismo general con una amplia importancia. Además, puesto que una gran variedad de polipéptidos bioactivos tan diversos como el TNF- α , el ligando de FAS o la L-selectina, son productos de tratamiento de precursores transmembranales²⁹ que han sido conectados con trastornos patofisiológicos, nuestros hallazgos han arrojado nueva luz acerca de la importancia de las proteinasas asociadas con membranas como dianas para estrategias de intervención en enfermedades.

55 Ejemplo 2 (para comparación)

La transactivación de EGFR y el efecto del agente inhibidor de proteinasas DB94 se ensayaron con una pluralidad de células de cánceres humanos. El resumen de los resultados es como sigue

Linaje de células de cáncer de	Ensayado	Transactivación	Efecto de DB94
sistema gástrico	1	1	-
próstata	3	1	1
ovario	5	3	5
riñón	7	5	3
hígado	2	1	1
colon	4	2	2
mama	8	3	2
páncreas	8	5	8
vejiga	6	4	2
glioblastoma	5	3	3
pulmón (NSCLC)	7	4	4

Lista de referencias

1. Daub y colaboradores, EMBO J. 16, 7032-7044 (1997)
- 5 2. Daub y colaboradores, Nature 379, 557-560 (1996)
3. Luttrell y colaboradores, Curr. Opin. Cell Biol. 11, 177-183 (1999)
4. Hackel y colaboradores, Curr. Opin. Cell Biol. 11, 184-189 (1999)
5. Eguchi y colaboradores, J. Biol. Chem. 273, 8890-8896 (1998)
6. Luttrell y colaboradores, J. Biol. Chem. 272, 4637-4644 (1997)
- 10 7. Keely y colaboradores, J. Biol. Chem. 273, 27111-27117 (1998)
8. Tsai y colaboradores, EMBO J. 16, 4597-4605 (1997)
9. Li y colaboradores, EMBO J. 9, 2574-2583 (1998)
10. Seedorf y colaboradores, J. Biol. Chem. 266, 12424-12431 (1991)
11. Kovalenko y colaboradores, Cancer Res. 54, 6106-6114 (1994)
- 15 12. Vogel y colaboradores, Science 259, 1611-1614 (1993)
13. Matco y colaboradores, Immunotechnology 3, 71-81 (1997)
14. Massagè & Pandiella, Annu. Rev. Biochem. 62, 515-541 (1993)
15. Green y colaboradores, BioEssays 18, 639-646 (1996)
16. Bosenberg y colaboradores, J. Cell Biol. 122, 95-101 (1993)
- 20 17. Goishi y colaboradores, Mol. Biol. Cell 6, 967-980 (1995)
18. Dethlefsen y colaboradores, C. J. Cell. Biochem. 69, 143-153 (1998)
19. Zwick y colaboradores, J. Biol. Chem. 272, 24767-24770 (1997)
20. Raab & Klagsbrun, Biochim. Biophys. Acta 1333, F179-F199 (1997)
21. Naglich y colaboradores, Cell 69, 1051-1061 (1992)
- 25 22. Mitamura y colaboradores, J. Biol. Chem. 270, 1015-1019 (1995)
23. Chen y colaboradores, EMBO J. 15, 1037-1044 (1996)
24. Izumi y colaboradores, EMBO J. 17, 7260-7272 (1998)
25. Wojtowicz-Praga y colaboradores, Investigational New Drugs 15, 61-75 (1997)
26. Brown y colaboradores, J. Biol. Chem. 273, 17258-17268 (1998)
- 30 27. Ching y colaboradores, Mol. Cell Biochem. 126, 161-158 (1993)
28. Hoosein y colaboradores, J. Urol. 149, 1209-1213 (1993)
29. Werb, Cell 91, 439-442 (1997)
30. Schägger & von Jagow, Anal. Biochem. 166, 368-379 (1987)
31. Amour y colaboradores, FEBS Lett. 435, 39-44 (1998)

REIVINDICACIONES

1. Uso de un agente modulador que actúa sobre un precursor de factor de crecimiento, que inhibe el tratamiento del precursor de factor de crecimiento, inhibiendo de esta manera la activación del dominio extracelular de un receptor de factor de crecimiento, para la producción de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento de cánceres que son inducidos por una transducción de señales mediada por proteínas G, en que el medicamento comprende el agente modulador en una cantidad suficiente para inhibir por lo menos parcialmente una activación del receptor de factor de crecimiento, en donde dicho modulador actúa sobre el pro-HB-EGF.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que el receptor de factor de crecimiento es un receptor de factor de crecimiento de la familia de los EGFR, particularmente el EGFR.
3. El uso de la reivindicación 1 en el que dicho agente modulador es el CRM 197.
4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho precursor de factor de crecimiento es el proHB-EGF y dicho receptor de factor de crecimiento es el EGFR.
5. El uso de una cualquiera de las precedentes reivindicaciones en el que dicho modulador es formulado en la forma de una composición farmacéuticamente aceptable.

Fig.1a

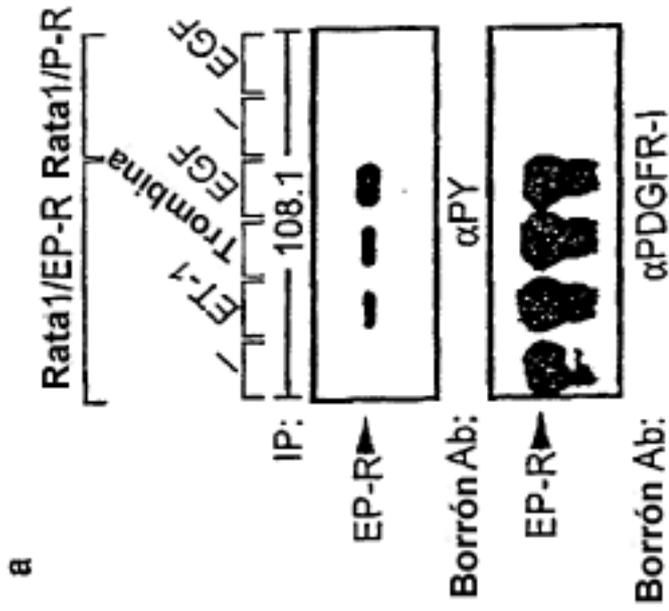
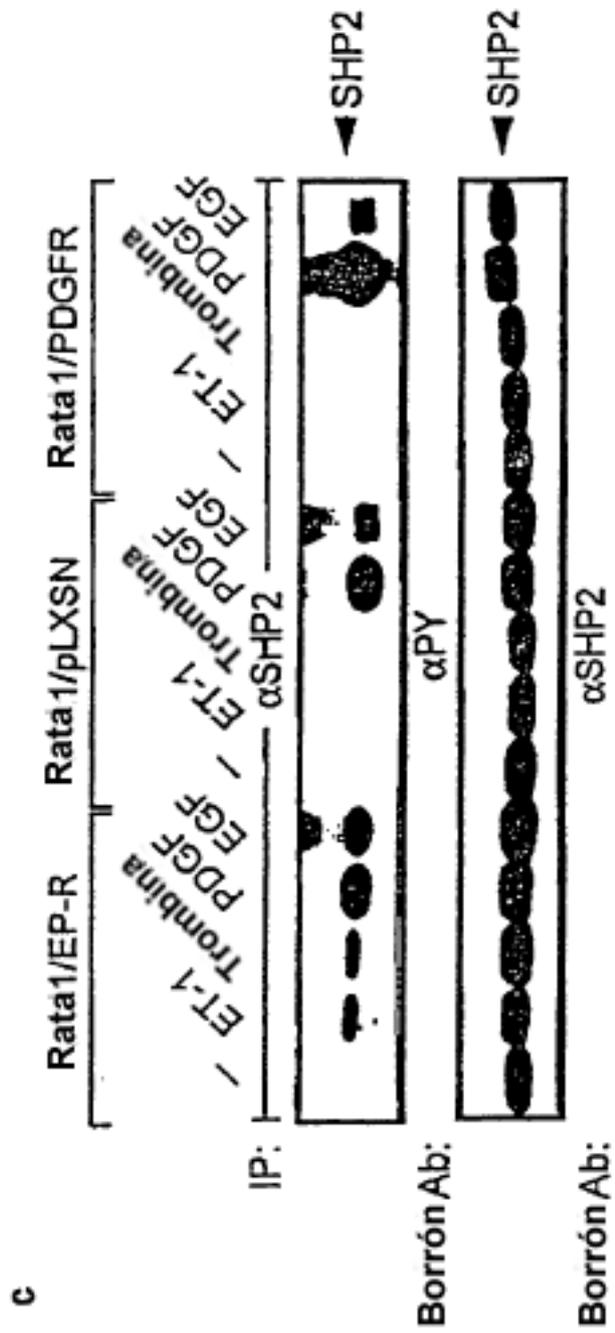


Fig. 1c



Fig, 1e

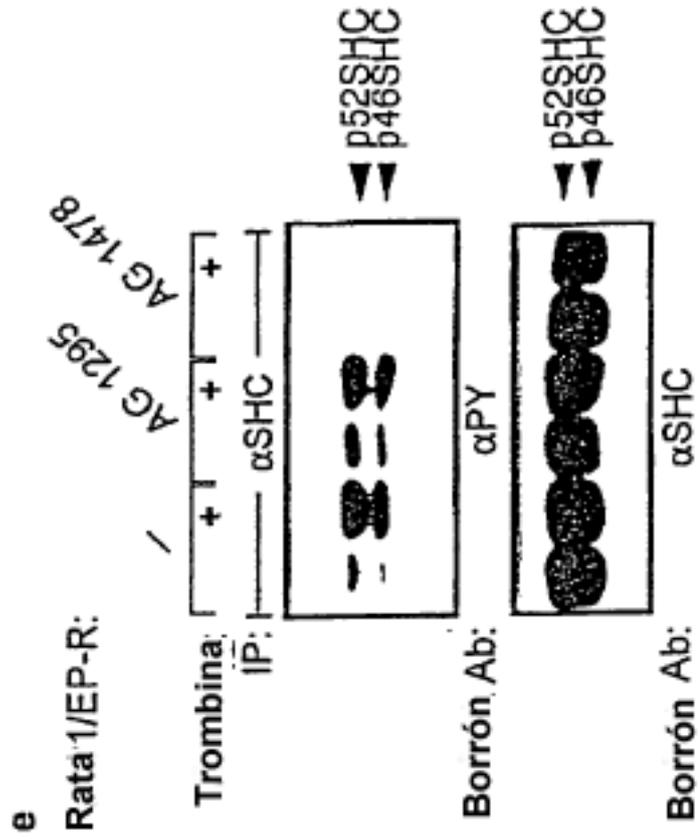


Fig. 2a

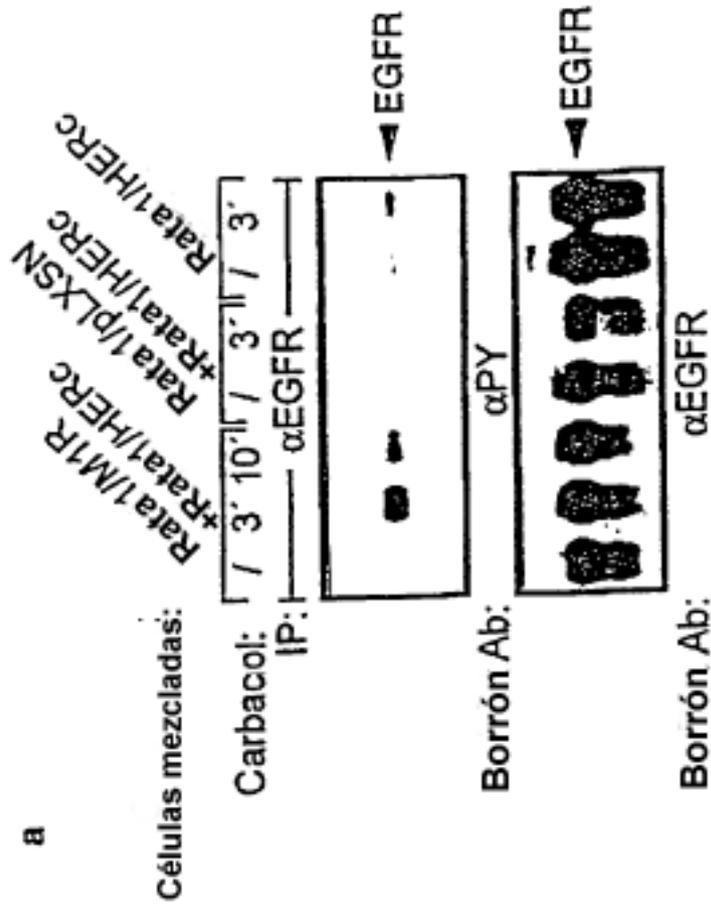


Fig. 2b

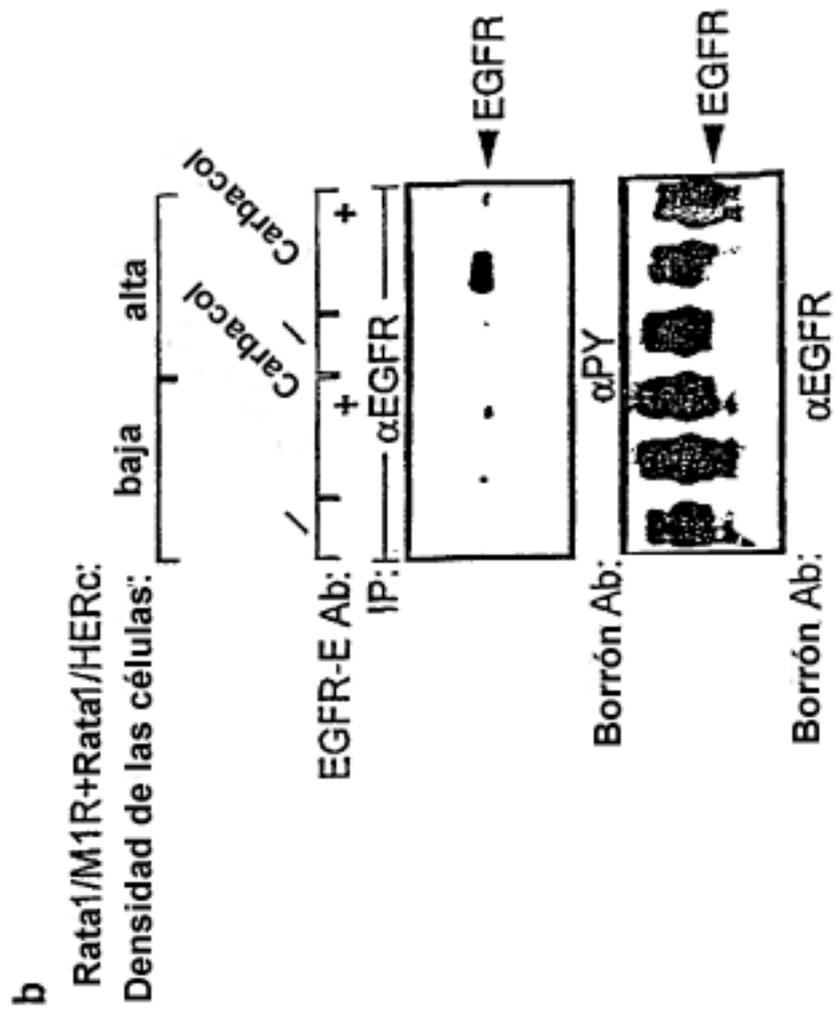


Fig. 2c

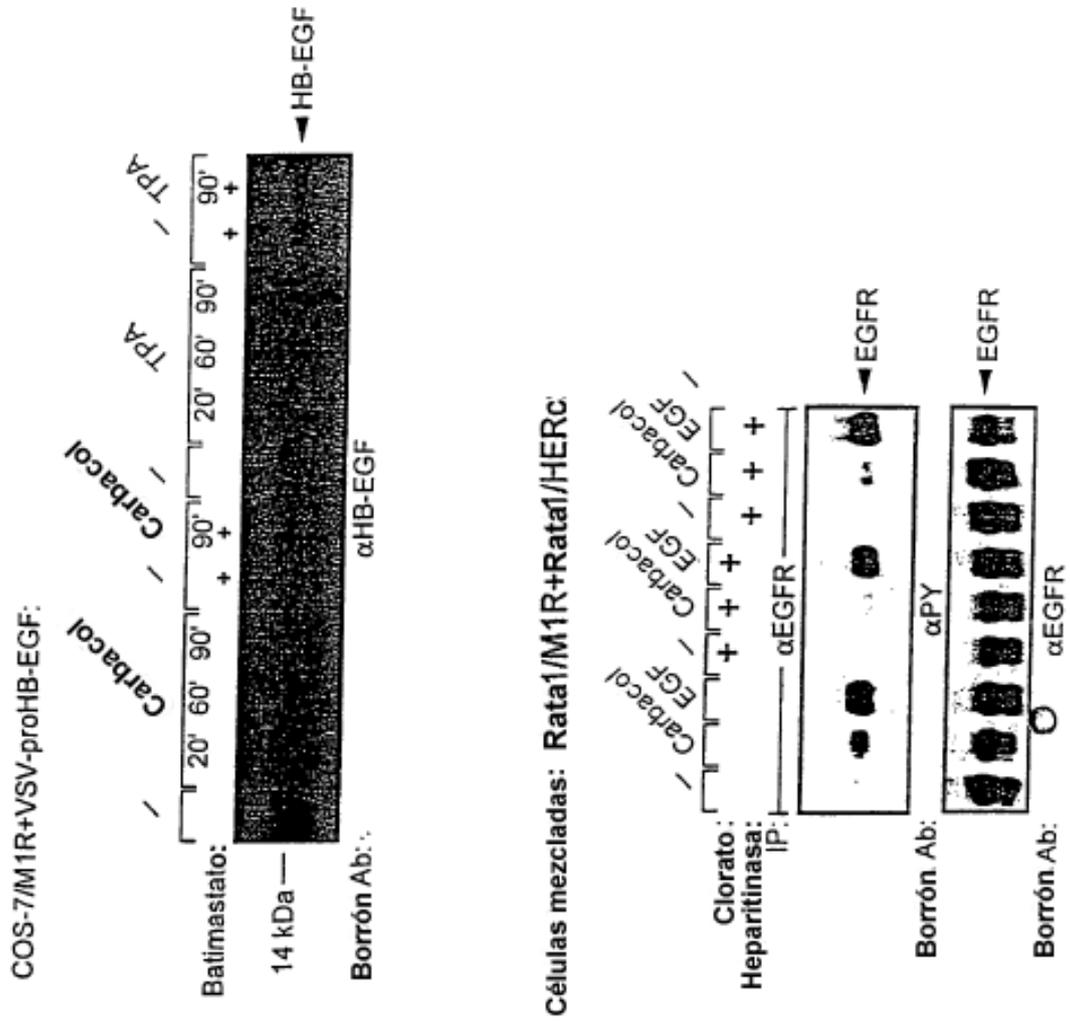


Fig. 3a

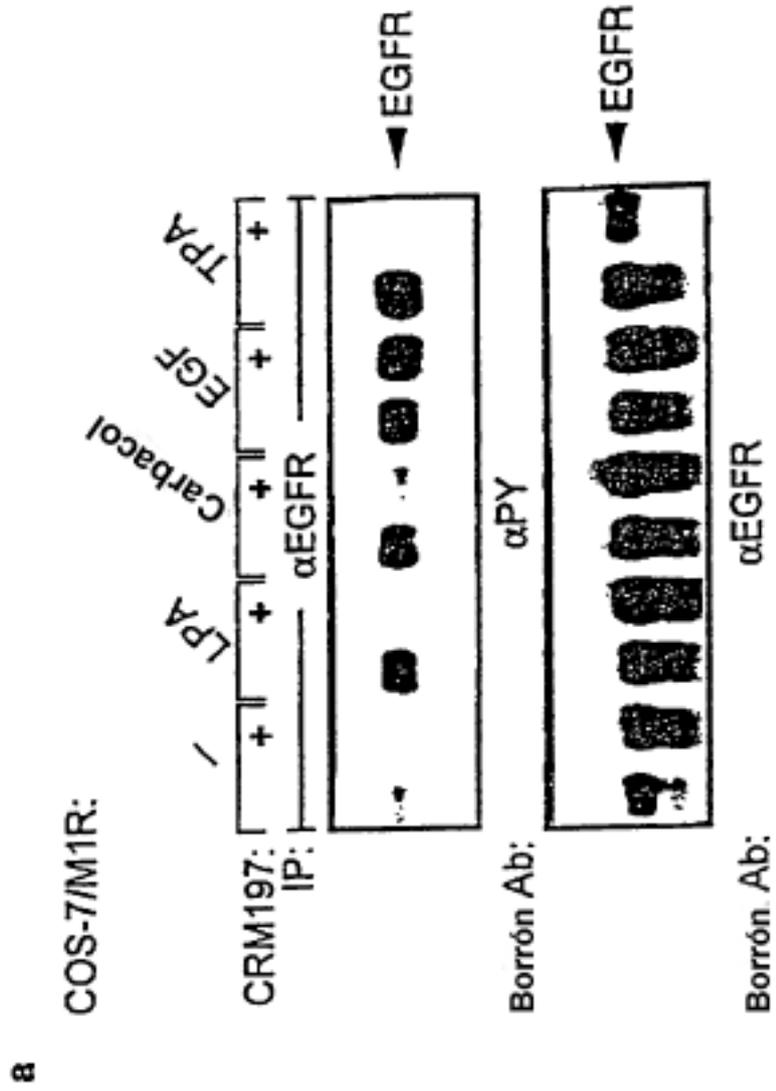


Fig. 3b

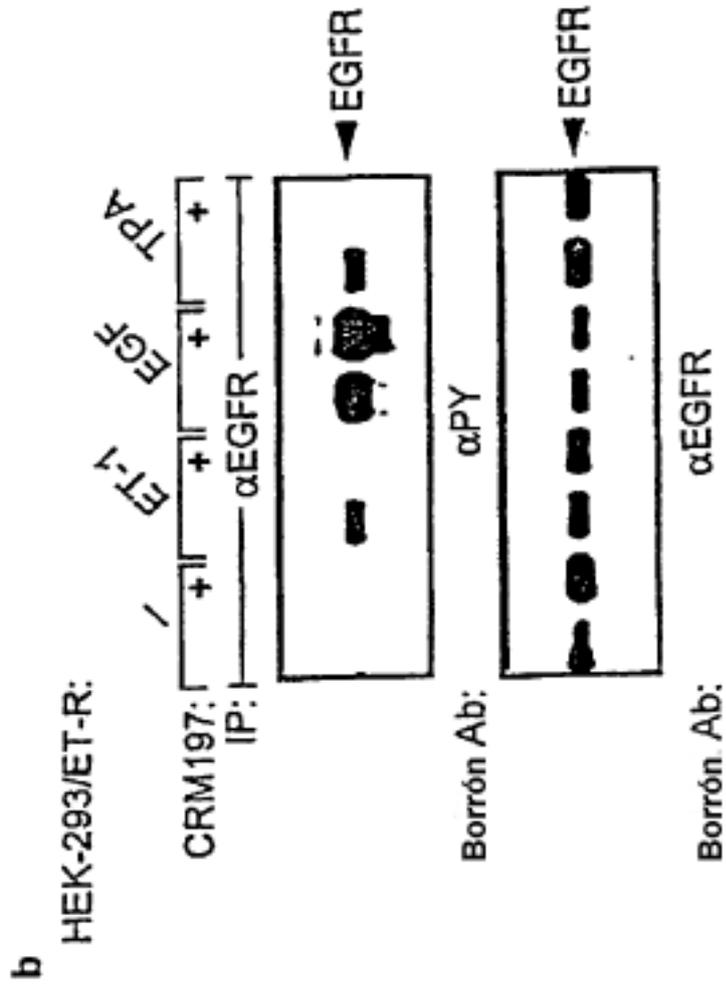


Fig. 3c

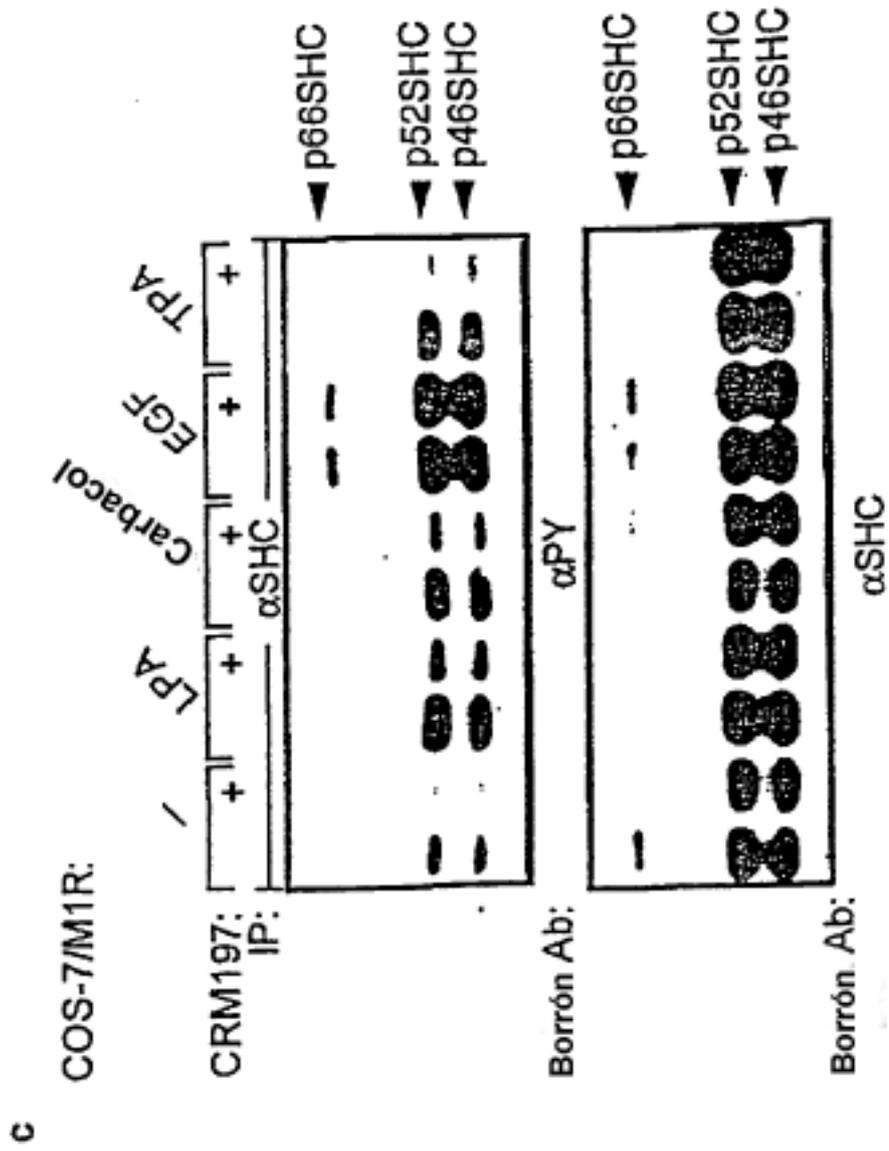


Fig. 3d

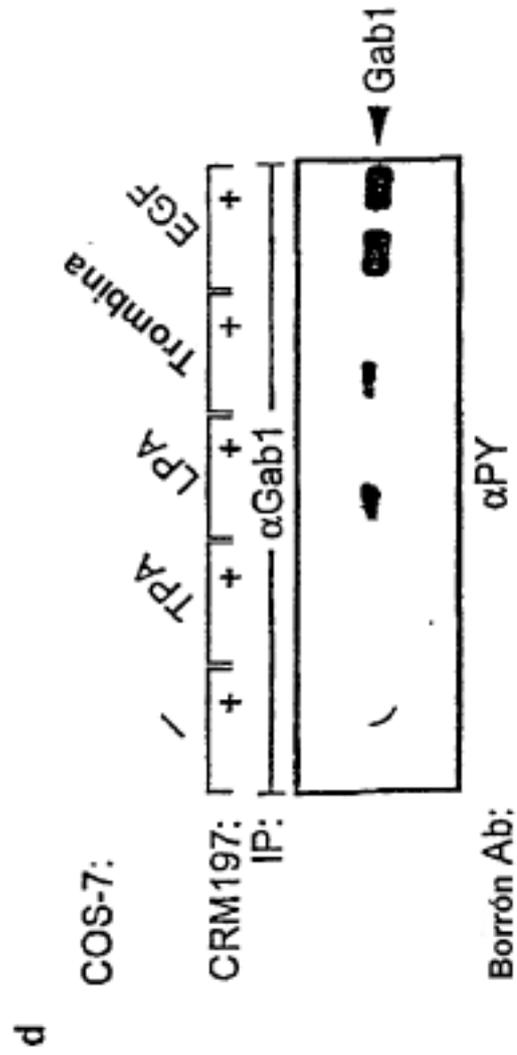


Fig. 4a

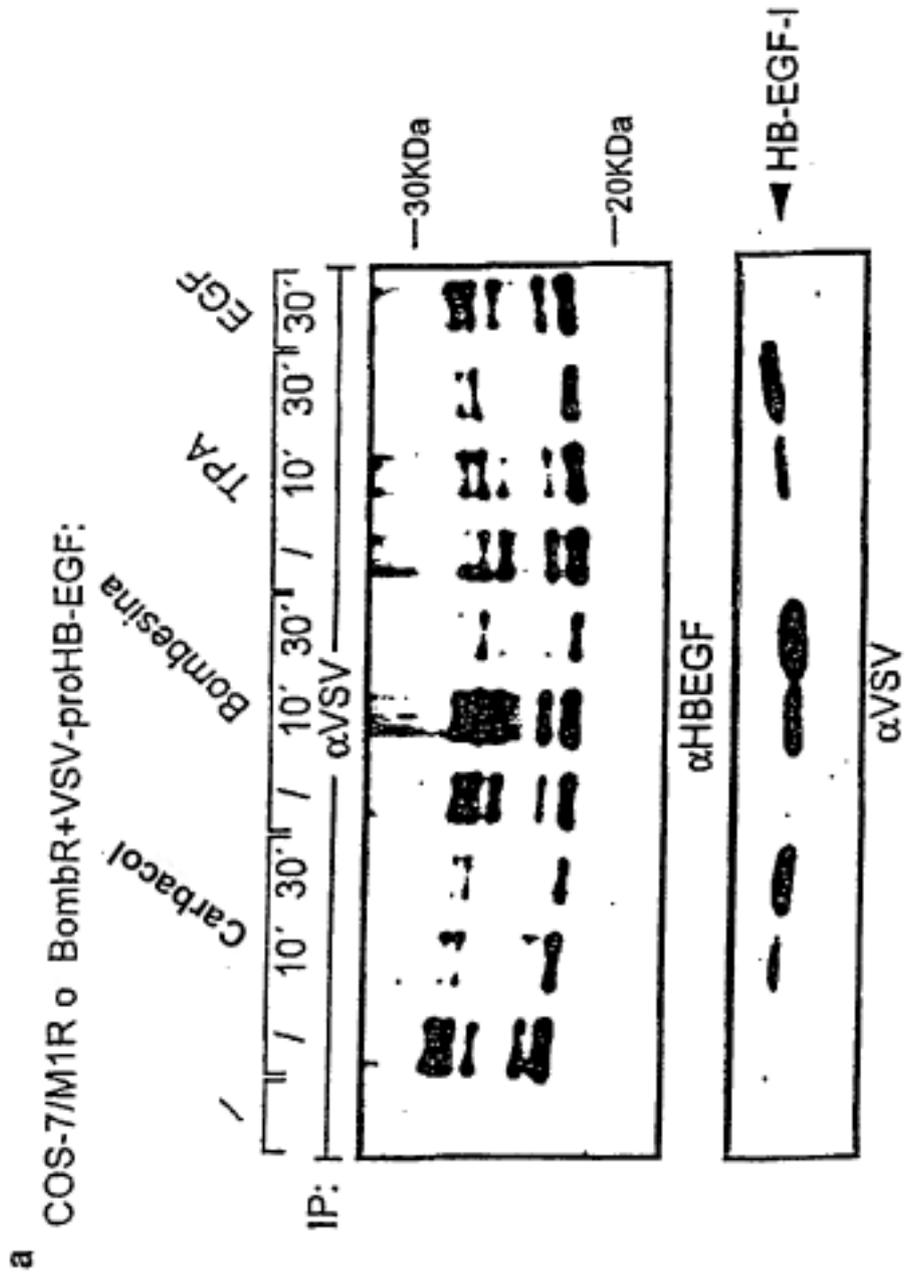


Fig.4b

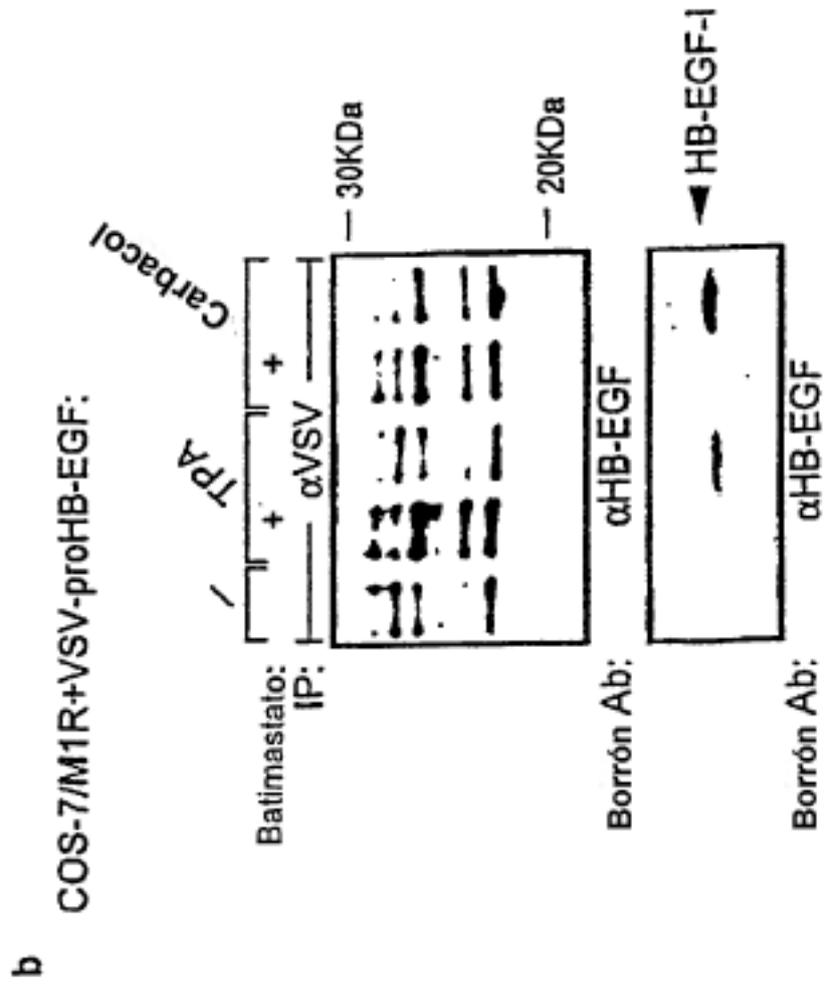


Fig. 4c

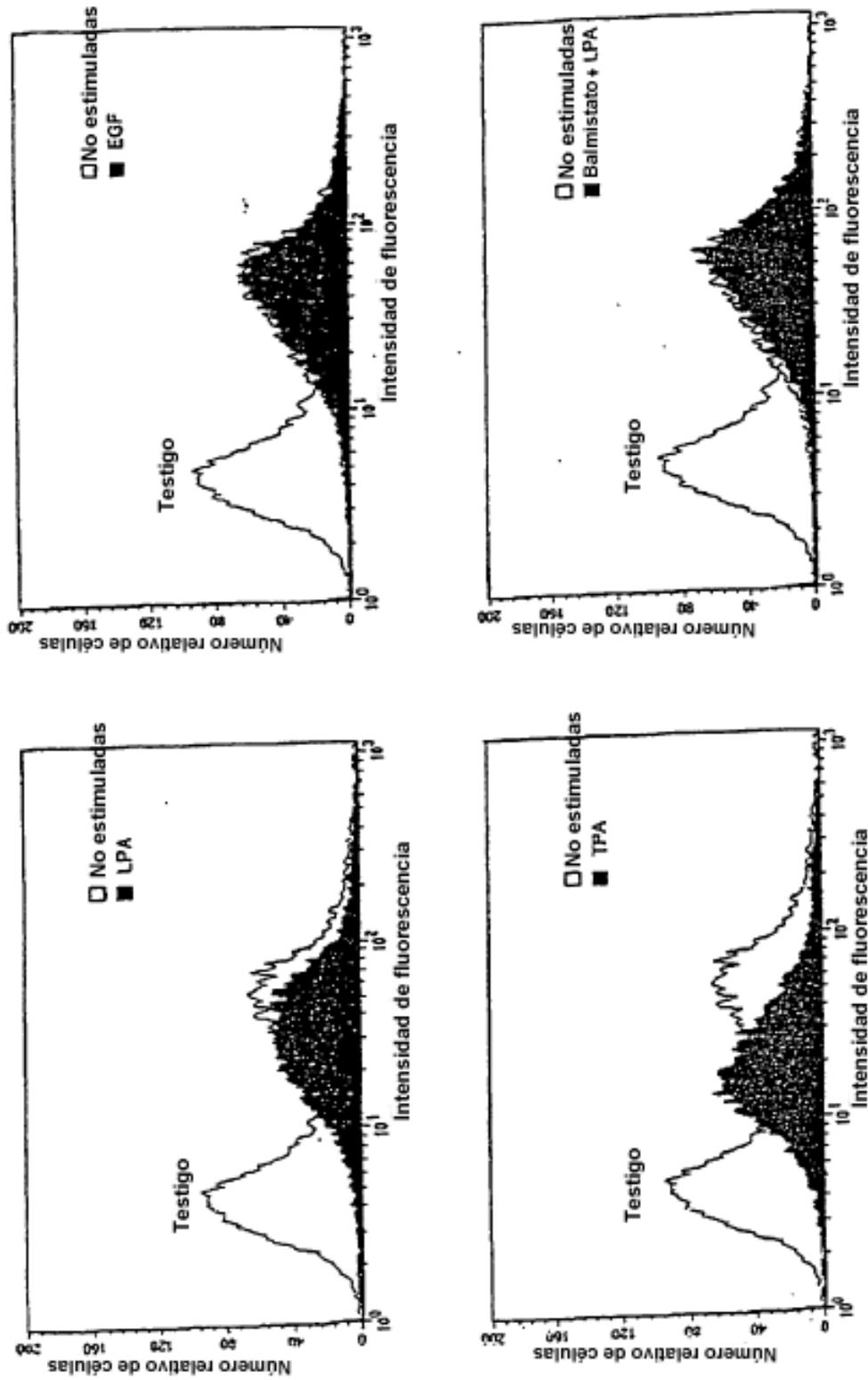


Fig. 4d

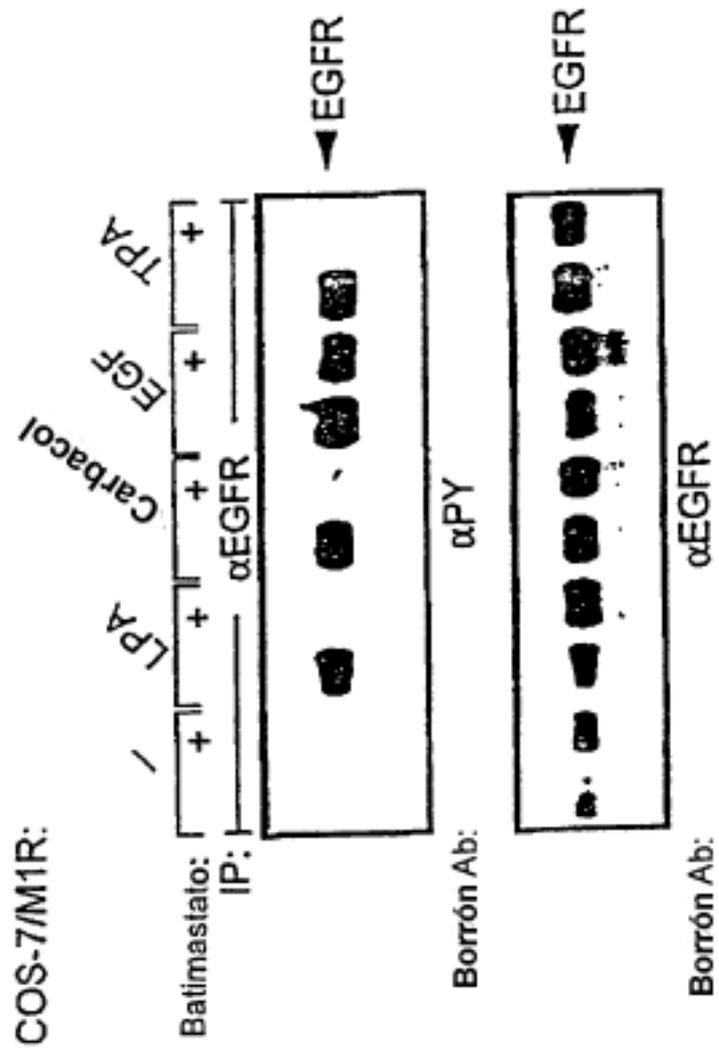


Fig. 4e

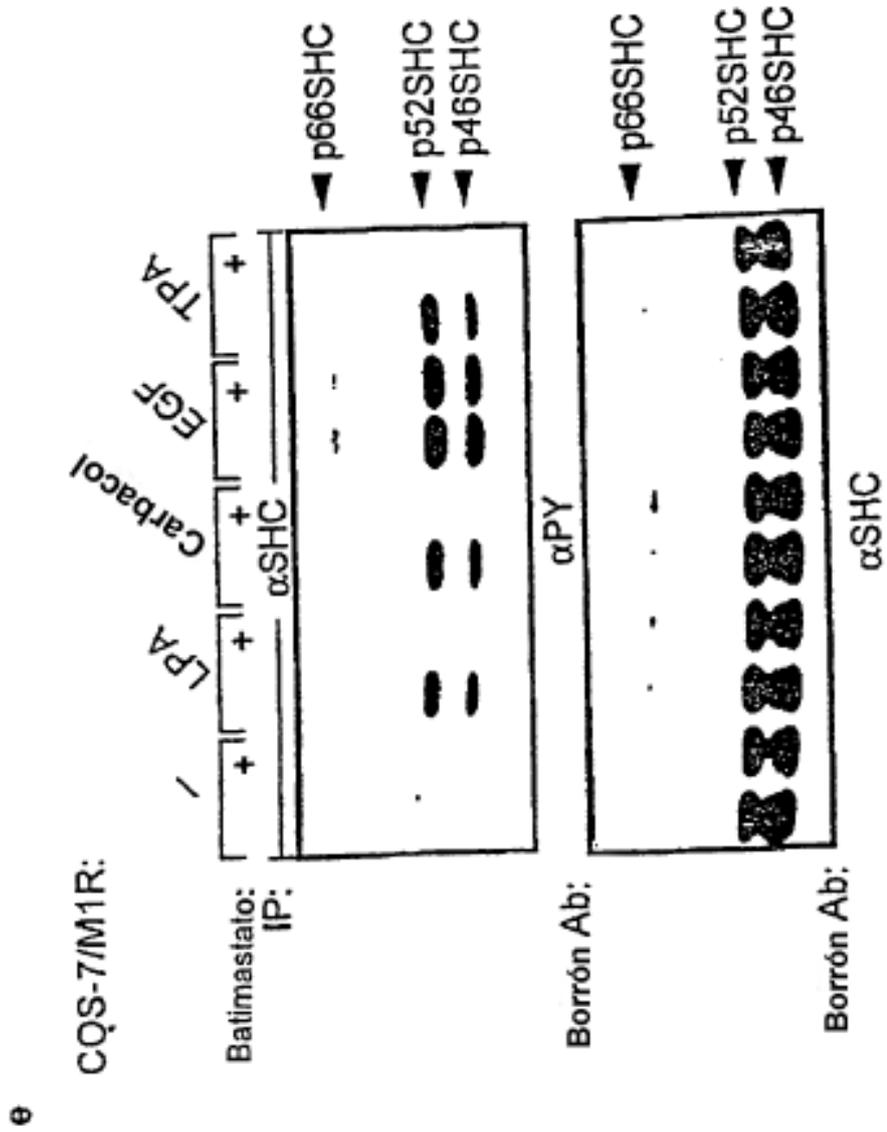


Fig. 4f

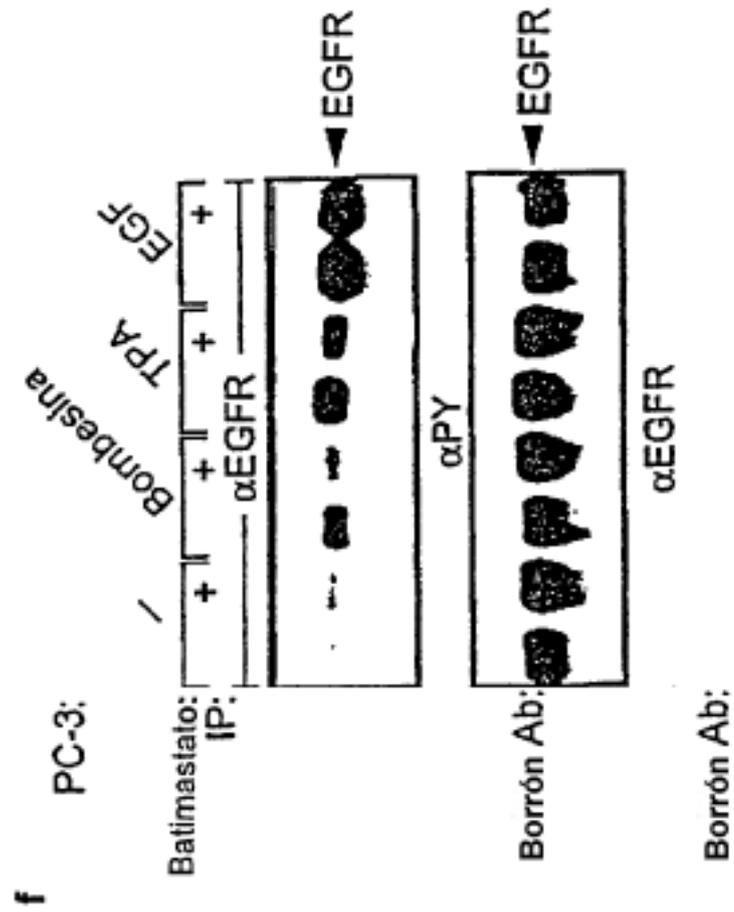


Fig. 4g

