

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 932**

51 Int. Cl.:

C07K 14/71 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.1999 E 06076149 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 1745799**

54 Título: **Composiciones y métodos de tratamiento de tumores**

30 Prioridad:

04.03.1998 US 76788 P

08.07.1998 US 111681

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

24.11.2015

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
3700 MARKET STREET, SUITE 300
PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA 191, US**

72 Inventor/es:

**GREENE, MARK I.;
O'ROURKE, DONALD M.;
MURALI, RAMACHANDRAN y
PARK, BYEONG-WOO**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 551 932 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

Composiciones y métodos de tratamiento de tumores

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica prioridad con la solicitud provisional de los Estados Unidos No. 60/076,788 presentada el 4 de marzo de 1998. Esta solicitud está relacionada con el Número de Serie de los Estados Unidos No. 08/737,269 presentada el 11 de febrero de 1997, admitida, que es la solicitud en Etapa Nacional de los Estados Unidos de la solicitud PCT PCT/US95/05614 presentada el 5 de mayo de 1995, y el Número de Serie de los Estados Unidos 08/239,202 presentada el 5 de mayo de 1994, abandonada.

Campo de la invención

10 La presente invención se relaciona con composiciones de anticuerpos que son útiles para convertir las células tumorales que son resistentes a la muerte celular inducida por la radiación en células que sean sensibles a la radiación.

La presente invención también divulga métodos de tratamiento de individuos que tienen tumores mediante la administración de tales composiciones en combinación con radiación.

15 Antecedentes de la invención

La familia erbB de receptores incluye erbB1 (EGFR), erbB2 (p185), erbB3 and erbB4. Ullrich, et al. (1984) Nature 309, 418-425, describen los EGFR. Schechter, A. L., et al. (1984) Nature 312, 513-516, y Yamamoto, T., et al. (1986) Nature 319, 230-234, describen p185neu/erbB2. Kraus, M. H., et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9193-9197 los cuales están incorporados aquí como referencia, describen erbB3. Plowman, G. D., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1746-1750, describen erbB4.

25 El protooncógeno celular de rata c-neu y su contraparte humano c-erbB2 codifica glicoproteínas de membrana de 185 kDa denominadas p185. La actividad de la tirosina quinasa (tk) ha sido relacionada a la expresión del fenotipo transformante de p185 oncogénico (Bargmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1988, 85, 5394; y Stem et al., Mol. Cell. Biol., 1988, 8, 3969, cada uno). El neu oncogénico fue identificado inicialmente en neuroglioblastomas de rata (Schechter et al., Nature, 1984, 312, 513) y se encontró que se activaba por una mutación puntual inducida por carcinógenos generando una sustitución de aminoácido única, una sustitución Val a Glu en la posición 664, en la región de la membrana de la proteína transformadora (Bargmann et al., Cell, 1986, 45, 649). Esta alteración dio como resultado actividad constitutiva de su quinasa intrínseca y en la transformación maligna de las células (Bargmann et al., EMBO J., 1988, 7, 2043). La activación de la proteína tirosina quinasa p185 oncogénica parece estar relacionada con un cambio en el equilibrio molecular a partir de formas monoméricas a dimericas (Weiner et al., Nature, 1989, 339, 230).

35 La sobreexpresión de c-neu o c-erbB2 a niveles de 100 veces superior al normal (esto es, >106 receptores/célula) también da como resultado la transformación de células NIH3T3 (Chazin et al, Oncogene, 1,992, 7, 1.859; DiFiore et al., Science, 1.987, 237, 178; y DiMarco et al, Mol Cell Biol, 1990, 10, 3247). Sin embargo, las células NIH3T3 o células NR6 que expresan celular-p185 en el nivel de 105 receptores/célula no se transforman (Hung et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU., 1989, 86, 2545; y Kokai et al., Cell, 1989, 58, 287), a menos que se coexpresen con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), una tirosina quinasa homóloga (Kokai et al., Cell, 1989, 58, 287). Así, tanto el p185 celular como el p185 oncogénico, pueden dar como resultado la transformación de las células.

40 El p185 celular es altamente homólogo con el EGFR (Schechter et al., Nature, 1984, 312, 513; y Yamamoto et al., Nature 1986, 319, 230) pero no obstante es distinto. Numerosos estudios indican que el EGFR y el p185 celular son capaces de interactuar (Stem et al, Mol Cell Biol, 1988, 8, 3969; King et al., EMBO J., 1988, 7, 1647; Kokai et al.; Proc Natl Acad Sci EE.UU., 1988, 85, 5389; y Dougall et al., J. Cell Biochem, 1993, 53, 61). La asociación intermolecular del EGFR y p185 celular parece hasta sobreregular la función del EGFR (Wada et al., Cell, 1990, 61, 1339). Además, heterodímeros que forman complejos de quinasa activos tanto in vivo como in vitro pueden ser detectados (Qian et al., Proc. Acad. Sci. EE.UU., 1992, 89, 1330).

45 De la misma forma, se han informado interacciones de p185 con otros miembros de la familia erbB (Carraway et al., Cell 1994, 78, 5-8; Alroy et al, FEBS Lett. 1997, 410, 83-86; Riese et al, Mol. Cell Biol. 1995, 15, 5770-5776; Tzahar et al., EMBO J. 1997, 16, 4938-4950; Surden et al., Neuron 1997, 18, 847-855; Pinkas-Kramarski et al., Oncogene 1997, 15, 2803-2815). Formas de p185 humanos heterodímeros, ya sea con erbB3 o erbB4 bajo condiciones fisiológicas, principalmente en el músculo cardíaco y el sistema nervioso, particularmente en el desarrollo.

50 Proteínas p185 celulares se encuentran en las células adultas secretoras epiteliales del pulmón, de la glándula salival, del seno, del páncreas, del ovario, del tracto gastrointestinal, y de la piel (Kokai et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU., 1987, 84, 8498; Mori et al, Lab Invest, 1989, 61, 93; y Press et al., Oncogene, 1990, 5, 953). Estudios

recientes han encontrado que la amplificación de c-erbB2 se produce con alta frecuencia en un número de adenocarcinomas humanos tales como adenocarcinomas gástrico (Akiyama et al., Science, 1986, 232, 1644), de pulmón (Kern et al., Cancer Res., 1990, 50, 5184, que se incorpora aquí como referencia) y pancreático (Williams et al., Pathobiol., 1991, 59, 46). También se ha informado de que la expresión de c-erbB2 incrementada en un subconjunto de carcinomas de seno y de ovario está vinculada a una prognosis clínica menos optimista (Slamon et al., Science, 1987, 235, 177; y Slamon et al., Science, 1989, 244, 707). La asociación heterodimérica de EGFR y p185 también se ha detectado en líneas celulares de cáncer de seno humano, tales como SK-Br-3 (Goldman et al., Biochemistry, 1990, 29, 11024), y células transfectadas (Spivak-Kroizman et al., J. Biol. Chem., 1992, 267, 8056). Adicionalmente, se han informado de casos de coexpresión de erbB2 y EGFR en cánceres de seno y de próstata. Además, la asociación heterodimérica de p185 y erbB3, así como la asociación heterodimérica de p185 y erbB4 también se han detectado en cánceres humanos. La coexpresión de erbB2 y erbB3 se ha observado en los cánceres de seno humanos. La coexpresión de EGFR, erbB2, y erbB3 se ha visto en carcinoma de próstata.

La amplificación y/o la alteración del gen EGFR se observan frecuentemente en la progresión del tumor glial (Sugawa, et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci 87: 8602-8606; Ekstrand, et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 4309-4313), particularmente en glioblastoma, el tumor glial más maligno (Libermann, et al. Supra; Wong, et al. Supra; James, et al. (1988) Cancer Res. 48: 5546-5551; Cavenee, W.K. (1992) Cancer 70: 1788-93; Nishikawa, et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 7727-7731; Schlegel, et al. (1994) Int J. Cancer 56: 72-77). Una proporción significativa de estos tumores muestran amplificación de EGFR con o sin alteración del gen (Ekstrand, et al. Supra; Libermann, et al. Supra; Wong, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:6899-6903), y esto ha sido correlacionado con un intervalo más corto de recurrencia de la enfermedad y una supervivencia más pobre (Schlegel, et al. Supra)

La amplificación del EGFR puede estar asociada con transcriptos del EGFR aberrantes junto con transcriptos EGFR normales (Sugawa, et al. Supra). La amplificación frecuente y subsecuente alteración estructural sugieren que el EGFR puede ser importante para el mantenimiento del fenotipo de glioma maligno. Un mutante del EGFR observado frecuentemente ha sido identificado en un subconjunto de glioblastomas humanos y resulta de un truncamiento en marco de 801 pb (que corresponde a los exones 2-7) en el dominio extracelular del receptor (Sugawa, et al. Supra; Ekstrand, et al. Supra; Malden, et al. (1988) Cancer Res. 48: 2711-2714; Humphrey, et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 4207-4211; Wong, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 2965-2969), el cual se cree que da como resultado la activación de la quinasa constitutiva y también puede afectar a las propiedades de enlazamiento a ligando de la molécula (Nishikawa, et al. Supra; Callaghan, et al. (1993) Oncogene 8: 2939-2948).

Mutaciones observadas del EGFR en enfermedades malignas epiteliales consisten de sobreexpresión con o sin amplificación y, con menor frecuencia, de alteraciones de la secuencia de codificación. La transformación oncogénica causada por mutantes del EGFR parece ser específica de tejido y se han observado en la leucemia eritroide, fibrosarcoma, angiosarcoma, melanoma, así como en glioblastoma (Carter, et al. (1994) Crit Rev Oncogenesis 5: 389-428). La sobreexpresión del EGFR normal puede causar la transformación oncogénica en ciertos casos, probablemente de una manera dependiente del EGF (Carter, et al. Supra; Haley, et al. (1989) Oncogene 4: 273-283). La transfección de altas cantidades de EGFR de tipo silvestre en células NIH3T3 da como resultado la transformación dependiente de ligando pero incompleta (Yamazaki, et al. (1990) Jpn. J. Cancer Res. 81: 773-779). La sobreexpresión puede causar la regulación alterada del ciclo celular de la quinasa del EGFR, y contribuir al estado transformado, como se ha observado para p185neu oncogénico (Kiyokawa, et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92:1092-1096).

Ezequiel, M. P. et al., Actas de ASCO, Volumen 17, 1.998, Abstract n ° 1 522 se refiere a un estudio de seguridad en Fase I de un anticuerpo del receptor del factor de crecimiento anti-epidérmico (EGFR), C225, en combinación con la irradiación, en pacientes con Carcinoma avanzado de Células Escamosas de Cabeza y Cuello (SCCHN).

Balaban, N. et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1314, (1996) 147-156 informa de experimentos que investigan el efecto de la radiación ionizante en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en las células epiteliales tumorales A431. También se estudiaron los efectos de un anticuerpo monoclonal anti-EGFR (LA22).

Wollman, R. et al., International Journal of Radiation Oncology. Biology, Physics, Vol.30, N° 1. 1994, 91-98 informa de trabajo que investiga el efecto del factor de Crecimiento epidérmico (EGF) en la sensibilidad del crecimiento y la radiación de células MCF-7 in vitro.

Hay necesidad de composiciones terapéuticas útiles para el tratamiento de individuos identificados por tener tumores mediados por erbB. Hay una necesidad de desarrollar composiciones profilácticas para individuos susceptibles de desarrollar tumores mediados por erbB. Hay necesidad de métodos de tratamiento de individuos identificados como teniendo tumores mediados por erbB. Hay necesidad de métodos para evitar que individuos que son susceptibles de desarrollar tumores mediados por erbB desarrollen tales tumores.

Resumen de la invención

La presente invención se relaciona con un anticuerpo para uso en el tratamiento de un individuo con un tumor mediado por erbB, que es administrado a dicho individuo en combinación con la radiación anticáncer, en donde el tumor se caracteriza por

a) homodímeros erbB que son homodímeros de EGFR mutantes u homodímeros de p185 y/o

- 5 b) heterodímero de erbB que son heterodímeros de p185/EGFR, heterodímeros de p185/EGFR mutante, heterodímeros de p185/erbB3, heterodímeros de p185/erb4 o heterodímeros de EGFR-/EGFR mutantes.

10 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo anti 185 humanizado o fragmento del mismo, o un anticuerpo anti-EGFR humanizado, o fragmento del mismo, y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo interrumpe la actividad de quinasa asociada con los dímeros y hace sensibles a la radiación las células tumorales previamente resistentes a la radiación.

De acuerdo con la invención, el tumor mediado por erbB puede ser mediado por P185. De acuerdo con esta realización, el p185 puede ser dimerizado con erbB3, erbB4, EGFR humano, o EGFR mutante humano. También de acuerdo con esta realización, el tumor puede estar asociado con carcinoma del pulmón, de páncreas, de seno o de ovario.

- 15 De acuerdo con la invención, el anticuerpo puede inhibir la formación de los dímeros de erbB.

De acuerdo con la invención, el anticuerpo es un anticuerpo anti-p185 humanizado o fragmento del mismo, o es un anticuerpo anti-EGFR humanizado o fragmento del mismo.

De acuerdo con la invención, la terapia de radiación podrá iniciarse una vez que el anticuerpo ha interrumpido la actividad de quinasa asociada con los dímeros.

- 20 La presente invención divulga métodos para tratar a individuos que tienen tumores mediados por proteína erbB que comprende las etapas de primero administrar a los individuos una composición que inhibe la formación de dímeros de proteínas erbB que producen actividad elevada de la tirosina quinasa en una célula tumoral, seguido por la exposición de los individuos a una cantidad terapéuticamente efectiva de radiación anticáncer.

- 25 La presente invención divulga métodos para tratar un individuo que tiene tumores que se caracterizan por células tumorales que tienen conjuntos de receptores multiméricos los cuales proveen actividad de la quinasa asociada con un fenotipo transformado. Los métodos comprenden las etapas de administrar al individuo, una composición que altera la actividad de la quinasa asociada con el conjunto receptor multimérico; y exponer al individuo a una cantidad terapéutica de radiación gamma.

- 30 La presente invención divulga métodos para tratar a los individuos que tienen tumores que se caracterizan por las células tumorales que comprenden una especie de EGFR tales como tipo silvestre o EGFR mutante. El método comprende las etapas de administrar al individuo, una composición que interrumpe la actividad quinasa mediada por una especie de EGFR; y exponer al individuo a una cantidad terapéutica de radiación gamma a dicho individuo.

- 35 La presente invención divulga métodos para tratar a un individuo que tiene un tumor mediado por la proteína erbB que comprende las etapas de administrar al individuo una composición que inhibe la formación de dímeros de proteínas erbB que producen actividad elevada de la tirosina quinasa en una célula tumoral, y exponer al individuo a una cantidad terapéuticamente efectiva de radiación anticáncer. En algunas realizaciones, el tumor mediado por la proteína erbB es un tumor mediado por p185. En algunas realizaciones, el tumor mediado por la proteína erbB es un tumor mediado por EGFR. En algunas realizaciones, el tumor mediado por la proteína erbB es un tumor glial. En algunas realizaciones, el tumor mediado por la proteína erbB es un glioblastoma. En algunas realizaciones, la administración de la composición es mediante administración intratumoral. En algunas realizaciones, el individuo tiene la cirugía antes de la administración de la composición. En algunas realizaciones, la composición que se administra a un paciente comprende un compuesto que interactúa con una proteína erbB en una célula tumoral para alterar la proteína erbB lo suficiente para dar como resultado una propensión disminuida de la misma para dimerizar con otra proteína erbB en donde el compuesto que interactúa con una proteína erbB en una célula tumoral para alterar la proteína erbB lo suficiente para dar como resultado una propensión disminuida de la misma a dimerizar con otra proteína erbB, es un anticuerpo o fragmento del mismo, como se define aquí. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, la composición que se administra a un paciente comprende un compuesto que interactúa competitivamente con una proteína erbB en una célula tumoral para inhibir competitivamente la formación de dímero con otra proteína erbB y prevenir actividad elevada de la tirosina quinasa, en donde el compuesto que interactúa competitivamente con una proteína erbB en una célula tumoral para inhibir competitivamente la formación de dímero con otra proteína erbB es un anticuerpo o fragmento del mismo, como se define aquí.

La presente invención divulga métodos para tratar un individuo que tiene un tumor, en donde el tumor se caracteriza por células tumorales que tienen conjuntos de receptores multiméricos que proveen actividad de quinasa asociada

con un fenotipo transformado. El método comprende las etapas de administrar al individuo, una composición que altera la actividad de quinasa asociada con el conjunto receptor multimérico; y que expone al individuo a una cantidad terapéutica de radiación gamma. En algunas realizaciones, el tumor se caracteriza por células tumorales que tienen conjuntos de receptores multiméricos seleccionados del grupo que consiste de: homodímeros, heterodímeros de erbB, heterodímeros de erbB, y multímeros de receptores del factor de crecimiento derivados de plaquetas. En algunas realizaciones, el tumor se caracteriza por células tumorales que tienen homodímeros erbB que son homodímeros de EGFR mutantes u homodímeros de p185. En algunas realizaciones, el tumor se caracteriza por células tumorales que tienen heterodímeros erbB que son heterodímeros de p185/EGFR, heterodímeros de p185/EGFR mutante, heterodímeros p185/erbB3; heterodímeros de p185/erbB4 o heterodímeros de EGFR/ EGFR mutantes. De acuerdo con la invención, la composición que altera la actividad de quinasa asociada con el conjunto receptor multimérico comprende un agente activo seleccionado del grupo que consiste de anticuerpos y fragmentos de los mismos, como se define aquí.

La presente invención divulga métodos para tratar un individuo que tiene un tumor, en donde el tumor se caracteriza por células tumorales que comprenden una especie de EGFR. Los métodos comprenden las etapas de administrar al individuo, una composición que interrumpe la actividad quinasa mediada por una especie de EGFR; y exponer al individuo a una cantidad terapéutica de radiación gamma para el individuo. En algunas realizaciones, la especie de EGFR es un EGFR mutante. La composición que interrumpe la actividad quinasa mediada, por una especie de EGFR comprende un agente activo seleccionado del grupo que consiste de anticuerpos y fragmentos de los mismos, como se define aquí.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A, 1B, 1C y 1D muestran los datos concernientes a la distribución del ciclo celular de las células de glioblastoma humano con o sin tratamiento de radiación. Las células se sembraron en placas de 60 mm y se dejaron unir antes de ser irradiadas bien por rayos gamma (10 Gy) (Figuras 1B y 1D) o irradiadas de forma falsa (Figura 1A y 1C). Después de 72 h, las células fueron analizadas por citometría de flujo después de la tinción PI. Las distribuciones de las células de acuerdo con el contenido de ADN se indican en cada panel. Se realizaron experimentos representativos cuatro veces independientes.

Las figuras 2A y 2B muestran los datos relativos a la determinación de la apoptosis y la supervivencia clonogénica siguiente a la irradiación gamma de células de glioblastoma humano. En la Figura 2A, las células se sembraron y se dejaron unir antes de ser expuestas a irradiación gamma (10 Gy) en 10% de suero o medio libre de suero. Después de 72 h, la cuantificación de la apoptosis se llevó a cabo por dos observadores independientes. El índice apoptótico es el porcentaje de células apoptóticas con evidencia morfológica de apoptosis tal como se determina por tinción de los núcleos con DAPI. Los resultados presentados son la media \pm S.E.M de cuatro experimentos independientes y la media se indica entre paréntesis. Las células U87MG fueron cultivadas en 10% de suero o medio libre de suero y las células U87/T691 fueron cultivadas en 10% de suero o medio libre de suero. En la Figura 2B, células de glioma humano U87MG y U373MG y derivados se tiñeron con DAPI y se analizaron para morfología apoptótica 72 h después de la irradiación gamma. La media se indica entre paréntesis y el índice mostrado en este experimento representativo es la media \pm S.D. Estos resultados fueron confirmados en dos experimentos adicionales. Los índices apoptóticos se percibieron como una subestimación ya que las células flotantes no pudieron ser analizadas por esta técnica.

La Figura 3 muestra la supervivencia clonogénica después de la irradiación. Las células se sembraron y se irradiaron con gamma con diferentes dosis de radiación seguida por incubación durante 7-10 días a 37 °C con 5% de CO₂. Las colonias fueron entonces teñidas y aquellas con más de 50 células se contaron bajo un microscopio de disección. El registro de la supervivencia se determinó entonces calculando la relación entre el número de colonias formadas con el número de células cultivadas, después de corregir en cuanto a la eficiencia de la siembra. Experimentos similares se realizaron tres veces.

La Figura 4 es un mapa esquemático de adenovirus recombinante H5.001CBLacZ.

La Figura 5 muestra la inhibición de la proliferación celular de p185^{c-erbB-2} que expresan células tumorales humanas. Se sembraron 5,000 células/pozo con la cantidad indicada de CDR4D5 mimético o anti-p185^{c-erbB-2}Ab (Neomarkers Inc., CA) e incubados a 37 grados durante 24 horas. Se agregaron 100 μ g de MTT (en 200 μ l) a cada pozo durante 4 horas, seguido por la adición de 100 μ l de regulador de lisis a cada pozo. Después de 12-24 horas, se leyó O.D. en un lector ELISA de 570 nm. El % de proliferación indica el grado de proliferación con respecto a las células de control (sin tratamiento CDR4D5 mimético o anti-p185^{c-erbB-2} Ab).

Las Figuras 6A y 6B muestran que el CDR4D5 mimético anti-p185^{c-erbB-2} sensibiliza las células tumorales humanas para apoptosis inducida por irradiación gamma. u3, u3T, S y M indican línea celular U373MG y U373/T691, SKBR3 y MCF7, respectivamente. m e ir m indican 4D5 mimético y CD4-serina mimético irrelevante.

Descripción de las realizaciones preferidas

Tal como se utiliza aquí, los términos "cáncer asociado a erbB" y "tumores asociados a erbB" están previstos para referirse a células tumorales y neoplasmas que expresan un miembro de la familia del gen erbB, la expresión de lo cual da como resultado la transformación mediada por erbB. Tumores asociados con Neu y tumores asociados con EGFR son ejemplos de tumores asociados con erbB.

5 Tal como se utiliza aquí, los términos "cáncer asociado con neu" "tumores asociados con neu" y "tumores asociados con p-185" están previstos para referirse a las células tumorales y neoplasmas que expresan el gen neu para producir p185. El cáncer asociado con Neu es un cáncer asociado con erbB en el cual la transformación celular está mediada por la actividad de tirosina quinasa relacionada con p185.

10 Tal como se utiliza aquí, los términos "cáncer asociado con EGFR" y "tumores asociados con EGFR" están previstos para referirse a células tumorales y neoplasmas que expresan EGFR. El cáncer asociado con EGFR es un cáncer asociado con erbB en el cual la transformación celular está mediada por la actividad de tirosina quinasa relacionada con EGFR.

15 Tal como se utiliza aquí, los términos "cáncer asociado a EGFR mutante" y "tumores asociados a EGFR mutantes" están previstos para referirse a células tumorales y neoplasmas los cuales expresan formas mutantes de EGFR. El cáncer asociado con EGFR mutante es un cáncer asociado con EGFR en el cual la transformación celular está mediada por la actividad de tirosina quinasa relacionada con EGFR mutante. Las alteraciones de subunidades del receptor como resultado de los cambios estructurales se pueden acoplar la oligomerización de receptor dando como resultado la amplificación de la señalización. Un EGFR mutante puede ser una forma EGFR mutante activada constitutivamente con eliminación extracelular (Δ EGFR) observada comúnmente en los tumores gliales humanos. 20 Una oncoproteína Δ EGFR comúnmente observada en neoplasmas gliales humanos y otras enfermedades malignas epiteliales humanas (Δ EGFR o EGFRvIII) resulta de un truncamiento en marco que involucra los exones 2 hasta 7 (aminoácidos 6 a 273) en el gen que codifica la región extracelular de la molécula dando como resultado la expresión de Δ EGFRs truncadas, constitutivamente fosforiladas de 140-155kDa. Se ha observado que existen receptores del Δ EGF espontáneamente en una forma dimerica y median la señalización constitutiva y la transformación oncogénica de fibroblastos de roedores de una manera independiente del ligando, mientras que los holo-EGFR P170 sobreexpresados, se transforman, solamente de forma débil en presencia de EGF. 25

Las oncoproteínas del Δ EGFR confieren una ventaja de crecimiento dramático in vivo en células de glioblastoma humano y en fibroblastos murinos. Informes recientes indican que los receptores de Δ EGF están presentes en la superficie celular e internalizan más lentamente que los holo-EGFR estimulados por ligando, que pueden aumentar la eficiencia de la transformación de las oncoproteínas del Δ EGFR. Otras mutaciones que funcionalmente separan el dominio extracelular de la transmembrana y la región citoplásmica de polipéptidos RTK también se han observado que conduce a la dimerización espontánea y a la adquisición de potencial de transformación, sugiriendo que una porción del dominio extracelular impone una restricción estructural en la formación de dímeros que se elimina presumiblemente por enlazamiento a ligando o acción de masas. Las supresiones extracelulares observadas en los 30 Δ EGFR u oncogenes v-erbB aviares presuntamente facilitan la formación de dímeros imitando los cambios conformacionales que resultan de enlazamiento al ligando. Se han observado dominios extracelulares solubles del EGFR que oligomerizan y la alteración estructural en el ectodominio puede inducir oligomerización espontánea de dominios extracelulares, dominios citoplásmicos o ambos. La eliminación extracelular en EGFR elimina la mayoría de los aminoácidos que comprenden los subdominios I y II del EGFR, que incluye una gran porción de la primera (más amino-terminal) de dos secuencias ricas en cisteína en la región extracelular del receptor. El subdominio III, el cual se ha informado que confiere propiedades de enlazamiento de ligando al EGFR, se conserva en la oncoproteína de EGFR, aunque los EGFR no parecen enlazar al ligando en las células NIH3T3. La coexpresión de los holo-EGFR y Δ EGFRs se ha observado en glioblastoma humano y otras muestras de tumores, lo que sugiere que las células que coexpresan Δ EGFR/EGFR pueden ser una estrecha correlación de la enfermedad humana. 35

45 Tal como se usa aquí, el término "especie de EGFR" está previsto para referirse a formas de tipo silvestre y mutantes de EGFR.

Tal como se utiliza aquí, el término "transformación celular mediada por erbB" está previsto para referirse a la transformación celular que sufren las células tumorales y neoplasmas asociados con erbB. Las células sufren transformación mediada por erbB en conexión con los niveles elevados de la actividad de tirosina quinasa por miembros de la familia erbB de receptores. El fenotipo transformado de las células transformadas mediadas por erbB puede ser detenido y/o revertido por expresión de proteínas deficientes en tirosina quinasa que dimerizan con miembros de la familia erbB de receptores. 50

Tal como se utiliza aquí, el término "transformación celular mediada por p185" está previsto para referirse a la transformación celular que somete células tumorales y neoplasmas asociados con p185 y cuyo fenotipo transformado puede ser detenido y/o revertido por la expresión de las proteínas deficientes en tirosina quinasa que dimerizan con p185. La transformación celular mediada por P185 es una transformación celular mediada por erb. 55

Tal como se utiliza aquí, el término "transformación celular mediada por EGFR" está previsto para referirse a la transformación celular que somete células tumorales y neoplasmas asociados con EGFR y cuyo fenotipo transformado puede ser detenido y/o reversado por la expresión de proteínas deficientes en la tirosina quinasa que dimerizan con EGFR. La transformación celular mediada por EGFR es una transformación celular mediada por erb.

5 Tal como se utiliza aquí, el término "transformación celular mediada por EGFR mutante" está previsto para referirse a la transformación celular que somete células tumorales y neoplasmas asociados con EGFR mutante y cuyo fenotipo transformado puede ser detenido y/o reversado por expresión de proteínas deficientes en tirosina quinasa que dimerizan con EGFR mutante. La transformación celular mediada por EGFR mutante es una transformación celular mediada por erb.

10 Tal como se utiliza aquí, el término "individuo de alto riesgo" está previsto para referirse a un individuo que ha tenido un tumor asociado con erbB, tal como por ejemplo un tumor asociado a neu, ya sea eliminado o que entra en remisión y que es por lo tanto susceptible a una recaída o a recurrencia. Como parte de un régimen de tratamiento para un individuo de alto riesgo, el individuo puede ser tratado de forma profiláctica contra tumores que han sido diagnosticados como considerados con el propósito de luchar contra una recurrencia. Así, una vez se sabe que un
15 individuo ha tenido cáncer asociado con erbB, el individuo puede ser tratado de acuerdo con la presente invención para prevenir a las células normales de la transformación en las células tumorales.

La presente invención es útil para tratar terapéuticamente a un individuo identificado que sufre de tumores asociados con erbB, tales tumores asociados con neu, con el fin de reversar el fenotipo transformado de las células tumorales. La presente invención es útil para tratar profilácticamente a un individuo que está predispuesto a desarrollar tumores
20 asociados con erbB o que ha tenido tumores asociados con erbB y por lo tanto es susceptible a una recaída o recurrencia.

El producto de traducción del oncogén neu es p185, una glicoproteína transmembrana que tiene actividad de tirosina quinasa y un peso molecular de aproximadamente 185,000 daltons como se determina llevando a cabo electroforesis en la glicoproteína y comparando su movimiento con proteínas marcadoras de peso molecular conocido. Los experimentos han demostrado que el p185 forma dímeros con otras moléculas p185 o con el receptor
25 del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y que estos dímeros muestran elevada actividad de tirosina quinasa que causa el fenotipo transformado en células que tiene tales dímeros.

Mutantes p185neu interfieren con homodímeros p185neu activados (Qian, O'Rourke, Zhao, Greene: Oncogene 13: 2149-2157, 1996). Los mutantes p185neu también interfieren con homodímeros de EGFR normales, EGFR mutantes así como homodímeros de EGFR activados en fibroblastos y en células de cáncer humanas primarias. La administración de moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas capaces de formar dímeros con otras moléculas de p185 o con EGFR pero cuyos dímeros no muestran actividad elevada de la tirosina quinasa eliminan el fenotipo transformado de tumores asociados con neu en una población que sufre de tumores mediados por p185. Además, la administración de tales moléculas de ácido nucleico inhibe el desarrollo neoplástico en animales
30 susceptibles de desarrollar tumores transformados por neu.

Como se discutió anteriormente, se ha informado sobre interacciones de p185-erbB2 con otros miembros de la familia erbB (Carraway et al., supra; Alroy et al., supra; Riese et al., supra; Tzahar et al., supra; and Surden et al., supra; Pinkas Kramarski et al., supra). De acuerdo con lo anterior, los mutantes deficientes en quinasa de p185neu/erbB2 (homólogo humano) que retienen la capacidad de formar heterodímeros con EGFR, erbB3, y erbB4 se pueden usar para formar dímeros con erbB3 y erbB4, así como EGFR, y modular la señalización en células de tumores humanos. Como se divulga aquí, la administración de moléculas de ácido nucleico las cuales codifican proteínas capaces de formar dímeros con erbB3 y erbB4, pero cuyos dímeros no muestran elevada actividad de
40 tirosina quinasa eliminan el fenotipo transformado de tumores en una población que sufre de tales tumores. Además, la administración de tales moléculas de ácido nucleico inhibe el desarrollo neoplástico en animales susceptibles de desarrollar tumores.

Además de mutantes p 185 para interferir con la transformación celular mediada por erbB, otros miembros erbB mutantes pueden ser útiles para dimerizar con proteínas erbB tipo silvestre e inhibir la actividad elevada de la tirosina quinasa asociada con homodímeros y heterodímeros tipo silvestre.

p185 celular de rata carente de actividad de quinasa debido bien sea a una sustitución de aminoácido individual en la secuencia de consenso para el enlazamiento a ATP, N757, o debido a eliminación del dominio citoplásmico, N691 de detención, fue capaz de someter la heterodimerización inducida por EGF con EGFR en células vivas. El EGF también fue capaz de estimular la transfosforilación de la N757 a través de EGFR. Sin embargo, heterodímeros compuestos de EGFR y ciertas proteínas p185 truncadas fueron inactivos en quinasa. (Véase: Qian et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU., 1994, 91, 1500, que se incorpora aquí como referencia). Se observaron resultados similares utilizando un constructo adicionalmente modificado en el cual la región transmembrana de la proteína p185 truncada contenía un cambio individual en la secuencia de aminoácidos, T691 de detención. Se ha demostrado que las alteraciones estructurales en los receptores actúan como mutaciones dominantes negativas que pueden suprimir la
50
55

función de receptores de tipo silvestre (wt), tales como el receptor de la insulina (Chou et al., J. Biol. Chem., 1987, 262, 1842, que se incorpora aquí como referencia) o EGFR (Honegger et al., J. Cell Biol., 1990, 110, 1541; y Kashles et al., Mol. Cell. Biol., 1991, 11, 1454, cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia).

5 La presente invención provee una estrategia basada en el receptor de inhibición del crecimiento que apunta a los receptores de oncoproteína activados de la familia erbB de tirosina quinasa. Muchos cánceres epiteliales sistémicos expresan formas oncogénicas de receptores de erbB, los cuales pueden conferir potencial tumorigénico bien sea por sobreexpresión, mutación, o coexpresión con otros miembros de la familia erbB. Dado que la función de quinasa enzimática de receptores de erbB se activa tras la dimerización u oligomerización, la actividad catalítica de los receptores basados en superficie se inhibe a través de la formación de complejos receptores defectuosos en quinasa, reduciendo por lo tanto los efectos tumorigénicos del producto de traducción de erbB.

10 Como se describe aquí, la administración de moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas capaces de formar dímeros con productos de traducción de erbB pero cuyos dímeros no muestran actividad elevada de tirosina quinasa eliminan el fenotipo transformado de tumores asociados con erbB en una población que sufre de tumores mediados por erbB. Además, la administración de tales moléculas de ácido nucleico inhibe el desarrollo neoplásico en animales susceptibles de desarrollar tumores asociados con erbB.

15 La aparición de células tumorales de mamífero que expresan un producto de traducción de un miembro de la familia de genes erbB en sus superficies y por lo tanto sufrido transformación celular mediada por erbB puede ser revertida o prevenida mediante la administración de moléculas de ácido nucleico las cuales comprenden secuencias que codifican proteínas que forman dímeros con productos de traducción de genes erbB pero que no tienen actividad de tirosina quinasa.

20 Las composiciones farmacéuticas divulgadas aquí incluyen componentes de suministro que comprenden además portadores o vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como, por ejemplo, solución salina. Un experto en la técnica comprenderá fácilmente la multitud de medios farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en la presente invención.

25 Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas por una persona de experiencia normal en la técnica con composiciones seleccionadas dependiendo del modo de administración escogido. Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, un texto de referencia estándar en este campo, que se incorpora aquí como referencia.

30 Las composiciones farmacéuticas divulgadas aquí pueden ser administradas por cualquier medio que permitan al agente activo alcanzar el sitio de acción del agente en el cuerpo de un mamífero. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar parenteralmente, esto es, intratumoral, intravenosa, subcutánea, intramuscular. Son rutas preferidas la administración intravenosa e intratumoral.

35 La dosificación varía dependiendo de factores conocidos tales como las características farmacodinámicas del agente particular, y su modo y ruta de administración; edad, salud, y peso del receptor; naturaleza y extensión de los síntomas, tipo de tratamiento concurrente, frecuencia del tratamiento, y el efecto deseado.

40 En algunas realizaciones, la invención divulga métodos para tratar pacientes que sufren de adenocarcinomas humanos que son cánceres asociados con erbB tales como adenocarcinomas gástrico, de pulmón y pancreáticos y carcinomas de seno humano y de ovario, así como cáncer de seno humano y de próstata que son cánceres asociados con erbB. En algunas realizaciones, la invención divulga métodos para prevenir estos cánceres asociados con erbB en individuos de alto riesgo. En algunas realizaciones, la invención divulga métodos para tratar pacientes que sufren de la progresión del tumor glial, particularmente en glioblastoma, el tumor glial más maligno. En algunas realizaciones, la invención divulga métodos de prevención de estos cánceres asociados con erbB en individuos de alto riesgo.

45 En algunas realizaciones, la invención divulga métodos para tratar pacientes que sufren de enfermedades malignas epiteliales humanas por leucemia eritroide, fibrosarcoma, angiosarcoma y el melanoma. En algunas realizaciones, la invención divulga métodos para prevenir estos cánceres asociados con erbB en individuos de alto riesgo.

50 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las composiciones farmacéuticas se administran localmente en el sitio del tumor. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran directamente en las células tumorales y el tejido circundante inmediato del tumor. En alguna realización, las composiciones farmacéuticas se suministran en los tumores cerebrales, tales como, por ejemplo, glioblastomas. En alguna realización, las composiciones farmacéuticas se suministran en los tumores cerebrales como parte de la resección quirúrgica del tumor. En alguna realización, las composiciones farmacéuticas se suministran en los tumores cerebrales utilizando técnicas quirúrgicas estereotáxicas.

55 De acuerdo con la invención, el paciente es tratado con radiación en conjunción con la administración de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención. Los tumores son más vulnerables a la destrucción por la

radiación durante la radioterapia cuando el paciente es tratado con composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención. El uso de múltiples metodologías terapéuticas provee al paciente con una intervención de base más amplia. En algunas realizaciones preferidas, el tratamiento con composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención está precedida por una intervención quirúrgica. En realizaciones preferidas, la radioterapia sigue la administración de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención. En realizaciones preferidas, se provee la terapia de radiación utilizando radiación gamma después de la administración de composiciones que convierten los tumores resistentes a la radiación, en sensibles a la radiación. Aquellos expertos en la técnica pueden formular fácilmente un régimen radioterapéutico apropiado. Carlos A Perez & Luther W Brady: Principles and Practice of Radiation Oncology, 2nd Ed. JB Lippincott Co, Phila., 1992, el cual se incorpora aquí como referencia, describe protocolos y parámetros de terapia de radiación que se pueden utilizar en la presente invención. Para los GBM (glioblastoma, el tumor cerebral glial más maligno), Simpson W.J. et al.: Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforms: Results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. Int J Radiat Oncol Biol Phys 26:239-244, 1993, que se incorpora aquí como referencia describe protocolos clínicos útiles en los métodos de la presente invención. De la misma forma, para Borgelt et al., The palliation of brain metastases: Final results of the first two studies of the Radiation Therapy Oncology Group. Int J Radiat Oncol Biol Phys 6:1-9, 1980, que se incorpora aquí como referencia, describe protocolos clínicos útiles en los métodos de la presente invención.

Múltiples cánceres humanos que expresan combinaciones de receptores de erbB pueden ser los objetivos de esta estrategia basada en el receptor de inhibición del crecimiento.

La inhibición mediada por la introducción de receptores de p185neu mutantes provoca la inhibición del crecimiento sinérgico cuando se combina con agentes citotóxicos convencionales, tales como la irradiación gamma. La presente invención provee métodos para tratar muchos tumores sólidos epiteliales ya que los métodos de la invención complementan el uso de modalidades de tratamiento ya establecidos.

Se divulga aquí, el tratamiento de terapia génica anticáncer para tratar la enfermedad residual, local, como un adyuvante terapéutico en combinación con tratamientos preexistentes. El suministro es local en el momento de la cirugía, lo más probable después de la resección de toda enfermedad macroscópica. Para los tumores cerebrales malignos primarios, la terapia génica se da en el momento de la resección del tumor o, en ciertos casos, por implantación estereotáxica, un método preciso y estándar de suministro local o de resección.

La enfermedad residual, local puede ser tratada como se divulga aquí con una estrategia basada en el receptor de inhibición del crecimiento el cual desactiva la señalización a través de oncoproteínas de la familia erbB. Esta estrategia de terapia génica es parte de un régimen de tratamiento combinado para lograr un efecto sinérgico de inhibición del crecimiento mediante mecanismos directos (inhibición de la señalización del receptor) e indirectos (esto es, haciendo las células cancerosas más sensibles al tratamiento concurrente con agentes preexistentes).

Muchos tumores son notables, ya sea para la sobreexpresión y/o por mutación o receptores erbB, incluyendo el EGFR (erbB1), p185neu/erbB2, erbB3, y/o erbB4. En muchos casos, la coexpresión de miembros de la familia erbB da como resultado señalización sinérgica y contribuye a la transformación celular. Tumores notables para sobreexpresión de p185neu/erbB2 incluyen cáncer de seno, de ovario, de pulmón y pancreático. Tumores notables para la sobreexpresión de EGFR incluyen tumores cerebrales gliales primarios y cáncer de próstata. El suministro de genes de formas de p185neu truncadas, esto es, los ADNc o proteínas neu T691 de detención, proveen una estrategia racional para el tratamiento de la enfermedad residual, local en estos cánceres humanos.

La presente invención es particularmente útil para tratar pacientes que tienen tumores cerebrales gliales, esto es, tumores caracterizados por glioblastomas. Tales células expresan una forma mutante de EGFR típicamente asociada con la tumorigenicidad. Se ha descubierto que la presente invención es particularmente útil para el tratamiento de tales pacientes.

A diferencia de células replicantes no transformadas que pueden ser muertas por la exposición a la radiación terapéutica, las células tumorales son resistentes a la inducción de muerte celular por la radiación. Ahora se ha descubierto que mediante la interrupción de los conjuntos multiméricos los cuales producen actividad elevada de quinasa asociada con el fenotipo transformado de una célula tumoral, tal célula tumoral, la cual es ordinariamente resistente a la muerte celular inducida por la radiación, se vuelve sensible a la radiación. De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la presente invención provee métodos para hacer las células tumorales resistentes a la radiación, sensibles a la radiación. La presente invención divulga métodos para tratar un individuo que tiene células tumorales que tienen conjuntos de receptores multiméricos los cuales proveen actividad de quinasa asociada con un fenotipo transformado. El método comprende la etapa de primero administrar al paciente, una composición que altera la actividad de quinasa asociada con el conjunto receptor multimérico. El paciente es tratado entonces con radiación gamma.

Hay varios conjuntos de receptores conocidos los cuales, en las células tumorales, muestran elevada actividad de quinasa que está asociada con el fenotipo transformado. Se sabe que los miembros de la familia erbB de receptores

forman conjuntos multiméricos los cuales dan como resultado elevada actividad de la tirosina quinasa en las células tumorales. Conjuntos multiméricos que involucran a miembros de la familia erbB incluyen homodímeros erbB así como heterodímeros erbB comprenden componentes monoméricos de diferentes miembros de la familia erbB. Conjuntos de receptores multiméricos de receptores de factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGFR) también muestran actividad elevada de quinasa que está asociada con el fenotipo transformado.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la formación de dímeros de las proteínas erbB en células tumorales mediada por erbB se interrumpe para hacer que esas células sean más susceptibles a la destrucción celular utilizando radiación. E acuerdo con lo anterior, se proveen terapias de combinación que comprenden primero administrar a un individuo una composición la cual comprende un agente activo que da como resultado la interferencia de la dimerización de erbB seguido por exponer al paciente a cantidades terapéuticas de radiación. De acuerdo con estos aspectos de la invención, se divulgan métodos para tratar individuos que tienen un tumor mediado por la proteína erbB. Los métodos comprenden las etapas de primero administrar al individuo una composición la cual inhibe la actividad elevada de la tirosina quinasa que resulta de la dimerización de las proteínas erbB en una célula tumoral, seguido de, después de un período de tiempo suficiente para que la composición inhiba la actividad de tirosina quinasa asociada con dimerización de las proteínas erbB de la célula tumoral, exponiendo al individuo a una cantidad terapéuticamente efectiva de radiación anticáncer.

En algunas células tumorales, el producto de traducción de p185 del gen c-erbB2 es sobreexpresado y forma homodímeros y heterodímeros con otros miembros de la familia erbB. Tal dimerización de p 185 sobreexpresado conduce a actividades elevadas de la tirosina quinasa la cual se asocia con el fenotipo transformado. La interrupción de la actividad de la tirosina quinasa, tales como mediante la inhibición de la formación de dímeros entre los componentes monoméricos, da como resultado un efecto citostático sobre las células tumorales. Ahora se ha descubierto que la interrupción también hace sensibles a la radiación, las células tumorales previamente resistentes a la radiación.

Del mismo modo, en algunas células tumorales, una forma mutante de EGFR (Δ EGFR) se expresa que es independiente del ligando. El Δ EGFR forma homodímeros y heterodímeros con el EGFR tipo silvestre y otros miembros de la familia erbB. Tal dimerización del Δ EGFR conduce a actividades elevadas de la tirosina quinasa la cual se asocia con el fenotipo transformado. La interrupción de la actividad de la tirosina quinasa, como mediante la inhibición de la formación de dímeros entre los componentes monoméricos, da como resultado un efecto citostático sobre las células tumorales. Ahora se ha descubierto que la interrupción también hace sensibles a la radiación, las células tumorales previamente resistentes a la radiación.

En algunas realizaciones, el tumor mediado por la proteína erbB es un tumor de cáncer de cerebro. En algunas realizaciones preferidas, el tumor mediado por la proteína erbB es un tumor glial. En algunas realizaciones preferidas, el tumor mediado por la proteína erbB es un glioblastoma. En algunas realizaciones, el tumor mediado por la proteína erbB es un tumor de cáncer de seno. En algunas realizaciones, el tumor mediado por la proteína erbB es un tumor de cáncer de ovario. En algunas realizaciones, el tumor mediado por la proteína erbB es un tumor de cáncer de páncreas.

En algunas realizaciones, la actividad de la quinasa asociada con el conjunto receptor multimérico es interrumpido por la administración al individuo de una composición que comprende un agente activo que interactúa con un componente monomérico del conjunto, y al hacerlo, previene la dimerización alterando físicamente el monómero de tal manera que está menos dispuesto termodinámicamente para formar el conjunto. Tales alteraciones físicas pueden ser, por ejemplo, cambios conformacionales, estéricos, y/o electrostáticos que hacen al monómero en una condición menos favorable para la formación de dímero. Ejemplos de agentes activos que alteran físicamente el monómero son anticuerpos, como se define aquí.

Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" pretende referirse a los anticuerpos, así como fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos de FAb y F(Ab)₂. Los anticuerpos divulgados aquí pueden ser anticuerpos monoclonales o anticuerpos humanizados. Los anticuerpos contra p185 se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 5,677,171 otorgada el 14 de octubre de 1997, y la patente de los Estados Unidos No. 5,705,157 otorgada el 6 de enero de 1998, que se incorpora aquí como referencia, y la cual también describe anticuerpos contra EGFR. La Patente de los Estados Unidos No. 5,470,571 otorgada el 28 de noviembre de 1995, también describe anticuerpos contra EGFR.

En algunas realizaciones, se proveen péptidos que imitan anticuerpos para inhibir la formación de conjunto multimérico y la actividad elevada de la quinasa asociada con tal formación. Por ejemplo, los péptidos están diseñados los cuales tienen secuencias correspondientes a regiones CDR de anticuerpos. Métodos para hacer tales péptidos también se describen en la Serie No. 08/257,783 presentada el 10 de junio de 1994 y la solicitud PCT No. PCT/US95/07157 presentada el 6 de junio de 1995. Los peptidomiméticos de anticuerpos contra p185 se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5,663,144 otorgada el 2 de septiembre 1997.

De acuerdo con algunas realizaciones preferidas, la composición que comprende un agente activo el cual provoca la interrupción de la actividad de la quinasa asociada con el conjunto receptor multimérico es administrado por cualquier ruta de administración que se pueda utilizar para administrar el agente al tumor. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea, parenteral, o administración intratumoral. De acuerdo con algunas realizaciones preferidas, el individuo ha tenido una cirugía para extirpar masa tumoral masiva antes de la administración de la composición.

De acuerdo con aspectos de la presente invención, después de la administración de la composición que comprende un agente activo el cual provoca la interrupción de la actividad de la quinasa asociada con el conjunto receptor multimérico; El individuo es entonces expuesto a una cantidad terapéutica de radiación gamma. La terapia de radiación se puede iniciar en cualquier momento después de que haya transcurrido una cantidad suficiente de tiempo para que el agente activo cause la interrupción de la actividad de la quinasa asociada con el conjunto receptor multimérico. En general, el individuo es expuesto a la radiación en algunos casos 1-10 minutos después, en algunos casos 1-10 horas después, y en algunos casos hasta 24-72 horas después de la administración del agente activo. En algunos casos, la radiación se pen una dosis única mientras que en algunas realizaciones, se administran dosis múltiples durante varias horas, días y/o semanas. El agente activo hace sensibles a la radiación las células tumorales resistentes a la radiación. Así, una vez que el agente activo inhibe la actividad de la quinasa, la exposición a la radiación puede continuar el proceso. La radiación gamma es suministrada de acuerdo con los protocolos radioterapéuticos estándar usando dosificaciones y regímenes estándar. La administración del agente activo hace que la radiación sea más efectiva en la erradicación de las células tumorales.

De acuerdo con aspectos de la presente invención, después de la administración de la composición que comprende un agente activo el cual provoca la interrupción de la actividad de la quinasa asociada con el conjunto receptor multimérico; al individuo se le administra entonces un agente quimioterapéutico citotóxico, además de la exposición a una cantidad terapéutica de radiación gamma. Como en el caso de la terapia de radiación, la quimioterapia puede comenzar en cualquier momento después de que haya transcurrido una cantidad suficiente de tiempo para que el agente activo cause la interrupción de la actividad de la quinasa asociada con el conjunto receptor multimérico. En general, al individuo se le administra el quimioterapéutico en algunos casos 1-10 minutos después, en algunos casos 1-10 horas después, y en algunos casos hasta 24-72 horas después de la administración del agente activo inhibidor de la quinasa. En algunos casos, el quimioterapéutico se provee en una dosis única mientras que en algunas realizaciones, se administran dosis múltiples durante varias horas, días y/o semanas. El agente activo hace que las células tumorales sean más sensibles a los agentes citotóxicos. Así, una vez que el agente activo inhibe la actividad de la quinasa, la administración del quimioterapéutico puede continuar el proceso. Los quimioterapéuticos son suministrados de acuerdo con los protocolos radioterapéuticos estándar utilizando agentes, dosificaciones y regímenes estándar. En algunas realizaciones, el quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste de: cisplatino, doxirubicina, danurrubicina, tamoxifen, taxol y metotrexato. En algunas realizaciones, los tratamientos de quimioterapia y radiación se emplean ambos después de la administración del agente activo. En tales realizaciones, las combinaciones estándar de las dos modalidades terapéuticas se utilizan en conjunción con la administración del agente activo inhibidor de la quinasa.

La presente invención no pretende limitarse por ninguna teoría. La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitantes de ninguna manera.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Construcción de mutantes, vectores de expresión y creación de líneas celulares

Métodos detallados para la construcción de las especies de p185 mutantes, los vectores de expresión y líneas celulares se han descrito previamente ((Qian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994; 91, 1500; y Weiner et al., Oncogene, 1989, 4; 1175, cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia).

Construcción de mutante N757

El mutante Nneu K757M de enlazamiento a ATP (N757) fue derivado a partir de pSV2TneuK757M (Weiner et al., Oncogene, 1989, 4, 1175, el cual se incorpora aquí como referencia) mediante técnicas de subclonación. Este constructo fue preparado por mutagénesis dirigida al sitio para sustituir un Met por Lys⁷⁵⁷. Un experto en la técnica entenderá fácilmente la preparación de tal mutante mediante mutagénesis dirigida al sitio. Brevemente, un fragmento de Xba1 de pSV2neuT que corresponde a una banda de 1.2 kb que abarca el sitio de unión a ATP probable de la secuencia de nucleótidos publicada se clonó en M13mp18 y se transfectó en cepa de E. coli CJ236 (dot, ung) pUC13 de tal manera que el sitio HindIII del polienlazador cayó en el extremo 5' de las secuencias insertadas. La mutagénesis se realizó como se describe utilizando un cebador en el cual el codón AAG, que codifica para Lys, fue reemplazado por el codón AUG correspondiente a Met (Bargmann et al., Nature 1986, 319, 226, que se incorpora aquí como referencia). Las mutaciones puntuales así creadas se verificaron mediante secuenciación de ADN. El plásmido que porta la nueva mutación se escindió con Xba1 que liberó el fragmento original. Este fragmento se aisló mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica y se ligó de nuevo en pSV2-neu para regenerar

el vector de expresión oncogénica p185neu excepto que el vector contenía la sustitución de Met para Lys en la posición del aminoácido 757 (clon M757).

Construcción de mutante N691 de detención

5 El mutante N691 de detención de eliminación del aminoácido 591 en terminal carboxi fue derivado de pSV2Nneu (Bargmann et al., Nature, 1986, 319, 226, que se incorpora aquí como referencia) por sustitución de un codón de detención para el codón normal Thr⁶⁹¹ a través de mutagénesis dirigida al sitio.

Construcción de Ndx

10 El mutante Ndx de eliminación del aminoácido 541 de terminal carboxi fue derivado de ADNc de c-neu mediante la eliminación de un fragmento de XbaI y la inserción de un codón de detención para el codón normal en la posición 741 a través de mutagénesis dirigida al sitio.

Construcción de vectores de expresión

15 Para vectores de expresión, fragmentos que contienen ADNc de dihidrofolato reductasa de ratón (DHFR) de pSV2DHFR y el gen bacteriano resistente a la neomicina fosfotransferasa (neo^r) de pSV2NEO (Southern et al., J. Mol. Appl. Genet., 1982, 1, 327, que es incorporada aquí como referencia) se subclonaron en pSV2Nneu de tal manera que se generó un vector combinado de ADNc de DHFR, neo^r, y Nneu de 14.8 kb. Los fragmentos wt o neu mutado se aislaron y ligaron de nuevo en un vector de expresión pSV2neo^r/dhfr/Nneu. Todos estos ADNc estaban bajo control del promotor previo de virus de simio 40 (SV40). Una unidad génica que codifica el gen bacteriano de resistencia a la higromicina (Hyg^r) bajo el control del promotor de la timidina quinasa del virus simplex de herpes fue aislado a partir de pHyg y sustituido por un fragmento del gen neo^r en pEGFR1 (Gorman et al., J. Cell. Biochem., 20 1988., 12A, Suppl., C219, que se incorpora aquí como referencia) para generar otro vector de expresión combinada, pEGFR/Hyg^r. El ADNc de EGFR humano estaba bajo el control del promotor SR α , un elemento eficiente de control transcripcional que contiene el promotor temprano de SV40 y el segmento R-U5 de repetición terminal larga del virus tipo 1 de leucemia de células T humanas 1 (Takebe et al., Mol. Cell. Biol., 1988, 8, 466, que se incorpora aquí como referencia).

25 Transfecciones y mantenimiento de líneas celulares

30 El constructo pEGFR/Hyg^r se transfectó primero en células NR6 (Pruss et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1977, 74, 3918, que se incorpora aquí como referencia) mediante precipitación con fosfato de calcio. Después de 3 semanas de selección de higromicina (35 μ g/ml), la expresión de EGFR de las colonias resultantes se identificó por inmunotransferencia anti-EGFR. Las células que expresaban EGFR se clonaron adicionalmente por dilución limitante antes de la segunda ronda de transfección con vectores de expresión de ADNc neu. Las células que expresan EGFR, nombradas NE91, junto con las células NR6, fueron transfectadas con pSV2neo^r/dhfr/neu que codifican wt o proteínas neu mutantes y seleccionadas con G418. Los clones que expresan Neu en células NR6 y células NE91 fueron seleccionados mediante un ensayo de citometría de flujo con tinción 7.16.4 de anticuerpo monoclonal anti-neu (Drebin et al., Cell, 1.985, 41, 695, que se incorpora aquí como referencia) y fueron nombrados 35 NR6 Neu y NE Neu, respectivamente. Estos clones transfectados sencillos (que expresan Neu solamente) o dobles (que expresan Neu y EGFR) que contenían DHFR se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal al 5%, G418 (0.3 mg/ml), e higromicina (15 μ g/ml). La amplificación Neu se logró mediante dosificaciones incrementadas por etapas (0.3-1.0 μ M) de metotrexato durante unos meses con el fin de elevar el nivel de la expresión del receptor.

40 Citometría de flujo

45 Las células se retiraron de las placas de cultivo de tejido con EDTA regulada (Versene, MA Bioproducts) y se lavaron dos veces en medio FACS (solución salina equilibrada de Hanks (Gibco) suplementada con suero fetal de ternera al 2%, azida de sodio al 0.2%, y HEPES 10 mM). 1 x 10⁶ células se incubaron en 0.1 ml de medio FACS con anticuerpo monoclonal anti-neu 7.16.4 (Drebin et al., Cell, 1985, 41, 695, que se incorpora aquí como referencia) o anticuerpo control irrelevante comparado con isotipo durante 1 hora a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con 2.5 ml de medio FACS. La pella celular se resuspendió y las células se incubaron con 0.1 ml de IgG anti-ratón de conejo de cabra conjugado con FITC (reactivo con cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo, Tago) diluido 1:50 en medio FACS, durante 1 hora a 4 °C. Las células se lavaron dos veces y se analizaron en un Becton Dickenson FACS IV.

Ejemplo 2: Actividad de la tirosina quinasa

50 Purificación de membrana

Las células se sometieron a lisis mediante una combinación de congelación-descongelación instantánea y homogeneización Dounce como se describe en Gaulton et al., J. Immunol., 1986, 7, 2470, que se incorpora aquí como referencia. La fracción nuclear se eliminó por centrifugación a 2000 x g durante 5 minutos. La fracción

sobrenadante de 2000 x g fue entonces centrifugada a 25000 x g durante 30 minutos a 4 °C, y el sobrenadante de 25000 x g se retuvo como la fracción de citosol. La pella se redisolvió en 1.5 ml de regulador de membrana (NaCl 40 mM, EDTA 0.1 mM, HEPES 20 mM (pH 6.8), PMSF 2 mM, y pirofosfato de Na 5 mM) luego, en capas sobre una solución de sacarosa (20% -37%) en regulador de membrana y se centrifugó a 22000 rpm durante 18 horas a 2 °C mediante el uso de un rotor Beckman SW50.1. La interfaz rica en membrana se eliminó en 1 ml de volumen total, se diluyó con 10 ml de regulador de membrana, y se recentrifugó a 40000 rpm durante 60 minutos usando un rotor SW40.1 exactamente como se describe en Zick et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 119, 6, que se incorpora aquí como referencia. La pella resultante que contenía fragmentos de membrana purificada, se redisolvió en 100 µl de regulador de quinasa (véase más adelante) por 10⁷ células originales. Las proteínas de membrana se cuantificaron utilizando un kit de ensayo de proteínas BioRad y se almacenaron a -80 ° C hasta el ensayo.

Actividad de tirosina quinasa en las membranas

Se determinaron las concentraciones de membrana mediante el método de Bradford como se describe en Gaulton et al., *J. Immunol.*, 1986, 7, 2.470, que se incorpora aquí como referencia. Las diluciones de membranas se incubaron por cuadruplicado en presencia o ausencia de polipéptido sintético que contenía tirosina como un indicador específico de la fosforilación de tirosina. El regulador de reacción de quinasa, (50 µl de 0.1 M Hepes pH 7.3, MgCl₂ 10 mM, MnCl₂ 5 mM, Na₃VO₄ 50 mM se incubaron en presencia de ATP (1 µCi de gamma [³²P]ATP; Amersham) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de EDTA 5 mM (concentración final) seguido inmediatamente por inmunoprecipitación TCA sobre filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/a). Los filtros se lavaron extensivamente con TCA, seguido por éter, secados al aire, insertados en un cóctel de centelleo (Biofluor) y las emisiones beta determinadas. Los pozos por cuadruplicado ensayados en ausencia de sustrato que contenía tirosina se sustrajeron de los pozos que contenían sustrato de tirosina.

Las proteínas de membrana se incubaron con el polímero aleatorio de ácido glutámico-tirosina (41) poli glu: tyr, PGT) como sustrato para la fosforilación de la tirosina como se describe en Zick et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 119, 6, que se incorpora aquí como referencia. Brevemente, las proteínas de membrana se incubaron en 50 µl de HEPES 10 mM pH 7.2, que contenía MgCl₂ 10 mM, Na₃VO₄ 100 mM, y (10 pCi) [³²P]ATP 150 µM durante 15 minutos a temperatura ambiente en presencia (específica) o ausencia (fondo) de sustrato poli glu:tyr en 2.5 mg/ml. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de EDTA hasta 50 mM de concentración final y ATP en exceso frío de y las muestras fueron cargadas sobre papel de filtro de fibra de vidrio Whatman. Los filtros se lavaron 3 veces con TCA al 10% enfriado con hielo que contenía pirofosfato 10 mM y ATP 1 mM, seguido por una vez con acetato. Las muestras entonces se secaron y se contaron en BioFlur (NEN). Para la inmunoprecipitación de proteínas de membrana que contenían fosfotirosina, se incubaron 50 µg de membranas purificadas en regulador de quinasa como se describió anteriormente durante 15 minutos. Después de la marcación, las muestras se solubilizaron en regulador de Lisis suplementado con EDTA 5 mM, prealcaradas e inmunoprecipitadas con 2 µl de ascitis de MA-2G8A6 + proteína A agarosa. El anticuerpo MA-2G8 específicamente precipita polipéptidos marcados con fosfotirosina como se describe en Daniel et al., *Pruc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1985, 82, 2084, que se incorpora aquí como referencia.

Ejemplo 3: dimerización con p185 o EGFR

Se detectaron heterodímeros EGFR y p185 por inmunoprecipitación de anticuerpos antirreceptor específicos e inmunotransferencia después de tratamiento de EGF y de entrecruzamiento químico. La asociación física de EGFR y proteínas p185 deficiente en quinasa fueron examinados de esta manera.

Ensayo de entrecruzamiento químico

Las células se cultivaron durante la noche en placas de Petri de 10 cm, se incubaron con o sin EGF (Gibco/BRL) a 37 °C durante 10-15 minutos, y se lavaron dos veces con solución salina fría regulada de fosfato (PBS). Se agregaron tres ml de PBS que contenía bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS³) 2 mM o 3,3'-ditiobis (sulfosuccinimidilpropionato) (DTSSP) (Pierce) y se incubaron a 18 °C durante 30 minutos con agitación ocasional de las placas. Después detener la mezcla de reacción de entrecruzamiento con regulador que contenía Tris-HCl 10 mM, NaCl al 0,9%, y glicina 0.1 M, las células se lavaron dos veces con PBS frío y se solubilizaron con regulador PI/RIPA (Wada et al., *Cell*, 1.990, 61, 1339, que se incorpora aquí como referencia).

Marcación e inmunoprecipitación

Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma a menos que se indique otra cosa. Para la marcación con [³²P] se sembraron 1 x 10⁶ células y se cultivaron durante 24 horas y luego se incubaron con [³²P] inorgánico (Amersham) a 0.5 mCi/ml en 5% de FCS/RPMI libre de fosfato durante 6 horas. Después de la marcación las células fueron lavadas con solución salina regulada con fosfato frío que contenía EDTA 400 µM, fluoruro de sodio 10 mM, pirofosfato de sodio 10 mM y ortovanadato de sodio 400 µM y se sometieron a lisis en regulador de lisis (NP40 al 1%, desoxicolato al 0.1%, SDS al 0.1%, NaCl 0.15 M, fosfato de sodio 0.01 M pH 7.4, Trasylyol al 1%, PMSF 1 mM, EDTA 2 mM, fluoruro de sodio 10 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, Na₃VO₄ 400 µM, yodoacetoamida 10 mM y ATP

10 mM y) durante 30 minutos. Los sobrenadantes preacclarados se sometieron a inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal 7.16.4, o antisueros de conejo que reconoce proteínas neu humanos y de rata DBW-2 (Kokai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1988, 84 8498, que es incorporada aquí como referencia). Los inmunoprecipitados se hirvieron en regulador de muestra de Laemmli y se analizaron en 8% de SDS-PAGE (Laemmli, Nature, 1970, 227, 680, que se incorpora aquí como referencia). Los geles secos se expusieron a una película preempañada a -70 °C. Los seguimientos del densitómetro de los geles se realizaron en un densitómetro de barrido Hoefer GS300. Las densidades relativas se determinaron mediante experimentos de corte de lado a lado de los picos barridos relevantes y pesándolos en una balanza analítica. La incorporación del p185neu oncogénico y proto oncogénico se comparó directamente.

10 Ensayos de formación de foco y tumorigenicidad

Las células (10⁴) se sembraron en placas de Petri y se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 2%. El medio se cambió cada 3-4 días. Después de 3 semanas en cultivo, las células se fijaron con formalina al 10% y se tiñeron con hematoxilina para observar focos transformados morfológicamente. Para analizar el crecimiento del tumor en ratones lampiños atímicos, las células (10⁶) de cada línea se suspendieron en 0.1 ml de PBS y se inyectaron por vía intradérmica en la mitad del dorso de ratones lampiños NCR. PBS solo se inyectó también como control. El crecimiento tumoral se monitorizó cada 4-5 días hasta 10-12 semanas.

Resultados

NE91 es una línea celular transfectada que expresa el EGFR en células NR6 (Pruss et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1977, 74, 3918, que se incorpora aquí como referencia), una línea celular de fibroblastos de ratón carente de EGFR endógeno. p185 celular (Nneu) tipo silvestre (WT) o Neu deficiente de quinasa (i esto es, detención de N757 y N691, portando una mutación puntual K757M en el sitio de enlazamiento a ATP y eliminación del dominio citoplásmico, respectivamente) se expresaron tanto en las células NR6 como en NE91. Los clones resultantes transfectados fueron nombrados NR6 Neu o NE Neu, respectivamente.

Proteínas neu mutantes deficientes en quinasa suprimieron la función EGFR en la transformación celular y abolieron la sinergia de transformación con EGFR

Se ha demostrado previamente que la coexpresión de niveles incrementados de EGFR y p185 celular, pero ninguna por separado, transformó las células de fibroblastos murínicos por completo como se demuestra con la línea celular M1 (Kokai et al., Cell, 1989, 58, 287, que es incorporada aquí como referencia). En el presente estudio, se analizaron los fenotipos transformados de estas células transfectadas que expresan WT o proteínas Neu deficientes en quinasa en la presencia o ausencia de EGF.

Las células NE91 que expresan solo EGFR formó una monocapa en ausencia de EGF y focos en presencia de EGF. La transformación incompleta observado, (esto es, de una manera dependiente de EGF), está de acuerdo con informes anteriores (DiFiore et al, Cell, 1 987, 51, 1063; Dobashi et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU., 1991, 88, 8582, cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia). Sin embargo, de una manera similar a las células M1, la coexpresión de p185 celular WT y EGFR en células NE NneuB2 dio como resultado la transformación completa, esto es, la formación de focos fue independiente de EGF. Las líneas celulares que coexpresan EGFR ya sea con forma de Neu deficiente de quinasa (células NE N757 y NE N691 de detención) no formaron focos incluso en la presencia de EGF. Se observaron resultados similares cuando se ensayó el crecimiento de colonias independiente del anclaje en agar blando.

El crecimiento del tumor en ratones lampiños se utilizó como criterio para la transformación completa *in vivo*. Células B104-1-1 que expresan p185 oncogénicos se utilizaron como un control positivo y tumores causados por aquellas células aparecieron rápidamente (con una latencia de 5 días). No crecieron tumores en las líneas celulares que expresan niveles equivalentes de EGFR (NE91) o p185 celulares solas (NR6 Nneu). Sin embargo, la inyección de las células que coexpresan tanto EGFR como p185 celular (M1 y NE NneuB2) causó tumores (2-3 semanas de latencia). Los resultados fueron consistentes con un informe anterior (Kokai et al., Cell, 1.989, 58, 287, que se incorpora aquí como referencia).

Sin embargo, no se observaron tumores (> 10 semanas) después de la inyección de las líneas celulares que expresan Neu solas deficiente de quinasa o coexpresada con EGFR. Estos datos sugirieron que se requirió la función normal de actividad de quinasa EGFR y p185 celulares fue para la transformación sinérgica y la formación de tumores. La coexpresión de proteínas Neu deficientes en quinasa con EGFR no sólo abolió este tipo de sinergia, sino que también suprimió el potencial de transformación dependiente de EGF de EGFR. Por lo tanto, la función del receptor de EGF mediada por la estimulación del ligando se analizó adicionalmente en los siguientes estudios.

La subregulación del receptor inducida por EGF fue menos eficiente en las células mutantes deficientes en neu quinasa

A continuación se examinó si la subregulación del receptor normal fue afectada por la coexpresión con Neu deficientes en quinasa. Las células se incubaron con EGF durante diversos tiempos antes de la tinción de la superficie celular con anti-neu mAb 7.16.4 o anti-EGFR mAb 425 seguido por la tinción con IgG anti-ratón conjugado con FITC. La expresión en la superficie celular de cualquier receptor se analizó mediante análisis de citometría de flujo. La expresión de la superficie celular de EGFR en células NE91 se redujo después de 15 minutos de tratamiento con EGF y más del 60% de los receptores desapareció de la superficie celular después de 1 hora de tratamiento. La eficiencia de la subregulación de EGFR en las células M1 (que coexpresan Neu WT y EGFR) fue similar a la observada en células NE91. Aproximadamente el 20% de p185 celular se cosubreguló junto con EGFR en las células M1. Se observaron resultados similares en las células NE Nneu B2. Sin embargo, las líneas celulares que expresan p185 celulares solamente no responden a EGF. En líneas celulares en las que EGFR fue coexpresado con proteínas Neu mutantes deficientes en quinasa la subregulación de EGFR fue menos eficiente (la máxima reducción fue aproximadamente 20-25%). Además, la expresión de superficie de cualquiera de las proteínas Neu mutantes no se alteró significativamente en estas células tras tratamiento con EGF.

Vida media incrementada del receptor observada en las células coexpresadas de neu mutante deficientes en quinasa

Para determinar si los receptores que fueron subregulados de la superficie celular se sometieron a la degradación, se llevó a cabo el etiquetado de pulso y persecución de las proteínas del receptor como se describe en materiales y métodos, y se analizaron proteínas Neu y EGFR inmunoprecipitadas por SDS-PAGE. El tratamiento con EGF causó una rápida degradación de EGFR en células NE91 (que expresan EGFR). Se observó una tasa de degradación de EGFR similar en las células M1 tras tratamiento con EGF. Sin embargo, la degradación de EGFR inducida por EGF se vio disminuida en las células que coexpresan EGFR, ya sea con forma de mutante Neu deficiente en quinasa (NE N757 o N691 NE de detención).

También se investigaron los patrones de degradación de proteínas WT o Neu mutantes en respuesta al tratamiento con EGF. Los p185 celulares marcados WT en ambas células M1 y las células NE NneuB2 desaparecieron proporcionalmente al tiempo que se trataron con EGF, indicando que p185 celular WT es codegradado eficientemente con EGFR. Sólo fue una ligera reducción de los niveles de proteína N757 y ningún cambio perceptible en la abundancia de la proteína de N691 de detención truncada después del tratamiento con EGF hasta de 6 horas. La vida media normal sugerida de c-erbB2 humano en células epiteliales mamarias es 11-13 horas (Kornilova et al., *Oncogene*, 1992, 7, 511, que se incorpora aquí como referencia). El análisis densitométrico de nuestros autorradiogramas confirmó que la vida media de p185 celular WT se redujo a 3-4 horas después del tratamiento con EGF, mientras que los niveles de Neu mutantes no cambiaron significativamente durante el transcurso de tiempo examinado.

Afinidad de enlazamiento a EGF en las células expresadas de proteína wt o neu mutante

Nuestros experimentos han demostrado que los mutantes Neu deficientes en quinasa suprimen las funciones de EGFR, tales como la actividad de la quinasa (Qian et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1994, 91, 1500, que se incorpora aquí como referencia), la transformación mediada por EGF, la subregulación y degradación del receptor. Dado que estos efectos podrían interpretarse, en parte, por las afinidades alteradas de enlazamiento a EGF, se analizaron parámetros de enlazamiento a [¹²⁵I]-EGF mediante análisis de Scatchard.

Las constantes de disociación media (Kd) de enlazamiento a [¹²⁵I]-EGF a estas líneas celulares se determinaron a partir de tres experimentos individuales. El EGFR en células NE91 muestra dos componentes de enlazamiento que representan afinidades de enlazamiento altas (7.5×10^{-11} M) y bajas (4.4×10^{-9} M), y la fracción de receptores de alta afinidad fue el 5.4% de los receptores totales. La coexpresión de EGFR con Neu WT en células NE NneuB2 dio como resultado a un ligero incremento en las afinidades de enlazamiento a EGF (3.2×10^{-11} M) y (2.0×10^{-9} M) para ambas subclases de alta y baja afinidad, respectivamente, y la fracción de receptores de alta afinidad fue de 5.7%. Las afinidades incrementadas para las células M1 fueron reproducibles y los valores de Kd (1.3×10^{-11} M y 1.8×10^{-9} M) estaban de acuerdo con nuestros informes anteriores, Kokai et al, *Cell*, 1989, 58, 287.; y Wada et al., *Cell*, 1990, 61, 1339, cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia). Sin embargo, el EGFR en células que coexpresan Neu deficiente en quinasa desplegó predominantemente enlazamientos a EGF de baja afinidad, 4.9×10^{-9} M y 5.2×10^{-9} M en células NE N691 y N757 NE, respectivamente, a pesar de que algunas veces fue detectable una rara subclase de alta afinidad de EGFR, esto es, 7.2×10^{-11} M (0.5%) en las células de detención NE N691 y 6.6×10^{-11} M ($\leq 1\%$) en las células NE N757. Estas especies raras pueden representar un conjunto de homodímeros de EGFR todavía observados cuando se coexpresan con proteínas Neu inactivas en quinasa (Qian et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1994, 91, 1500, que se incorpora aquí como referencia). A partir del análisis Scatchard es claro que EGFR en las células que coexpresan quinasa Neu WT activa despliegan el porcentaje normal de receptores de EGF de alta afinidad, con una ligera afinidad incrementada para EGF cuando se compara con células NE91. Sin embargo, la coexpresión de la proteína Neu deficiente en quinasa redujo en gran medida las afinidades de enlazamiento a EGF en correlación con las actividades de quinasa heterodiméricas reducidas.

Discusión

En los estudios actuales, las funciones del receptor y los fenotipos de células han sido analizados mediante el uso de líneas celulares transfectadas de forma estable que coexpresan EGFR con proteínas WT o Neu mutantes. A diferencia de Neu WT, la Neu deficiente en quinasa no cooperó con el EGFR para mediar la transformación celular; además, se han demostrado aspectos novedosos de las funciones del receptor negativas dominantes que resultan de la interacción de Neu mutante con EGFR.

La asociación intermolecular y la activación de la tirosina quinasa resultante entre EGFR y WT (Qian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1992, 89, 1330, que se incorpora aquí como referencia) o proteínas Neu mutantes (Qian et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU., 1994, 91, 1500, que se incorpora aquí como referencia) ha sido bien caracterizada: nuestros estudios mostraron que la heterodimerización de EGFR y productos de c-neu se pueden detectar incluso en ausencia de EGF, y son favorecidas por cualquiera de las formas de homodimerización. Sin embargo, la homodimerización y la codimerización de EGFR WT y EGFR suprimido del dominio citoplásmico fueron igualmente eficientes y dependientes de EGF (Kashles et al., Mol. Cell Biol., 1991, 11, 1454, que se incorpora aquí como referencia). El predominio de heterodímeros puede ayudar a explicar los fenotipos de células resultantes, y el efecto negativo dominante inducible de Neu deficiente en quinasa o la supresión de la función de EGFR, que se produjo de manera significativa, incluso cuando hay una relación 1:1 de EGFR y proteínas Neu mutantes.

La interacción del receptor con la activación resultante de la tirosina quinasa se produce por un mecanismo intermolecular y, frecuentemente es seguido por eventos de transforilación rápida como se ha observado en pp60^{src} (Cooper et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1988, 85, 4232, que se incorpora aquí como referencia), el receptor de insulina (Boni-Schnetzler et al., J. Biol. Chem., 1988, 263, 6822, que se incorpora aquí como referencia) y EGFR (Honegger et al., Mol. Cell. Biol., 1990, 10, 4035, que se incorpora aquí como referencia). La transfosforilación también se produce entre las especies heterorreceptoras, EGFR y Neu/c-erbB2 (Connelly et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 1990, 87, 6054; Spivak-Kroizman et al, J. Biol Chem., 1992, 267, 8056; y Qian et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU., 1994, 91, 1.500.; cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia). La heterodimerización preferencial del EGFR y del receptor de Neu (Qian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1994, 91, 1500, que se incorpora aquí como referencia) pueden facilitar la transfosforilación de N757 por EGFR. Actualmente, los sustratos específicos para la quinasa de EGFR y de Neu no han sido bien caracterizados. Ensayos de enlazamiento in vitro mostraron que la N757 deficiente en quinasa fosforilada todavía fue capaz de asociarse con la proteína que contiene SH2 recombinante tras el tratamiento con EGF. Sin embargo, a diferencia de heterodímeros activos en las células M1 y NE NneuB2, la pérdida de actividad de la quinasa Neu del heterodímero mutante de las células NE N757 puede prohibir la fosforilación de ciertos sustratos celulares. Adicionalmente, la transfosforilación predominante de N757 por EGFR y la ocupación de los sustratos celulares en N757 no funcional pueden competir con EGFR para moléculas de señalización celular que conducen a reducciones cualitativas y cuantitativas en la función de EGFR. Por lo tanto, el heterodímero defectuoso no puede transmitir señales tan eficazmente como el heterodímero activo de quinasa y el homodímero de EGFR, deteriorando así la señalización sinérgica que conduce a la transformación celular observada en las células M1 y NE NneuB2 e inhibiendo la función de EGFR. Estudios de heterodimerización de EGFR con N691 de detención suprimido del dominio citoplásmico mostraron que la forma heterodímera estuvo inactiva debido a la falta de interacción proteína-proteína entre los dominios citoplásmicos, lo que indica que Neu/c-erbB2 no es simplemente un sustrato para EGFR, sino que es así mismo un *trans* activador para EGFR de la misma forma (Qian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1994, 91, 1500, que se incorpora aquí como referencia). Así, las cantidades reducidas de forma homodímero de EGFR normal y la preponderancia de heterodímeros no productivos dieron como resultado la supresión de la función de EGFR normal y el fenotipo dominante negativo resultante. La observación es comparable con los efectos de los dímeros formados entre EGFR WT y EGFR suprimido del dominio citoplásmico (Kashles et al., Mol. Cell. Biol., 1991, 11, 1454, que se incorpora aquí como referencia).

Se ha informado que los receptores activos de quinasa están dirigidos a los lisosomas para la degradación tras el enlazamiento al ligando (Chen et al, Cell, 1.989, 59, 33;.. Felder et al, Cell, 1990, 61, 623, que se incorpora aquí como referencia). Estudios previos que utilizan receptores de insulina deficientes en quinasa (McClain et al, J. Biol Chem, 1987, 262, 14663, y Russell et al, J. Biol Chem, 1987, 262, 11833; cada uno de las cuales es incorporada aquí como referencia) y EGFR (Honegger et al., Cell, 1.987, 51, 199, que se incorpora aquí como referencia) sugirieron que los dominios de la quinasa activa son esenciales para el enrutamiento del receptor inducido por ligando normal. Se utilizaron líneas de células tratadas con EGF para estudiar cómo las actividades de los complejos de quinasa del receptor se correlacionan con la endocitosis y la destrucción del receptor. Nuestro trabajo demuestra que el EGFR es células coexpresadas Neu WT (M1 o NE NneuB2) experimenta una rápida subregulación y degradación tras estimulación con EGF. Este proceso fue significativamente retardado en las células mutantes en comparación con las células NE91 que expresan EGFR solo. Solamente los p185 celular WT, pero no la proteína Neu mutante deficiente en quinasa, fue cosubregulada y codegradada con EGFR. Del mismo modo, el tratamiento con EGF de las células HC11 de línea celular mamarias humanas afectó la expresión de superficie de la proteína c-erbB2 y la producción de proteína: un incremento de 3-4 veces en la proteína lisosomal c-erbB2 y la vida media de las proteínas c-erbB2 se redujo de 11 horas (sin tratar) a 3.5 horas (tratado con EGF) (Kornilova et al., Oncogene, 1.992, 7, 511, que se incorpora aquí como referencia). Junto con nuestra observación, estos resultados sugieren que Neu/c-erbB2 WT, (pero no Neu deficiente en quinasa), se asocia con EGFR y un complejo de receptor de tirosina quinasa activa y se somete al enrutamiento de receptor normal.

En conclusión, nuestros resultados proveen evidencia experimental de que los heterodímeros defectuosos o inactivos de EGFR y proteínas Neu deficientes en quinasa deterioran la señalización del receptor hetero sinérgico, suprimen la función de EGFR normal y abolen el fenotipo transformado en células vivas. Nuestro modelo experimental sugiere una relación causal entre las actividades de quinasas heterodiméricas y malignidad celular las cuales pueden tener implicaciones clínicas. Un informe reciente ha demostrado que un ectodominio truncado de la proteína c-erbB2 producido por el procesamiento del ARN alternativo en células de carcinoma humano que sobreexpresan el receptor de p185^{c-erbB2} da como resultado la resistencia a los efectos que inhiben el crecimiento del anticuerpo monoclonal anti-c-erbB2 (Scott et al., Mol. Cell. Biol., 1993, 13, 2247, que se incorpora aquí como referencia). Se especula que la transferencia directa de genes de los ADNc de NEu deficientes en quinasa en líneas de células tumorales con cosobreexpresión de EGFR y Neu/c-erbB2 puede aliviar el fenotipo maligno, a medida que las proteínas Neu mutantes pueden suprimir la función de cualquiera de los receptores normales EGFR o c-erbB2 por interacciones homo- o hetero-receptoras.

Ejemplo 4: inhibición de una oncoproteína EGFR de origen natural por el ectodominio p185neu: implicaciones para contribuciones del subdominio al ensamblaje receptor.

15 Introducción

La activación del receptor de la familia erbB involucra tanto la formación de ensamblaje del homodímero y heterodímero. En muchos casos, la formación de heterodímeros entre miembros de la familia erbB incrementa la afinidad de enlazamiento a ligando y da como resultado la formación de un complejo de señalización más activo que influye en el fenotipo celular. Utilizando los mutantes del receptor p185neu y EGF, el ectodominio solo de estos receptores erbB ha demostrado ser suficiente para permitir una asociación física heteromérica termodinámicamente preferida y que los contactos citoplásmicos en el dímero resultante afectan la afinidad, señalización y fenotipo del ligando. El análisis bioquímico de p185neu y EGFR sugiere que las consecuencias de la formación de dímeros entre los dominios solos extracelulares son diferentes de la señalización resultante de la formación de dímero de endodominio. Los mutantes derivados del ectodominio p185neu son capaces de inhibición trans específica de la señalización del receptor de EGF tanto en fibroblastos murinos y células humanas que sobreexpresan EGFR transformadas principalmente. El complejo del receptor activo para el Factor de diferenciación de Neu (NDF/herregulina) parece ser o bien un erbB2-erbB3 o un heterodímero-erbB2 erbB4, lo que sugiere que p18neu/erbB2 funciona, en parte, como un regulador *trans* de otras quinasas del receptor de la familia erbB.

Para examinar adicionalmente los subdominios de los receptores responsables de las interacciones reguladoras trans mediadas por el dominio extracelular en la familia erbB, se analizó la interacción entre el EGFR y p185neu/c-erbB2 en células transformadas. Una oncoproteína EGFR comúnmente observada en neoplasmas gliales humanos y otras enfermedades malignas humanas epiteliales (Δ EGFR o EGFRvIII) resultan de un truncamiento en marco que involucra los exones 2 hasta 7 (aminoácidos 6 a 273) en el gen que codifica la región extracelular de la molécula resultante en la expresión de los Δ EGFR truncados, constitutivamente fosforilados de 140-155kDa. Se ha observado que existen receptores Δ EGF espontáneamente en una forma dimerica y median la señalización constitutiva y la transformación oncogénica de fibroblastos de roedores de una manera independiente del ligando, mientras que los holo-EGFR p170 sobreexpresados están solamente transformándose débilmente en presencia de EGF. Las Oncoproteínas Δ EGFR confieren una ventaja de crecimiento dramático in vivo en células de glioblastoma humano y en fibroblastos murinos.

Informes recientes indican que los receptores Δ EGF están presentes en la superficie celular e internalizan más lentamente que los holo-EGFR estimulados por ligando, que pueden incrementar la eficiencia de transformación de oncoproteínas Δ EGFR. También se han observado otras mutaciones que funcionalmente separan el dominio extracelular de la transmembrana y la región citoplásmica de polipéptidos RTK que conducen a la dimerización espontánea y a la adquisición de potencial de transformación, lo que sugiere que una porción del dominio extracelular impone una limitación estructural en la formación de dímeros que se elimina presumiblemente por enlazamiento a ligando o acción de masas. Las eliminaciones extracelulares observadas en los Δ EGFR u oncogenes v-erbB aviares presuntamente facilitan la formación de dímeros imitando los cambios conformacionales que resultan de enlazamiento de ligando. Se han observado dominios extracelulares solubles del EGFR para oligomerizar y la alteración estructural en el ectodominio puede inducir oligomerización espontánea de dominios extracelulares, dominios citoplásmicos o ambos.

La eliminación extracelular en Δ EGFR elimina la mayoría de los aminoácidos que comprenden los subdominios I y II del EGFR, que incluye una gran porción de la primera (más amino-terminal) de dos secuencias ricas en cisteína en la región extracelular del receptor. El subdominio III, el cual ha sido informado por conferir propiedades de enlazamiento a ligando al EGFR, es preservado en la oncoproteína Δ EGFR, aunque los Δ EGFR no parecen unirse al ligando en las células NIH3T3. La coexpresión de los holo-EGFR y los Δ EGFR se ha observado en glioblastoma humano y otras muestras de tumores, lo que sugiere que las células que coexpresan EGFR/ Δ EGFR puede ser una estrecha correlación de la enfermedad humana.

Un mutante de eliminación de terminal carboxilo, derivado de ectodominio del oncógeno p185neu (neu T691 de detención), que carecen del dominio de quinasa completo y sitios de autofosforilación de terminal carboxilo, se expresó en células de glioblastoma humano que coexpresan EGFR y Δ EGFRs de longitud completa para examinar si el ectodominio p185neu podía asociarse con Δ EGFRs truncadas, con eliminación de ectodominio de Δ EGFRs y modular la señalización mediada por Δ EGFR.

Resultados

Expresión de formas mutantes de EGFR y p185neu en células de glioblastoma humano

Células de glioblastoma humano U87MG expresan niveles elevados (10^5 receptores/célula) de endógeno, EGFR de tipo salvaje. Tres derivados clonales de células de glioblastoma humano U87MG progenitoras se utilizaron para estos estudios: las células U87/T691-1 contienen neu T691 de detención en el fondo de U87MG; las células U87MG. Δ EGFR expresan niveles elevados (10^6 receptores/célula) de las proteínas EGFR humanas en células U87MG progenitoras; y las células U87MG. Δ EGFR/T691s doblemente transfectadas contienen proteínas endógenas EGFR, Δ EGFRs, y neu mutante de T691 de detención. Se compararon los niveles de expresión de las proteínas EGFR y neu truncadas en células de glioblastoma humano derivadas de U87MG después de marcado metabólico. Los subclones derivados de células de glioblastoma humano notables para la expresión de Δ EGFR y/o receptores mutantes de neu T691 de detención se marcaron con 35 S-cisteína durante 15 horas y los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-EGFR mAb 528 reactivos tanto con ectodominios de EGFR como de Δ EGFR o anti-neu mAb 7.16.4 que reconocen el ectodominio p185neu. Los complejos inmunes se resolvieron y se separaron por 8% SDS-PAGE. Se observaron señales de proteínas que representan proteína EGFR (170kDa), Δ EGFRs (140-155kDa) y neu truncadas T691 de detención (115kDa). Las células U87MG expresan solamente EGFR endógeno de longitud completa; las células U87/T691-1 expresan proteínas endógenas EGFR y neu T691 de detención; las células U87MG. Δ EGFR expresan EGFR endógeno y Δ EGFRs transfectados; y las células U87MG. Δ EGFR/T691s expresan proteínas EGFR, Δ EGFRs y neu T691 de detención. Se observaron todas las señales después de autorradiografía (exposición de 24 h). Inmunoprecipitación con el reactivo mAb 528 (Oncogene Science) con EGFR y Δ EGFR demostrado todas las formas de EGFR expresadas en las líneas celulares derivadas de U87MG. Los EGFR fueron identificados en células U87MG. Δ EGFR y U87MG. Δ EGFR/T691s solamente. El marcado metabólico y la inmunoprecipitación con reactivo mAb 7.16.4 con el ectodominio p185neu permitió la identificación de los receptores neu mutantes de T691 de detención de 115kDa en células U87/T691-1 y en células U87MG. Δ EGFR/T691s. El análisis por citometría de flujo de subclones de U87/T691-1 y de U87MG. Δ EGFR/T691s con mAb 7.16.4 confirmó la localización en superficie de proteínas Neu T691 de detención. El análisis por citometría de flujo también confirmó la localización en superficie celular de Δ EGFRs tanto subclones de U87MG. Δ EGFR como de U87MG. Δ EGFR/T691s. Las células de glioblastoma U87MG contienen niveles insignificantes de erbB-2 o erbB-3.

La inmunoprecipitación e inmunotransferencia de los EGFR en células U87MG. Δ EGFR revelaron la presencia de EGFR endógeno (170kDa) y Δ EGFRs transfectados ejecutándose como una especie de doblete de Mr140kDa y 155kDa. Lisados de células U87MG. Δ EGFR se inmunoprecipitaron ya sea con reactivo mAb Δ 124 con Δ EGFR solamente o reactivo mAb 528 con el dominio extracelular de tanto de EGFR como de Δ EGFR. Cantidades iguales de proteína, como se determina por el kit de ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories), se inmunoprecipitaron y los inmunocomplejos se separaron por SDS/8% PAGE en condiciones reductoras. Los EGFR inmunoprecipitados se detectaron por inmunotransferencia con Ab-4, un anticuerpo policlonal contra EGFR humano. El anticuerpo Δ 124 precipitó dos especies de Δ EGFRs de 140 a 155 kDa. El mAb 528 precipitó EGFR endógeno (Mr = 170kDa), así como Δ EGFRs (140-155 kDa). Las dos especies de Δ EGFRs en las células U87MG. Δ EGFR se resolvieron más claramente por el mAb Δ 124. Todas las señales de proteínas se visualizaron por el sistema de quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Amersham). La densitometría de barrido de los receptores de Δ EGFR inmunoprecipitados por mAb Δ 124 reveló que la relación de formas de Δ EGFR de 155kDa a 140kDa fue de 2.3 en células U87MG. Δ EGFR. Adicionalmente, el análisis densitométrico de inmunocomplejos de mAb 528 mostró que la relación de Δ EGFRs/EGFR en las células U87MG. Δ EGFR fue de aproximadamente 10:1. Este patrón también se demostró por transfectantes dobles de U87MG. Δ EGFR/T691s. La densitometría de barrido se utilizó para confirmar una relación estequiométrica de Δ EGFR: EGFR de 10:1 por inmunoprecipitación de los lisados celulares utilizando reactivos mAb 528 con los dominios extracelulares de EGFR y Δ EGFR, seguido por inmunotransferencia con un antisuero policlonal reactivo con EGFR tanto en células U87MG. Δ EGFR como en células U87MG. Δ EGFR/T691s.

El ectodominio neu T691 de detención se demostró para formar eficientemente heterodímeros con longitud completa, EGFR de tipo silvestre en la superficie de las células U87MG progenitoras y en fibroblastos de roedores, utilizando el DTSSP de entrecruzamiento impermeable de membrana (3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato). El ectodominio de p185neu inhibió la subregulación inducida por EGF de EGFR endógeno en células derivadas de U87MG como se determinó por inmunotransferencia. El análisis citométrico de flujo indicó que la asociación del receptor que ocurren en la superficie celular media la inhibición de EGFR, en lugar de la endocitosis y la degradación. En particular, se llevaron a cabo experimentos que muestran la asociación entre EGFR endógeno y receptores neu truncados *in vivo* y la inhibición de la submodulación inducida por EGF de EGFR en células de glioma que expresan receptores neu T691 de detención. Las células U87MG progenitoras y las células U87/T691-1 (células U87MG que expresan neu T691) se precipitaron con mAb 528 anti-EGFR (Oncogene Science) o mAb

7.16.4 anti-neu después de entrecruzamiento con DTSSP (3,3'-ditiobis (sulfosuccinimidilpropionato) (2 mM) (Pierce) con o sin tratamiento de EGF (100 ng/ml a 37°C durante 10-15 minutos). Los inmunocomplejos se analizaron por SDS/8% PAGE bajo condiciones reductoras. El EGFR (Mr= 170kDa) se detectó por inmunotransferencia con Ab-4 (Oncogene Science), un anticuerpo policlonal contra EGFR humano. Se detectaron proteínas EGFR coprecipitadas en las células U87/ T691-1 inmunoprecipitadas con mAb 7.16.4 anti-neu. El tratamiento de EGF dio como resultado submodulación más eficiente de EGFR en células U87MG que en las células U87/T691-1. Estos datos están de acuerdo con estudios previos realizados en fibroblastos de roedores. El ectodominio neu T691 de detención inhibe la fosforilación inducida por EGF de EGFR endógeno de tipo silvestre en células derivadas de U87MG. El ΔEGFR es constitutivamente fosforilado en células U87MG.ΔEGFR, mientras que EGFR p170 es fosforilado en células progenitoras U87MG y en células U87MG.EGFR solamente tras la adición de EGF. Blot con un anticuerpo antifosfotirosina reveló que las especies inferiores peso molecular (p140) de ΔEGFR es subfosforilada con relación a la especie p155 en Células U87MG.EGFR solamente tras la adición de EGF. La transferencia con un anticuerpo antifosfotirosina reveló que las especies de bajo peso molecular (p140) de ΔEGFR es subfosforilada en relación con la especie p155 en células U87MG.ΔEGFR. La activación dependiente de ligando de los EGFR en células de glioblastoma humano derivadas de U87MG se determinó como sigue. Se determinó el contenido de fosfotirosina de inmunocomplejos anti-EGFR en las células U87MG, las células U87/T691-1 (contiene EGFR de longitud completa endógeno y neu mutante T691 de detención), y en las células U87MG.ΔEGFR (contiene EGFR y ΔEGFR endógeno). Se sembraron igual número de células y se dejaron sin nutrición en medio libre de suero durante 24 horas después de la unión a placas de 10 cm. Las células se trataron ± EGF (100 ng/ml a 37 °C durante 10-15 minutos), se lavaron dos veces con PBS frío y se solubilizaron con regulador de PI/RIPA. Los lisados de concentraciones iguales de proteína como se determinó mediante el ensayo de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories) se inmunoprecipitaron con mAb 528 anti-EGFR y los inmunocomplejos se analizaron por SDS/8% PAGE bajo condiciones reductoras. Se detectaron los EGFR fosforilados en las células U87MG y U87MG.ΔEGFR progenitoras, pero no en las células U87/T691-1. La fosforilación de EGFR de longitud completa endógena (170kDa) fue dependiente de EGF en las células U87MG y en las células U87MG.ΔEGFR. Sin embargo, la fosforilación de los ΔEGFR no fue dependiente de tratamiento con EGF en células U87MG.ΔEGFR. La transferencia fue separada y probada nuevamente con el anticuerpo anti-EGFR policlonal, Ab-4. La presencia de todos los EGFR se confirmó en los tipos de células tratadas como anteriormente. Las proteínas EGFR aparecen como un doblete de 140-155kDa, con las especies de mayor peso molecular fosforiladas más significativamente. Todas las señales de proteínas se visualizaron por el sistema de quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Amersham).

Modulación del crecimiento celular mediado por ΔEGFR y transformación por el mutante neu T691 de detención

La eficiencia de la proliferación celular y la transformación de las líneas celulares de glioblastoma humano derivadas de U87MG se establecieron *in vitro* e *in vivo* con el fin de determinar la modulación de la señalización del receptor ΔEGF por proteínas mutantes p185neu derivadas de ectodominio. La inhibición del crecimiento celular en condiciones de suero completo o reducido se estudió en los siguientes experimentos. 2×10^4 células de cada línea celular se sembraron en placas de 6 pozos y se dejaron unir en medios de crecimiento completo. Al día siguiente, las células se mantuvieron, ya sea en medios de crecimiento completo (FBS al 10%) o se cambió a suero de FBS al 2%. Se dejó que las células crecieran durante cuatro días y luego se trataron con tripsina y se contaron. Las células U87MG progenitoras fueron utilizadas para la normalización (relación de crecimiento= 1.0 para todos los experimentos). El crecimiento de todas las líneas celulares derivadas se expresó como una fracción de la línea celular progenitora para la comparación. Las células U87MG.ΔEGFR expresan EGFR y ΔEGFRs endógenos, las células U87MG.ΔEGFR/T691s expresan EGFR, ΔEGFR y las células neu T691 de detención, y las células U87/T691-1 expresan proteínas endógenas EGFR y neu T691 de detención. La expresión de ΔEGFR (células U87MG.ΔEGFR) incrementó la proliferación celular en condiciones reducidas de suero sobre las células U87MG progenitoras, lo cual es consistente con la activación independiente del ligando de los ΔGFR. La expresión de proteínas neu mutante T691 de detención inhibió el crecimiento celular en suero reducida y, de forma notable, en medios de crecimiento completo en ambas células de glioblastoma que coexpresan EGFR/ΔEGFR y en células U87MG progenitoras que contienen solamente EGFR endógeno. De mencionar, los subclones de U87MG.ΔEGFR/T691s mostraron proliferación celular disminuida que las células U87MG progenitoras que carecen de EGFR tanto en medios de crecimiento completo y, en mayor grado, en condiciones reducidas de suero.

El ΔEGFR no incrementó la eficiencia de transformación *in vitro* en ensayos de crecimiento independiente del anclaje sobre células U87MG progenitoras. El crecimiento independiente del anclaje se estudió en los siguientes experimentos. Se sembraron 1000-3000 células de cada línea celular en placas de agar blando y se cultivaron durante 21-28 días. Las colonias fueron entonces visualizadas, y contadas después de la tinción. Las células U87MG son células primarias humanas transformadas que contienen múltiples alteraciones genéticas somáticas, que incluyen eliminaciones de p16 y en el gen de la proteína tirosina fosfatasa putativa, *P TEN*. El crecimiento en agar blando de las células U87MG.ΔEGFR/T691s se redujo 41.3% y 45% en comparación con las células U87MG y U87MG.ΔEGFR progenitoras, respectivamente. La inhibición del crecimiento independiente del anclaje logrado por las proteínas neu T691 de detención fue más significativo en las células U87MG progenitoras que carecen de ΔEGFR (media 75.2% de inhibición con respecto a células U87MG progenitoras en tres experimentos independientes).

El receptor de Δ EGF confiere una ventaja de crecimiento selectiva in vivo en el fondo de la célula U87MG, mientras que muchos estudios han demostrado que los holo-EGFR no se transforman *in vivo*, excepto bajo condiciones definidas en la que los receptores de p185neu son coexpresados. Se ha demostrado que la expresión del ectodominio neu mutante T691 de detención en las células U87MG inhibe preferencialmente el fenotipo oncogénico de U87MG cuando se compara con una forma de p185neu truncada (N691 de detención) que difiere de T691 de detención por que contiene la región transmembrana protooncogénica. Una comparación del crecimiento tumoral en ratones atímicos entre las líneas de células derivadas de U87MG se hizo como sigue. 10^6 células de cada línea celular se inyectaron por vía intradérmica en el día 0 y el volumen del tumor se registró 1-2 x/semana. Las células U87MG se inyectaron en un lado y la línea de células transfectadas se inyectó en el lado contralateral del animal. La expresión de la proteína neu T691 de detención abrogó la ventaja selectiva de crecimiento in vivo mediada por Δ EGFR en las células U87MG. Este resultado fue confirmado por un análisis de tres subclones U87MG. Δ EGFR/T691s adicionales. El subclón U87MG. Δ EGFR/T691s exhibió cinética de crecimiento que son similares a las células U87MG progenitoras, aunque parecían ser más inhibidas que las células U87MG in vivo. La inhibición observada in vivo para todos los subclones de U87MG. Δ EGFR/T691s estaba directamente relacionada con la estequiometría de la expresión de neu mutante T691 de detención.

El mutante neu T691 de detención forma heterodímeros con Δ EGFR in vivo

Debido a la complejidad genética de transfectantes de U87MG. Δ EGFR y subclones doblemente transfectados de U87MG. Δ EGFR/T691s, y los complejos múltiples homodiméricos y heterodiméricos que migran a pesos moleculares similares en el análisis de SDS-PAGE de gradiente, el DTSSP de entrecruzamiento impermeable a la membrana tioescindible fue empleado para examinar los componentes individuales de los complejos heteroméricos putativos localizado en la superficie. El mAb 528 se utilizó para inmunoprecipitar todos los EGFR (de tipo silvestre y Δ EGFRs) que podrían formar heterómeros con proteínas neu mutantes. Los monómeros Δ EGFR coprecipitados de inmunocomplejos anti-neu fueron eliminados por los experimentos de entrecruzamiento in vivo utilizando DTSSP. El entrecruzamiento de las células U87MG. Δ EGFR/T691s y separación de inmunocomplejos por SDS/6-8% PAGE bajo condiciones de reducción revelaron evidencia de formación de heterodímero entre proteínas neu T691 de detención y las formas p140 Δ EGFR, p155 Δ EGFR, y p170EGFR. La mayoría de los receptores mutantes neu T691 de detención se asocia con la forma p140 Δ EGFR usando estos métodos, aunque se observaron repetidamente las bandas débiles que identifican las proteínas heterodimerizadas p155 Δ EGFR y p170EGFR. La identificación de proteínas Δ EGFR en la superficie celular de los transfectantes dobles U87MG. Δ EGFR y U87MG. Δ EGFR/T691s mediante citometría de flujo apoya las observaciones hechas con el entrecruzamiento impermeable de la membrana. Los receptores de mutantes neu T691 de detención forman heterodímeros con los receptores de Δ EGF en la superficie celular. Los experimentos para detectar los Δ EGFR coprecipitados de inmunocomplejos anti-neu por entrecruzamiento in vivo se realizaron como sigue. Se inmunoprecipitaron 1 mg de lisados de células progenitoras U87MG (líneas 1, 2), células U87MG.EGFR, y células U87MG.EGFR/T691s con mAb 528 anti-EGFR o mAb 7.16.4 anti-neu después de entrecruzamiento con DTSSP (3,3'-ditiobis (sulfosuccinimidilpropionato) (2 mM) (Pierce) después del tratamiento con EGF (37°C durante 15 min). Los inmunocomplejos se analizaron por SDS/8% PAGE bajo condiciones reductoras y la membrana de nailon se transfirió con Ab-4, un anticuerpo policlonal contra EGFR humano. Los EGFR fueron identificados en las células U87MG (EGFR endógeno solamente, Mr=170kDa); células U87MG. Δ EGFR (EGFR y Δ EGFRs endógenos, Mr=140-155kDa), y células U87MG. Δ EGFR/T691s (EGFR y Δ EGFRs endógenos, Mr 140-155kDa). Se detectaron proteínas EGFR coprecipitadas en células U87MG. Δ EGFR/T691s inmunoprecipitadas con mAb 7.16.4 anti-neu. En las células U87MG. Δ EGFR/T691s, se encontró neu T691 de detención para coprecipitar con la forma de menor peso molecular de Δ EGFR (140kDa, señal más fuerte), la forma de migración más lenta de Δ EGFR (p155) y holo-EGFR endógeno (p170). El tratamiento con EGF dio como resultado una mejor visualización de monómeros inmunocomplejados pero los EGFR coprecipitados podrían ser identificados en inmunocomplejos anti-neu de líneas celulares derivadas de U87MG sin tratamiento con EGF.

El contenido de fosfotirosina de los EGFR inmunoprecipitados en las células U87MG. Δ EGFR/T691 se determinó utilizando la transferencia descrita anteriormente. La transferencia fue separada y probada nuevamente con el anticuerpo antifosfotirosina, mAb PY-20 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.). Las proteínas EGFR detectados en inmunocomplejos de anti-neu tenían contenido de fosfotirosina insignificante después del tratamiento con EGF en células U87MG. Δ EGFR células/T691s en comparación con inmunocomplejos anti-EGFR en células progenitoras U87MG, y en células U87MG. Δ EGFR y U87MG. Δ EGFR/T691s. El contenido de fosfotirosina de inmunocomplejos anti-EGFR en células U87MG. Δ EGFR y células U87MG.EGFR/T691s no fue apreciablemente diferente a estas concentraciones de lisado de proteínas.

La transferencia con un anticuerpo antifosfotirosina confirmó que ambas especies de Δ EGFR asociadas con neu T691 de detención son subfosforiladas. El contenido despreciable de fosfotirosina para monómeros de EGFR inmunocomplejado para receptores neu T691 de detención se demostró consistentemente en todos los experimentos. Se ha observado que el EGF incrementa la eficiencia de la formación de heterodímeros entre p170EGFR y el ectodominio neu, aunque esta asociación es independiente del ligando. El EGF incrementó mínimamente la formación de inmunocomplejos de ectodominio de EGFR-p185neu, lo que sugiere que el EGF puede estabilizar la formación heteromérica, si no la formación EGFR homodimérica.

Reducción del contenido de fosfotirosina de monómeros de EGFR in vivo por coexpresión de neu T691 de detención

El contenido de fosfotirosina para monómeros de Δ EGFR inmunocomplejados para receptores neu T691 de detención fue insignificante en todos los experimentos. Los resultados también revelaron que la forma de menor peso molecular de Δ EGFR (140kDa) fue relativamente subfosforilada en comparación con la forma p155 Δ EGFR tanto en las células U87MG. Δ EGFR como en U87MG. Δ EGFR/T691s transfectantes dobles.

Las diferencias en el contenido de fosfotirosina de monómeros Δ EGFR entre las células U87MG. Δ EGFR y las células U87MG. Δ EGFR/T691s no se observaron en inmunoprecipitaciones de lisados de células de mayor tamaño utilizando mAb 528, el cual reacciona con todas las formas de EGFR, para experimentos de entrecruzamiento in vivo. Por lo tanto, con el fin de examinar específicamente el contenido de fosfotirosina in vivo de Δ EGFRs en las células que expresan neu T691 de detención, se utilizó solamente un anticuerpo reactivo con el Δ EGFR para precipitar Δ EGFRs a partir de lisados celulares que contenían concentraciones reducidas de proteína de las requeridas para detectar complejos heterodiméricos. El contenido de fosfotirosina de Δ EGFRs in vivo en las células U87MG. Δ EGFR con o sin coexpresión de neu mutante T691 de detención se determinó como sigue. Los lisados (200 μ g) de las células y las células U87MG. Δ EGFR U87MG. Δ EGFR/T691s se inmunoprecipitaron con reactivo mAb Δ 124 con Δ EGFR solamente y transferido, ya sea con mAb PY-20 anti-fosfotirosina o con el anticuerpo policlonal Ab-4 anti-EGFR. La transferencia con PY-20 después de inmunoprecipitación con reactivo mAb Δ 124 con Δ EGFR solamente reveló varias fosfoproteínas en las células U87MG. Δ EGFR y U87MG. Δ EGFR/T691s. La forma de migración más lenta de Δ EGFR (155kDa) se detectó mientras que la forma de migración más rápida de Δ EGFR (140kDa) no fue detectado por el anticuerpo PY-20, lo que indica relativamente menor contenido de fosfotirosina que p155kDa. Después de separar la membrana y volverla a probar con Ab-4 reactivo con todos los EGFR, se visualizaron ambas formas Δ EGFR tanto en transfectantes dobles de U87MG. Δ EGFR como de U87MG. Δ EGFR/T691s. El análisis densitométrico de barrido del contenido de fosforilación de monómeros p155 Δ EGFR inmunoprecipitados en estas líneas celulares reveló una disminución de 33.7% en las células U87MG. Δ EGFR/T691s cuando se compara con células U87MG. Δ EGFR, bajo condiciones de crecimiento completo. Diferencias constitutivas observadas en contenido de fosfotirosina de Δ EGFR no podrían, por tanto, ser superadas por factores que contienen suero. La relación de pTyr/ Δ EGFRs en las células U87MG. Δ EGFR fue 1.57; se encontró que esta relación en las células U87MG. Δ EGFR/T691s era 1.04, según lo determinado por densitometría de barrido. Esta diferencia se observó en dos experimentos adicionales.

El contenido de fosfotirosina en las células vivas del total de monómeros de Δ EGFR inmunoprecipitados, no solamente los monómeros de Δ EGFR inmunocomplejaron las proteínas neu T691 de detención. Además de la constatación de que los Δ EGFR inmunocomplejaron a los receptores mutantes neu T691 de detención tienen un contenido de fosfotirosina despreciable, estos datos indican que la expresión de superficie de neu T691 de detención sola es suficiente para reducir el contenido de fosfotirosina monomérica de Δ EGFR en trans. En las células que contienen neu T691 de detención, la reducción observada de 33.7% en el contenido de fosfotirosina de monómeros de Δ EGFR inmunoprecipitados pueden disminuir la señalización del complejo del receptor Δ EGF activado, ya que el complejo de señalización puede ser un multímero de orden superior y se ha informado que el Δ EGFR tiene una estequiometría inferior de contenido de fosfotirosina que el EGFR de tipo silvestre estimulado por EGF. El enlazamiento al sustrato y/o la actividad catalítica de la quinasa del receptor Δ EGFR podría ser alterado por una reducción del monómero contenido de fosfotirosina Δ EGFR monomérica. El nivel inferior de contenido de fosfotirosina constitutiva de Δ EGFR en relación con el EGFR de tipo silvestre estimulado por ligando puede explicar el efecto incapacitante en comportamiento de crecimiento in vivo de mutaciones puntuales individuales en los sitios de autofosforilación terminales de Δ EGFR. Los hetero-oligómeros formados por la asociación entre dímeros y dímeros Δ EGFR y dímeros neu T691 de detención puede ser un mecanismo para la reducción del contenido de fosfotirosina de Δ EGFR y la inhibición fenotípica resultante de la expresión de neu T691 de detención y localización en la superficie.

Reducción de la actividad de quinasa in vitro de Δ EGFR por expresión de neu T691 de detención

Puesto que se observó una reducción del contenido de fosfotirosina Δ EGFR monomérica en células que expresan receptores mutantes neu T691 de detención, se investigó si la actividad catalítica de la quinasa receptora EGFR podría ser alterada por la expresión de proteínas neu T691 de detención. Utilizando condiciones idénticas a las que confirmaron la presencia de Δ EGFRs en heterodímeros entrecruzados asociados con neu T691 de detención, se realizaron experimentos que estudian la reducción de la actividad de quinasa de EGFR in vitro por expresión de neu T691 de detención. Se obtuvieron 200 μ g de lisados de células U87MG. Δ EGFR y U87MG. Δ EGFR/T691s con y sin pretratamiento con el entrecruzamiento impermeable a la membrana de DTSSP (2 mM). Complejos inmunes Anti-EGFR (mAb Δ 124) de estas células se suspendieron en 50 μ l de regulador de reacción de quinasa que contenía 0.2 mCi [32 P]- γ -ATP a temperatura ambiente durante 30 min. Las muestras de proteína se separaron por 10% SDS-PAGE y se analizaron por autorradiografía. Se muestran complejos inmunes anti-EGFR o tienen actividad de quinasa in vitro incrementada en las células U87MG. Δ EGFR pretratadas con un entrecruzable impermeable a la membrana (DTSSP), pero no en las células doblemente transfectadas que expresan receptores mutantes neu T691 de detención. La expresión de neu T691 de detención dio como resultado una inhibición notable de la transfosforilación de la forma de migración más lenta (155kDa) de Δ EGFR, debido a la formación de heterodímero

confirmado mediante el uso de DTSSP). Estos resultados fueron confirmados en tres ocasiones independientes. Dado que el Δ EGFR de 155kDa está en mayor abundancia tanto en las células U87MG. Δ EGFR como en las células U87MG. Δ EGFR/T691s, la reducción mediada por neu T691 de detención de la actividad catalítica de la quinasa receptora Δ EGF puede explicar la inhibición fenotípica observada en células de glioblastoma humano doblemente transfectadas. No se observaron diferencias significativas en la fosforilación de la forma p140 Δ EGFR en estos experimentos *in vitro*; sin embargo, ya que esta especie se fosforiló *in vitro*, una fracción puede ser fosforilada *in vivo*. La inhibición de la actividad catalítica del receptor de Δ EGF se observó consistentemente por la trans-fosforilación del receptor. En las concentraciones más bajas de proteína utilizadas en los experimentos de quinasa *in vitro*, se produjo la fosforilación mínima del sustrato exógeno de Histona III en todos los complejos inmunes anti-EGFR.

La inhibición fenotípica de la señalización de Δ EGFR mediada por receptores mutantes neu T691 de detención en células de glioblastoma humano parece así ser el resultado de: (1) la formación de heterodímeros entre las proteínas neu T691 de detención y ambas formas de Δ EGFR, aunque se observó formación de heterodímero incrementada con p140 Δ EGFR; (2) la trans-inhibición del contenido de fosfotirosina monomérica de 155 Δ EGFR *in vivo* por la expresión de neu T691; y (3) la inhibición de la trans-fosforilación de la quinasa p155 Δ EGFR como consecuencia de la expresión de neu T691 de detención y la formación de heterodímeros.

Discusión

Células U87MG en las que los receptores Δ EGF constitutivamente activos se coexpresan con EGFR endógeno representan una aproximación cercana de un subconjunto particularmente agresivo de glioblastomas humanos, aquellos tumores en los que se produce la eliminación de p16, la pérdida alélica en el cromosoma 10q, y la activación de EGFR, mientras que p53 es no mutado. Células de glioblastoma humanas derivadas de U87MG que expresan EGFR endógeno, cantidades elevadas de oncoproteínas Δ EGFR, y receptores mutantes neu T691 de detención deficientes en quinasa (subclones doblemente transfectados de U87MG. Δ EGFR/T691s) fueron inhibidas en todos los ensayos *in vitro* e *in vivo* más que las células progenitoras U87MG. Esto representó una reducción significativa en el fenotipo observado con la expresión de oncoproteínas Δ EGFR solas en el fondo de U87MG (células U87MG. Δ EGFR), particularmente *in vivo*. Dado que la sobreexpresión de EGFR de tipo silvestre sola es no oncogénica *in vivo*, la formación observada de heterodímeros ectodominio Δ GFR-neu, y la relación de proteínas Δ EGFR:EGFR en estas células, parece que la inhibición del crecimiento observada conferida por neu T691 de detención y exhibida por las células U87MG. Δ EGFR/ T691s estaba mediada por la desactivación de señalización a través de receptores Δ EGF lugar de P170 EGFR endógenos.

Es posible que los receptores mutantes de neu T691 de detención deshabiliten un complejo heterodimérico de Δ EGFR-EGFR, aunque la relación estequiométrica de Δ EGFR: EGFR sea de aproximadamente 10:1 en las células U87MG. Δ EGFR y en células U87MG.EGFR/T691s. A diferencia del EGFR endógeno tipo silvestre, la formación de dímero del receptor Δ EGF y la autofosforilación en las células de glioma tiene lugar independientemente de ligando y de las células NIH3T3 que expresan Δ EGFR presentan un crecimiento independiente del ligando y propiedades de transformación, lo que sugiere que la señalización oncogénica resulta de dímeros Δ EGFR constitutivamente fosforilados. Otros no han identificado heterodímeros EGFR- Δ EGFR en células U87MG. Δ EGFR. Adicionalmente, la fosforilación de tirosina de mutantes deficientes en quinasa de Δ EGFR expresado en células U87MG no se pueden restaurar mediante la activación de EGFR tipo silvestre con el tratamiento ligando, lo que sugiere una carencia de trans-fosforilación sustancial entre EGFR y Δ GFRs. Teniendo en cuenta la preferencia termodinámica de proteínas p185neu/erbB2 para heterodimerizar con EGFR y otros receptores erbB, los Δ EGFRs pueden formar dímeros con las proteínas derivadas de ectodominio p185neu más fácilmente que con holo-EGFR.

T691 de detención inhibe la fosforilación de p170EGFR en células U87MG y monómeros EGFR y Δ EGFR inmunocomplejan a las proteínas neu T691 de detención tener un contenido de fosfotirosina insignificante. La demostración de la asociación entre T691 de detención y Δ EGFR no indica necesariamente una asociación preferencial sobre EGFR p170 porque Δ EGFR y EGFR no se expresan en niveles comparables en estas células. El análisis citométrico de flujo de todos los EGFR en subclones que expresan U87MG. Δ EGFR y U87MG. Δ EGFR/T691s indicó que la expresión del ectodominio p185neu no alteró el EGFR total, el EGFR de tipo salvaje, o poblaciones de la superficie celular Δ EGFR, ya sea en células U87MG que contienen EGFR endógeno solamente o en transfectantes U87MG. Δ EGFR que contienen EGFR y Δ EGFR. Esto es consistente con la observación de que ectodominios p185neu desactivan la señalización EGFR a través de la formación de ensamblajes de receptores heteroméricos u oligoméricos defectuosos localizados en la superficie celular, en lugar de mediante la inducción de la internalización y submodulación del receptor Δ EGF.

La autofosforilación de residuos de tirosina en los receptores de EGF activa sitios de enlazamiento para las moléculas de señalización y también puede regular la actividad catalítica del receptor de EGF. El contenido de fosfotirosina constitutiva de monómeros de Δ EGFR *in vivo* y la actividad de la quinasa de Δ EGFR *in vitro* se reduce *in trans* como consecuencia de la expresión de neu T691 de detención. La inhibición fenotípica observada *in vitro* e *in vivo* en células U87MG que coexpresan Δ EGFRs y proteínas neu T691 de detención (células U87MG. Δ EGFR/T691s) con relación a Δ EGFRs solos (células U87MG. Δ EGFR) podría ser debido en parte sitios de

enlazamiento reducidos en EGFR para las moléculas de señalización como resultado de la formación de heterodímeros con neu T691 de detención. Adicionalmente, la actividad de la quinasa para la *trans*-fosforilación del receptor ΔEGF u otro sustrato(s) puede también ser reducida por un cambio conformacional inducido por la asociación con el receptor mutante de neu T691 de detención. Los datos apoyan el argumento de que una

5 disminución de la actividad de la quinasa para *trans*-fosforilación del receptor contribuye a una reducción en la transformación. La actividad de la quinasa in vitro para un sustrato de Histona exógeno se observó por ser mucho más baja que para la *trans*-fosforilación del receptor y no fue apreciablemente alterada por la expresión de neu T691 de detención. La actividad de la quinasa in vitro de ΔEGFR para sustrato exógeno solamente se altera mínimamente por sustituciones de los sitios de autofosforilación del terminal carboxilo; la reducción del contenido de fosfotirosina

10 in vivo como consecuencia de mutaciones puntuales terminales carboxilo en ΔEGFR aparecieron para correlacionar de manera más fiable con la inhibición fenotípica. El nivel de inhibición alcanzado in vivo por el mutante neu T691 de detención expresado en células U87MG.ΔEGFR fue similar al exhibido por un punto mutante del sitio de enlazamiento a ATP en ΔEGFR o por un mutante ΔEGFR con sustitución de tirosinas 1068, 1148, y 1173.

Los estudios que utilizan mutantes p185neu trans-dominantes han indicado que los ectodominios de p185neu y EGFR son suficientes para la asociación física, y que la señalización de EGFR puede ser modulada con estos mutantes de p185neu negativos en quinasa. Las interacciones del receptor en el dominio citoplásmico determinan la señalización productiva para ambos receptores de p185neu y de EGF. En ausencia de datos cristalográficos sobre las regiones extracelulares de p185neu y EGFR, las características estructurales de las interacciones de

15 ectodominio entre estos receptores no están definidas. Se ha observado que receptores de ΔEGF existen en una forma dimerizada en ausencia de ligando. Se han observado que regiones extracelulares solubles del EGFR oligomerizan en respuesta a EGF después del entrecruzamiento, aunque fragmentos proteolíticos derivados de subdominio III solos no oligomerizan, lo que sugiere que otros subdominios contribuyen a la formación de dímero. Se ha informado que el subdominio III confiere propiedades de enlazamiento a ligando para EGFR. Oncogenes erbB

20 aviares activados forman homodímeros en ausencia de ligando con eliminaciones de toda la región extracelular diferente de una porción de subdominio IV (segundo dominio rico en cisteína). Sin embargo, la importancia fisiológica de esta formación observada de homodímero no estaba clara ya que esta no se correlacionó con propiedades de transformación específicas en tejidos de estos mutantes.

La asociación física puede ocurrir entre las regiones extracelulares de p185neu y de EGFR en las células transformadas, a pesar de una eliminación que incluye la mayoría de dos subdominios independientes (I, II) en la región extracelular del receptor de EGF. Mutantes extracelulares de p185neu eliminados de cualquier subdominio I o

30 II todavía conservan la capacidad de formar heterodímeros con EGFR de longitud completa, lo que confirma que estas secuencias no son críticas para asociaciones físicas heteroméricas de p185neu/EGFR. La inhibición fenotípica de oncoproteínas EGFR por proteínas neu T691 de detención apoya el argumento de que una asociación física controlada principalmente por subdominios III y IV es suficiente para modular la señalización. Con base en un análisis de la eficiencia de transformación de los fibroblastos que expresan EGFR humano tipo silvestre y mutantes de eliminación de subdominio extracelular de p185neu, el subdominio III en p185neu parece ser el subdominio extracelular menos relevante para la formación de un complejo de señalización heterodimérica de p185neu/EGFR transformadora, lo que sugiere que las interacciones mediadas por el subdominio IV pueden ser más importante para la iniciación y/o estabilización de complejos de receptores homodiméricos y heterodiméricos.

R y ΔEGFRs endógenos, Mr 140 ricos en cisteína extracelulares en subdominio II y IV de p185neu y EGFR pueden poseer un pliegue único conocido como el "pliegue de EGF" o "nudo de cisteína". El motivo se caracteriza por una repetición de seis residuos de cisteína y por al menos dos enlaces disulfuro intracatenarios. Aunque se ha observado un motivo similar en otras proteínas, su presencia está altamente conservada en receptores de citoquinas y de transmembrana, incluyendo el receptor del factor de necrosis tumoral resuelto estructuralmente (TNF). Se ha

45 demostrado que varios receptores de tirosina quinasa contienen estos dominios ricos en cisteína y se presume que adoptan conformaciones similares a las del receptor de TNF. Los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), se han observado como dímeros en estructuras cristalinas de la forma no complejada. De esta forma, el último dominio rico en cisteína extracelular forma los principales contactos diméricos. En estos estudios, el dominio proximal de la membrana está desordenado tal vez debido a la falta de la región transmembrana que contiene este dominio en un estado estable. Así, existe la hipótesis de que en todo el receptor, el último dominio rico en cisteína justo el terminal amino de la secuencia transmembrana puede ser estabilizado por la secuencia transmembrana y posiblemente involucrado en la formación de dímeros funcionales. Se ha identificado un alto grado de homología de secuencia entre el segundo dominio rico en cisteína (subdominio IV) de p185neu y EGFR y el pliegue del nudo de cisteína en el receptor de TNF. Una simple comparación de secuencias en los dominios transmembrana proximales del TNF y los

50 receptores p185neu muestra que al menos cuatro de las seis cisteínas se conservan.

La regulación por interacciones *trans*-receptor se ha observado para todos los miembros de la familia erbB, muchos de los cuales presentan expresión alterada o regulación en enfermedades malignas epiteliales humanas. La tendencia fisiológica de esta familia de receptores para formar asociaciones heteroméricas sugiere que el direccionamiento de oncoproteínas erbB humanas con estructuras o productos farmacéuticos que imitan ciertos

60 subdominios en el ectodominio p185neu podría ser alcanzable en ciertas enfermedades malignas humanas. Alternativamente, el ADNc de ectodominio de p185neu podría ser suministrado a las células tumorales positivas

para el receptor erbB en una metodología de terapia génica para la neoplasia humana. Oncoproteínas ΔEGFR se expresan diferencialmente en muchos neoplasmas epiteliales humanos y pueden representar un objetivo específico de tumor, sin embargo, estos receptores no están regulados por el enlazamiento del ligando, son constitutivamente fosforilados, e interiorizar pobremente. Estas características pueden limitar los esfuerzos para inhibir la señalización de los receptores ΔEGF en tumores humanos. La tendencia termodinámica preferida para la formación de heterodímeros de erbB en ausencia de ligando sugiere que direccionando las oncoproteínas erbB con el ectodominio de p185neu, novedosos productos farmacéuticos, o miméticos de péptidos relevantes para la formación de dímero serían más efectivos en lograr la inhibición del crecimiento que la inhibición de la activación inducida por ligando con anticuerpos monoclonales o antagonistas de enlazamiento al ligando.

10 Materiales y métodos

Construcción del vector

El mutante de eliminación neu T691 de detención neu fue derivado a partir del ADNc de neu oncogénico de rata, pSV2Tneu, que contiene un único punto de mutación en la región de transmembrana. La mutagénesis dirigida al sitio se utilizó para introducir un codón de detención en la posición Thr-691 en el endodominio. Esta forma de eliminación citoplásmica de p185neu, que carece del dominio catalítico de quinasa y los sitios de autofosforilación del terminal carboxilo, a continuación, se insertaron entonces en un vector de expresión de mamífero. Un fragmento que contiene el gen de higromicina^r de pHYG se subclonó en APTag-1, un vector de expresión de la fosfatasa alcalina (AP) bajo el control del promotor del virus Maloney de la leucemia y LTR (MuLVLTR). El gen AP fue reemplazado por el ADNc de neu T691 de detención mutante. Por lo tanto, T691 de detención se expresó en el vector de expresión pMuLVLTR/T691 de detención/Hyg^r.

Mantenimiento de células y desarrollo de líneas celulares transfectadas de forma estable.

La línea celular de glioblastoma humano progenitor U87MG y el subclón de glioblastoma humano U87MG.ΔEGFR previamente informado que contiene receptores de ΔEGF humanos (Nishikawa et al., 1994) se obtuvieron de Dr. Webster Cavenee (Ludwig Cancer Institute, San Diego, California). Para transfecciones celulares estables, diez microgramos del constructo pMuLVLTR/T691 de detención/Hyg^r se transfectaron en células U87MG.ΔEGFR a través del reactivo lipofectamina (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) bajo condiciones determinadas por transfecciones utilizando el constructo informador de CMV-β (β-galactosidasa bacteriana) (Clontech). La eficiencia de transfección óptima se determinó por quimioluminiscencia como se detectó por un luminómetro (Tropix). Todas las células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Bio-Whittaker, Walkersville, MD) con 10% de suero bovino fetal (Hyclone, Ogden, UT), 100 U de penicilina, 50 μg/ml de estreptomina, y L-glutamina 2 mM (GIBCO BRL). Las células cultivadas se mantuvieron a 37 °C en 95% de aire/5% de CO₂. Las células U87MG.ΔEGFR se suplementaron con .4mg/ml de G418 (geneticina, GIBCO BRL) para el mantenimiento de la expresión transgénica de ΔEGFR.

Para el desarrollo de transfectantes dobles derivados de U87MG que expresan proteínas ΔEGFR y neu T691 de detención, el medio se suplementó tanto con sulfato de G418 como con higromicina B. Después de 2-3 semanas en medio de selección que contenía 70ug/ml de higromicina B (Boehringer Mannheim) y .4mg/ml de sulfato de G418 (geneticina, Gibco BRL), clones U87MG.ΔEGFR establecidos que expresan neu T691 de detención (designados células U87MG.ΔEGFR/T691) fueron aislados y seleccionados por análisis de citometría de flujo utilizando mAb 7.1.64 contra el ectodominio de neu. El medio para subclones transfectados de forma estable se suplementó con .4mg/ml de sulfato de G418 y 35-70ug/ml de higromicina B para el mantenimiento de la expresión transgénica. Las líneas celulares transfectadas de forma estable fueron revisadas periódicamente mediante análisis de citometría de flujo con mAb 7.16.4 para documentar los niveles estables de expresión transgénica de neu T691 de detención.

Marcado metabólico de las células, seguido por inmunoprecipitación.

Se siembran durante la noche células subconfluentes (1 x 10⁶) en placas de 10 cm en medio de cultivo completo (10% de FBS-DMEM). Al día siguiente, las células son dejadas sin nutrición en DMEM libre de cisteína durante una hora y luego pulsadas con ³⁵S-cisteína (50 μCi/ml) (Amersham) durante 15 horas en el 3% de FBS dializado/DMEM libre de cisteína. Los lisados se recolectaron después de dos lavados en PBS usando un regulador PI/RIPA. Las inmunoprecipitaciones se llevan a cabo en hielo durante 60 minutos y los complejos están separados por enlazamiento a la proteína A-sefarosa antes de la separación por 8% de SDS-PAGE, secado, y exposición a película. El anticuerpo monoclonal 7.16.4 contra el ectodominio de p185neu se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5,677,171. El anticuerpo monoclonal 528 contra los dominios extracelulares de ambos EGFR y EGFR se obtuvieron de Oncogene Science. Se utilizaron 5 μg de anticuerpo para inmunoprecipitación de proteínas a partir de lisados recuperados de placas de 10 cm.

Estudios de entrecruzamiento, inmunoprecipitaciones; e inmunoprecipitación Western.

55 Igual número de células se sembraron y se cultivaron durante la noche en placas de 10 cm. Las células fueron sometidas a carencia de nutrición durante 24 horas en un medio libre de suero y se trataron con EGF (100 ng/ml a

37°C durante 10-15 minutos) y luego se lavaron dos veces con solución salina regulada con fosfato frío (PBS). Para el entrecruzamiento, se agregó entonces se le añadió PBS que contenía DTSSP 2 mM (3,3'-ditiobis (sulfosuccinimidilpropionato) (Pierce) y las células se incubaron a 23°C durante 30 minutos, con agitación ocasional de las placas. La reacción de entrecruzamiento se detuvo con regulador que contenía Tris HCl 10 mM, 0.9% de NaCl, y glicina 0.1 M. Las células fueron entonces lavadas dos veces con PBS frío y se solubilizaron con regulador PI/RIPA. Los lisados celulares se sometieron a inmunoprecipitación bien sea con mAb 7.16.4 anti-neu, mAb 528 anti-EGFR, o mAb Δ 124 anti- Δ EGFR. Los inmunocomplejos de proteínas neu o proteínas EGFR fueron luego solubilizados y separados por geles de SDS-PAGE (6-8%), y se transfirieron a nitrocelulosa antes de inmunotransferencia bien sea con el anticuerpo policlonal anti-EGFR, Ab-4 (Oncogene Science) o el mAb PY-20 anti-fosfotirosina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.).

Ensayo de quinasa *in Vitro*

Las células se sembraron en placas de cultivo de 100 mm y al día siguiente se lavaron dos veces en PBS enfriado con hielo y se sometieron a lisis en 1 ml de regulador de lisis (Hepes 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, 3% de Brij-35, EDTA 2 mM, 0.02 mg/ml de aprotinina, 10% de glicerol, $MgCl_2$ 1.5 mM). Los lisados celulares se centrifugaron a 20,000 g durante 15 min. Las concentraciones de proteína de los lisados celulares se midieron con el Ensayo de Proteína Dc (Bio-Rad). 40 microlitros de 50% (vol/vol) de proteína A-sefarosa se utilizaron para recolectar los complejos inmunes, los cuales se lavaron entonces tres veces con regulador de lavado (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, 0.1% de Brij-35, EDTA 2 mM, 0.01 mg/ml de Aprotinina, Na_3VO_4 0.03 mM). Las pellas se suspendieron en 20 microlitros de HEPES 20 mM (pH 7.4, $MnCl_2$ 5 mM, 0.1% de Brij-35, Na_3VO_4 0.03 mM, 0.02 mg/ml de Aprotinina) que contiene 5 uCi de ^{32}P - γ -ATP, y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se terminó mediante la adición de 3x regulador de muestra de electroforesis que contiene ATP 2 mM. Después de la incubación a 100°C durante 3 min, las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE.

Ensayos de tumorigenicidad *in vitro* e *in vivo*.

El crecimiento celular en condiciones completas o reducidas en suero se estableció como sigue: 2×10^4 células de cada línea celular se sembraron en placas de 6 pozos y se dejaron unir en medio de crecimiento completo. Al día siguiente, las células se mantuvieron, ya sea en medios de crecimiento completo (10% de FBS) o se cambiaron a 2% de suero FBS. Las células se dejaron crecer durante cuatro días y luego se trataron con tripsina y se contaron.

El crecimiento independiente del anclaje se determinó estableciendo la eficiencia de formación de colonias de células suspendidas en agar suave. $1-3 \times 10^3$ células se suspendieron en una capa superior de 1 ml (0.18% de agarosa/10% de FBS-DMEM) en placas de cultivo de 6 cm que contenía una capa alimentadora libre de células de 3 ml que consiste en 0.25% de agarosa en DMEM suplementado con 10% de FBS y Hepes 20mM (pH 7.5). Las colonias (> 0.3 mm) se visualizaron y se contaron en 21-28 días para todas las líneas celulares después de la tinción con violeta de p-yodonitrotetrazolio (1 mg/ml). Cada línea celular se examinó en triplicado por tres experimentos separados.

Ratones lampiños homocigotos NCr de 6-8 semanas de edad fueron adquiridos del National Cancer Institute. Las células (1×10^6) se suspendieron en 0.1 ml de PBS y se inyectaron por vía intradérmica en el dorso medio de cada animal. Las células U87MG progenitoras fueron inyectados en un lado de los animales individuales y las líneas celulares transfectadas de manera estable se inyectaron en el lado contralateral para hacer comparaciones directas de crecimiento dentro de cada animal. También se inyectó PBS solo en cada animal como un control adicional. Los animales fueron mantenidos de acuerdo con las directrices del Comité de Animales de la University of Pennsylvania y los preparados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Institute of Laboratory Animal Resource. El crecimiento tumoral se monitorizó dos veces por semana durante 10-12 semanas. El tamaño del tumor se calculó midiendo el volumen del tumor (longitud x anchura x grosor).

Anticuerpos.

El anticuerpo monoclonal (mAb) 7.16.4 reactivo con el ectodominio de p185neu se describió previamente. El anticuerpo antifosfotirosina, mAb PY-20, se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). mAb 528 (Ab-1) reactivo con la región extracelular de EGFR y Δ EGFR se adquirió de Oncogene Science (Uniondale, NY). mAb Δ 124 reactivo con el Δ EGFR solamente se obtuvo del Dr. Webster K. Cavenee, Ludwig Cancer Institute, San Diego, CA. El anticuerpo policlonal Ab-4, reactivo con el EGFR y utilizado para inmunotransferencia, se obtuvo de Oncogene Science (Uniondale, NY).

EJEMPLO 5 Conversión de un fenotipo radorresistente a uno más sensible mediante la desactivación de la señalización del erbb en células cancerosas humanas.

Introducción

Son poco conocidos los parámetros moleculares que determinan cómo una célula se vuelve más o menos sensible al daño del ADN inducido por radiación o agentes quimioterapéuticos. Se ha argumentado que el estatus de las

5 rutas de señalización del punto de control del ciclo celular es un determinante importante de la respuesta al daño del ADN y las mutaciones en los componentes de los puestos de control son prevalentes en los cánceres humanos. Un paradigma introducido recientemente sugiere que las células tumorales exhiben la detención del crecimiento o apoptosis en respuesta a las terapias citotóxicas que dependen del estado funcional de las rutas de los puntos de control, y que la apoptosis inducida por radiación puede resultar de rutas de detención del crecimiento alteradas. De la misma forma, en otros sistemas que utilizan las células no transformadas, mecanismos incompletos de reparación del ADN, que se presentan durante el retardo de fase de punto de control, incrementan la tendencia a la apoptosis.

10 Los glioblastomas humanos exhiben muchas alteraciones genéticas, que incluyen la amplificación y/o mutación del gen que codifica el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), en algunos casos dando como resultado la expresión de la quinasa receptora de EGF constitutivamente activada.

15 La expresión de un inhibidor del receptor *trans* de EGFR, derivado del ectodominio del oncógeno p185neu (neu T691 de detención), forma heterodímeros tanto con EGFR de longitud completa como con una forma de EGFR mutante eliminada extracelularmente constitutivamente activada (Δ EGFR observada comúnmente en tumores gliales humanos, particularmente aquellos de grado patológico superior. El crecimiento celular y la transformación de células de glioma humano que coexpresan positivo en EGFR o EGFR/ Δ EGFR son inhibidos por los mutantes de eliminación deficientes en quinasa de p185neu. El complejo receptor heterodimérico de EGFR/mutante neu T691 de detención tiene afinidad disminuida para el ligando del EGF, la cinética de internalización deteriorada, contenido de fosfotirosina reducida, y actividad de la quinasa enzimática disminuida con respecto a los complejos homodiméricas EGFR y EGFR de longitud completa.

20 Las rutas específicas que median la transformación oncogénica en células humanas transformadas positivas en EGFR no han sido completamente caracterizadas. Las oncoproteínas Δ EGFR de origen natural pueden incrementar la actividad constitutiva de una ruta de Grb2/Shc/Ras y la señalización a través de fosfatidil inositol-3 (PI-3) quinazas, presumiblemente mediante el enlazamiento a distintas proteínas adaptadoras. Proteínas quinazas activadas por mitógenos (MAP) particulares, tales como los de la familia quinasa de terminal amino c-jun (JNK), pueden ser constitutivamente activadas por los receptores de Δ EGF oncogénicos independientes del ligando. Aunque se ha encontrado que los holo-EGFR solamente se transforman débilmente en una manera dependiente de ligando a altos niveles de expresión del receptor en los fibroblastos, muchos tumores humanos exhiben niveles elevados de EGFR y esto puede contribuir a la actividad de la quinasa no regulada en células transformadas.

30 Los experimentos fueron diseñados para abordar si la inhibición específica de la señalización a través del EGFR sobreexpresado en las células de glioma humano radiorresistentes podría alterar la respuesta fisiológica de estas células para la inducción de daño genómico. La irradiación gamma combinada con la inhibición del receptor erbB dio como resultado un mayor grado de detención del crecimiento inducido por la radiación y la apoptosis en células que normalmente resistentes a la radiación ionizante. La apoptosis incrementada se produjo en células de glioma humano transformadas que contienen o bien una proteína de tipo silvestre o p53 mutada, y sugirió que ambos mecanismos dependientes de p53 e independientes de p53 mediaron este resultado fisiológico. Las rutas distales a la interacción inhibitoria específica entre la proteína neu mutante T691 de detención y el receptor de EGF determinan la respuesta del tumor al daño genómico y estas rutas pueden ser moduladas por las asociaciones de los receptores proximales. Las rutas inhibitorias específicas iniciadas a nivel de la membrana celular y asociadas con la detención y/o apoptosis de crecimiento pueden modular los resultados de punto de control subsecuente en respuesta al daño del ADN. Estos resultados tienen implicaciones para el diseño de agentes específicos del receptor capaces de sensibilizar a las células para terapias citotóxicas y sugieren que la inhibición específica a los receptores erbB combinada con tratamientos citotóxicos puede mejorar la respuesta a los agentes anticancerosos.

Materiales y métodos

Construcción del vector

45 La derivación del constructo del receptor mutante de neu T691 de detención se detalló anteriormente.

Mantenimiento de células y desarrollo de líneas celulares transfectadas de forma estable.

La línea celular de glioblastoma humano U87MG se obtuvo del Dr. Webster Cavenee (Cancer Institute Ludwig, San Diego, California). Células de glioma humano U373MG, originalmente aisladas de un astrocitoma anaplásico humano, se obtuvieron a través de la American Type Tissue Collection (ATCC) (Rockville, MD).

50 Análisis citométrico de flujo de la distribución del ciclo celular.

55 Las células se tiñeron para citometría de flujo mediante el tratamiento secuencial con solución de tripsina al 0.003%, seguido por inhibidor de tripsina al 0.05%, solución A de RNasa al 0.01%, y luego yoduro de propidio (PI) al 0.0416% y solución de tetracloruro de espermina 5 mM. Cada tratamiento se realizó durante 10 minutos con agitación continua a temperatura ambiente. Todos los reactivos fueron ordenados de Sigma. Se realizó el análisis del ciclo celular dentro de 2 h de la tinción en un citómetro de flujo de Becton-Dickinson FACScan. Se recolectaron diez mil

eventos para cada muestra y los datos analizados utilizando el programa de análisis de ciclo celular ModFit (Becton-Dickinson, versión 2.0).

Tinción de los núcleos y análisis morfológico de la apoptosis.

5 Las células se sembraron sobre portaobjetos durante al menos 12 horas antes de la irradiación. La irradiación se realizó en condiciones idénticas a los Ensayos de Fonación de Colonia. Los portaobjetos se lavaron entonces dos veces con PBS en los tiempos indicados, y se fijaron en mezcla 50:50 de metanol enfriado con hielo/acetona durante diez minutos. Los portaobjetos fueron subsecuentemente teñidos con 4',6-Diamidino-2-fenilindol di clorhidrato hidratado (DAPI) (Sigma, St. Louis, MO) a una concentración de 0.1 µg/ml en PBS. La consistencia entre observadores en el recuento de la apoptosis se confirmó con tinción para marcación terminal en muesca de ducto
10 mediada por desoxinucleotidil transferasa (TUNEL) y por tres observadores independientes.

Los recuentos de células se llevaron a cabo dentro de los 30 minutos de la tinción y las fotografías fueron tomadas en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioplan. Al menos se contaron tres campos independientes de 100 células para cada muestra

Ensayo de formación de colonias

15 La supervivencia celular después de la irradiación se estableció mediante el ensayo de formación de colonias. El número de células que fue cultivado se calculó para formar 20 a 200 colonias por placa en cada dosis de radiación, y se sembró en placas de cultivo de 10 cm (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Las células se irradiaron usando un modelo JLShepherd 30 Mark I irradiador de Cesio-137 suministrando 12.8 Gy/min con las células sobre una plataforma giratoria para garantizar la irradiación uniforme. Las células se incubaron después de la irradiación a
20 37°C con 5% de CO₂ durante 7-10 días y luego se tiñeron con cristal violeta. Las colonias que contenían más de 50 células se contaron bajo un microscopio de disección. La fracción superviviente es la relación entre el número de colonias formadas con el número de células sembradas, y se corrigió para eficiencia del cultivo. Al menos tres concentraciones diferentes de células se utilizaron para cada dosis de radiación.

Inmunotransferencia Western.

25 Para cada punto de tiempo, 10⁵ células por placa de 6 cm se recolectaron mediante lisis en 400 µl de regulador de muestra (10% de glicerol, 2% SDS, DTT 100 mM, Tris 50 mM, pH 6.8). Se cargaron por línea 30 µl de cada lisado y se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 15% antes de la transferencia durante la noche para una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA). Las membranas se probaron con anticuerpo monoclonal p53 antihumano de ratón (NeoMarkers, FEMONT, CA.), seguido por anticuerpo secundario antirratón de
30 cabra acoplado a peroxidasa de rábano picante (Amersham, Arlington Heights, IL). Con el fin de reducir el enlazamiento del anticuerpo de fondo, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario en 2.5% de leche en polvo en PBS. La detección se realizó por quimioluminiscencia (ECL, Amersham, Arlington Heights, IL). Los niveles relativos de la expresión de p53 se determinaron mediante el barrido de las transferencias utilizando un densitómetro de barrido (Molecular Dynamics).

35 Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal 7.16.4 reactivo contra el ectodominio de p185neu se describió anteriormente. Los anticuerpos anti-ERK y anti-JNK se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA.). Los anticuerpos policlonales reactivos con p53 y p21 se obtuvieron de NeoMarkers (Fremont, CA.). Los anticuerpos reactivos con bcl-2, bax, bcl-xL y se obtuvieron de Oncogene Science (Uniondale, NY).

40 Resultados

Distribución del ciclo celular de ciclización de células de glioblastoma humano tratadas con irradiación gamma: efectos de la desactivación de la señalización de erbB en la detención del crecimiento.

45 Para ambas células U87MG y U87/T691, la ausencia de suero prolongada sola (72-100h) condujo a una acumulación incrementada de células en G0/G1, con reducciones modestas tanto en las poblaciones de S como de G2/M. Células U87/T691 mostraron una mayor fracción de G0/G1 que las células U87MG progenitoras, ya sea en presencia de suero o después de la privación prolongada de suero, lo que indica que la detención del crecimiento incrementado relativamente inducido por la expresión del receptor mutante neu T691 de detención no fue superado por el crecimiento en suero completo.

50 La inducción de la detención del crecimiento por exposición de la poblaciones de células gliales humanas, transformadas con ciclización asincrónica, a irradiación gamma fue mayor que la inducida por la privación sola de suero prolongada. En ambas células U87MG y U87/T691, la irradiación de las células cultivadas bajo condiciones de crecimiento en suero completo causó incrementos robustas en G0/G1 y G2/M, y una disminución en el porcentaje de células en la fase S, tal como se determina por tinción de citometría de flujo para el contenido de ADN (Figuras 1B y

- 1D). La reducción de la fracción de fase S y la acumulación de células en G2 es característica de las células que sostienen el daño del ADN. Los datos en las Figuras 1A, 1B, 1C y 1D representan un experimento representativo de células analizadas 72h después de la irradiación gamma. Puntos de tiempo anteriores indican tendencias similares, pero el análisis de 72h después de la irradiación fue elegido por ser consistente con los experimentos subsecuentes.
- 5 Un análisis de tres experimentos independientes reveló los siguientes cambios en la distribución del ciclo celular (porcentaje medio de células \pm SEM; \pm tratamiento de radiación [RT]):
- 1.) células progenitoras U87MG:
- G0/G1: 26 ± 2.8 , +RT 51.5 ± 2.1 ;
- S: 66 ± 4.2 , +RT 21 ± 2.8 ;
- 10 G2/M: 8 ± 1.4 , +RT 28.5 ± 0.7 ;
- 2.) células U87/T691:
- G0/G1: 34.5 ± 4.9 , +RT 71 ± 7.1 ;
- S: 57.5 ± 4.9 , +RT 16 ± 4.2 ;
- G2/M: 7.5 ± 0.7 , +RT 12.5 ± 3.5 .
- 15 Células U87/T691 mostraron una fracción G0/G1 mayor, y poblaciones reducidas de S y G2/M cuando se compara con células de glioblastoma progenitoras cuando se cultiva de forma asíncrona en el cultivo, ya sea con o sin tratamiento de radiación, y la mayor diferencia estaba en la población G0/G1. Incrementos inducidos por la radiación en la fracción G2/M se observaron tanto en las células U87MG como en las U87/T691, aunque en mayor grado en las células U87MG progenitoras. La combinación de la privación de suero y el tratamiento de radiación en estas
- 20 poblaciones de células no fueron aditivas y no alteraron sensiblemente la distribución del ciclo celular, ya sea en la línea celular de la observada con el tratamiento de radiación en suero completo. Así, la desactivación de la señalización mediada por EGFR parece inducir una detención del crecimiento por un mecanismo distinto de la observada con la privación prolongada de suero.
- 25 La inhibición del receptor *Trans* sensibiliza a las células de glioblastoma humano para apoptosis inducida por radiación.
- Se ha demostrado que las células de glioblastoma humano son especialmente resistentes a tratamiento de radiación tanto experimental como clínicamente. La sobreexpresión de EGFR y/o mutación se ha correlacionado con tumores gliales humanos particularmente agresivos y se sugirió que oncogenicidad se debía a la apoptosis reducida in vitro e in vivo. Se examinó si la inhibición de la señalización mediada por EGFR en células de glioblastoma humano por el
- 30 receptor mutante de neu T691 de detención mutante podría sensibilizar a las células para la muerte celular apoptótica.
- Con la privación prolongada de suero, solamente se observó apoptosis de 0-1% en células progenitoras U87MG bien sea por tinción de 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) o tinción por TUNEL, que fue menor que la observada en otros estudios. Se encontraron células derivadas de U87MG no exhiben un pico sub-G0 por análisis de citometría
- 35 de flujo después de la tinción PI bajo condiciones que causan apoptosis, lo cual está de acuerdo con los demás. Expresión del inhibidor neu T691 de detención en células U87MG dio como resultado solamente 0-2% de apoptosis con la privación prolongada de suero según lo determinado por la identificación inmunohistoquímica de núcleos apoptóticos con DAPI.
- La apoptosis fue máxima en estudios repetidos a 72h y este punto de tiempo fue seleccionado para todos los experimentos adicionales. La expresión de la proteína neu T691 de detención en el fondo de la célula U87MG incrementó el nivel de apoptosis inducida por la radiación a $23 \pm 7.9\%$ (media \pm SEM) en 72 h en cuatro experimentos independientes en medio de crecimiento completo (Figura 2A). La privación prolongada de suero combinada con radiación dio como resultado $33 \pm 10.6\%$ de apoptosis en células U87/T691 y $11 \pm 1.5\%$ de apoptosis
- 40 en células U87MG progenitoras, un aumento comparable en ambas poblaciones por encima de la observada con la radiación de las células en medio de crecimiento completo. Se realizaron experimentos incluido el establecimiento morfológico de la apoptosis en células de glioma humano después de irradiación gamma. Todas las células se tiñeron con DAPI en 72h después de haber sido expuestas a irradiación gamma. Se observaron los núcleos que exhibe la morfología apoptótica. Los cambios morfológicos de vacuolización nuclear y la fragmentación característica de la apoptosis se muestran por análisis inmunohistoquímico de las células cultivadas derivadas de U87MG teñidas con DAPI. Los índices apoptóticos representan una subrepresentación de la muerte celular total después de la
- 50 radiación en las células U87/T691 dado que fuimos incapaces de examinar inmunohistoquímicamente las células flotantes

Supervivencia clonigénica de las células de glioblastoma humano irradiados. Se midió el número de células que escapan a la detención del crecimiento o la muerte y son capaces de pasar para formar una colonia, un ensayo comúnmente utilizado para determinar la radiosensibilidad. En ciertos casos, los ensayos de crecimiento clonogénico no se han correlacionado con la sensibilidad a la radiación o la quimioterapia, presumiblemente ya que el destino de las células muertas o detenidas de manera estable no está determinado en este ensayo. Como se muestra en la Figura 3, las células U87/T691 exhiben sensibilidad incrementada a la radiación a través de un rango de concentraciones de radiación (2-10Gy). Las células U87/T691 fueron aproximadamente medio de registro más sensibles a la radiación que sus homólogas progenitoras no transfectadas en todas las dosis de radiación probada. Estos resultados se confirmaron con subclones adicionales que expresan neu T691 de detención. Las células U87MG y sus derivados contenían proteínas p53 y p21 de tipo silvestre.

Relación de la sensibilidad a la radiación de las células de glioblastoma humano al estatus de p53.

Se ha demostrado que el estatus de p53 influyen en la respuesta a la radiación ionizante en una serie de tipos de células transformadas y no transformadas. Se hizo un análisis de la inducción de p53 en células de glioblastoma humano después de la irradiación gamma. 10⁵ células U87MG y U87/T691 que contenían un producto del gen p53 de tipo silvestre se sembraron y fueron irradiadas con gamma (10 Gy) después de la unión durante la noche. Los lisados fueron entonces llevados en los tiempos indicados después de la radiación, se sometieron a SDS-PAGE y se inmunotransfirieron con un anticuerpo reactivo con p53. Control de las células eran células MCF-7 de cáncer de seno que contenían proteína p53 inmunorreactiva. Se observó consistentemente inducción más robusta de la proteína p53 a las 12h después de la irradiación gamma en subclones U87/T691. El análisis de Western de los lisados celulares obtenidos en diferentes puntos de tiempo después del tratamiento de radiación indicó incrementos persistentes en los niveles de proteína p53 detectados en todo momento entre 6-72h después de la radiación tanto en U87MG como en sus derivados transfectados neu T691 de detención. El punto de tiempo cero indica células que fueron irradiadas con rayos gamma e inmediatamente sometidas a lisis para análisis. Las densidades de p53 fueron se compararon en este punto de tiempo con células en ciclización irradiadas de forma falsa. Se observó un incremento de 10 veces en la densidad de p53 12h después de la radiación en las células U87/T691, en comparación con solamente incrementos de 1.5 a 3 veces tanto en células U87MG como en células U87/T691 en todos los otros puntos de tiempo examinados. Esta tendencia se observó consistentemente (cuatro experimentos) y se observó en células U87/T691 tan pronto como 6 h después de la radiación en algunos experimentos, y sugiere que las rutas de señalización dependientes de p53 pueden ser activadas de manera más eficiente mediante la desactivación del EGFR en presencia de daño genómico. Se observaron alteraciones en proteínas en puntos de control regulados por p53 12h después de la inducción de daño genómico por irradiación gamma. La inhibición del crecimiento y la diferenciación de las células de cáncer de seno humano después de la ligadura de los receptores erbB se han asociado con la activación de una ruta dependiente de p53.

p21 fue inducida en ambas células U87MG y U87/T691 después del tratamiento de radiación, con niveles más altos vistos 24 horas después de exposición a la radiación en ambas líneas celulares. En ambas células U87MG y células U87/T691, es comparable la densidad de la proteína p21 6-24h después de la radiación. Aunque otros han sugerido que la sobrerregulación de bcl-x_L está asociada con apoptosis reducida en células de glioma humano, no se detectaron cambios en la expresión de la proteína bcl-x_L después de la radiación, ya sea en las células U87MG o células U87/T691. Tanto los niveles de bcl-XL constitutivos como inducidos por la radiación fueron equivalentes en las células U87MG y las U87/T691. El examen de los niveles de proteína bax y bcl-2 no reveló diferencias entre las células de glioblastoma y sus subclones inhibidos.

Apoptosis en células de glioblastoma humano mutado p53

Células de glioma humano U373MG contienen un producto del gen p53 mutado, son deficientes en la expresión de p21 y muestran una elevación comparable de EGFR de superficie a células U87MG mediante análisis de citometría de flujo. Estas células se utilizaron para determinar si la apoptosis observada después de la inhibición de señalización mediadas por EGFR e irradiación gamma y fue dependiente de una proteína p53 de tipo silvestre. Células U373MG exhibieron incrementos en los niveles de una proteína p53 mutada después de irradiación gamma, pero no expresan p21 constitutivamente o después del tratamiento de radiación.

El receptor mutante neu T691 de detención se expresó en células de glioma U373MG y confirmó la expresión comparable a las células U87/T691 en cuatro subclones de U373/T691 por marcado metabólico y análisis citométrico de flujo. La citometría de flujo indicó que los niveles superficiales del receptor neu mutante T691 de detención fueron equivalentes en subclones de U87/T691, U373/T691 cl 1 y U373/T691 cl 12, y dos derivados de U373MG que expresan neu T691 de detención. Los derivados de U373MG que expresan el receptor mutante neu T691 de detención fueron capaces de detención del crecimiento en bajo contenido de suero, y despliegan un césped detenido de células confluentes sin el desarrollo de focos in vitro transformados morfológicamente, lo que indica que las proteínas de tipo silvestre p53 y p21 no se requerían ni para la detención del crecimiento ni para inhibir la transformación de células de glioma en las que fue deshabilitada señalización de erbB. Los subclones de U373/T691 cl 1 y U373/T691 cl 12 fueron entonces irradiados junto con las células U373MG y exhibieron niveles incrementados de apoptosis sobre sus contrapartes progenitoras (Fig. 2B). En el experimento representativo mostrado, dos

subclones de U373/T691 exhibieron 32% y 59% de apoptosis, respectivamente, 72h después de la irradiación gamma, en comparación con 2% de apoptosis en células U373MG progenitoras y un índice apoptótico de 20% en las células U87/T691. La desactivación de la señalización del EGFR mediante la expresión de neu T691 de detención en dos líneas distintas de células de glioma humano que contienen diferencias en el estado de p53 y p21 dio como resultado aumento de la apoptosis inducida por la radiación. Sensibilización de células de glioblastoma humano para daño genómico puede entonces producirse en ausencia de las proteínas p53 y p21 de tipo silvestre. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que ambas rutas dependientes de p53 e independiente de p53 pueden mediar la sensibilización para la muerte celular inducida por una combinación de inhibición del receptor *trans*- y el daño genómico. De mencionar, células de glioblastoma humano en las que la señalización de EGFR está desactivada no parecen ser más sensibles a la muerte celular, ya sea por privación prolongada de suero o por el factor de necrosis tumoral α -mediado, que las células progenitoras

Discusión

La inhibición específica de EGFR-señalización que inhibe el crecimiento celular y la transformación también sensibiliza las células de glioma humano radiorresistentes al daño genómico inducido por radiación. Células de glioblastoma que expresan un receptor mutante *trans* dominante, derivado de neu de p185, mostraron una mayor detención en fase G1 y mayores niveles de apoptosis después de la radiación que su contraparte progenitora. En fibroblastos de mamíferos y en células neuronales especializadas, el suero o la privación del factor de crecimiento pueden conducir a la apoptosis bajo condiciones particulares. La sola privación prolongada de suero no indujo la apoptosis en células de glioblastoma humano en estos estudios. El daño de ADN combinado con bien sea la desactivación de la señalización del receptor *erbB* o privación del suero se requirió para inducir apoptosis. La apoptosis fue inducida por la radiación en el 23% de los derivados de U87MG y en 32-59% de los subclones derivados de U373MG en los que el EGFR fue deshabilitado (comparado con solamente el 1-2% en las células progenitoras) en medio de crecimiento completo, lo que indica que la inhibición de la señalización de EGFR para inhibición del receptor *trans* no podría ser superada por el crecimiento en suero. La privación de suero combinada con daño por radiación incrementó niveles observados de apoptosis en ambas células U87MG progenitoras y derivados de glioblastoma humano que expresan neu T691 de detención para el mismo grado. Notablemente, después de daño en el ADN, la apoptosis observada mediante la desactivación de la señalización del receptor *erbB* en la superficie celular fue mayor que la observada con la privación de suero.

Los sistemas de vigilancia, o puntos de control, han evolucionado para detener el ciclo celular cuando se ha producido daños en el genoma o huso mitótico. El punto de control de daño en el ADN opera diferencialmente en las distintas etapas del ciclo celular y requiere la acción coordinada de múltiples productos génicos pleiotrópicos involucrados en la detención del crecimiento, la reparación del ADN, la activación transcripcional, y la apoptosis. Los puestos de control de daños en el ADN constituyen rutas de transducción de señales que comunican información del ADN dañado a los componentes del ciclo celular. Los datos presentados en estos estudios muestran que los eventos de señalización mediada por el receptor de tirosina quinasa (RTK) pueden influir en las rutas de señalización de los puntos de control del daño en el ADN. En particular, la inhibición del EGFR en células de glioma humano malignas puede incrementar el grado de detención del crecimiento y la apoptosis observada después de daño del ADN causado por rayos-X.

La resistencia de las células irradiadas con gamma se ve afectada por el estado funcional de oncogenes distintos. La expresión de Ras o Raf oncogénico disminuye la radiosensibilidad en las células NIH3T3 y la expresión del Ras^H además de que los oncogenes, ya sea c o v-myc, confieren resistencia a fibroblastos de embrión de rata expuestos a irradiación gamma. También es cierto que la expresión de diversos oncogenes puede sensibilizar las células a la apoptosis, tras la exposición a suero bajo o a los agentes anticáncer. El retraso de la división que se presenta tanto en las fases G1 como en G2 del ciclo celular es influenciado por la expresión de oncoproteínas dominantes tales como H-ras. La expresión de una proteína p53 de tipo silvestre se ha asociado con la supervivencia disminuida después de irradiación gamma, debido a la inducción de una mayor fracción de apoptosis sobre células que contienen una proteína p53 mutada. Sin embargo, se ha demostrado que las células tumorales que contienen una proteína p53 mutada y la proliferación de células linfoides derivadas de ratones p53^{-/-} experimentan apoptosis después de la radiación, lo que sugiere mecanismos independientes de p53 de muerte celular después del daño genómico.

Los factores que median el grado de detención de crecimiento versus la apoptosis observada después del daño del ADN en un tipo de célula particular no han sido definidos y los factores específicos de células que influyen en la detección del daño del ADN, la recuperación celular, y la decisión para apoptosis no se conoce completamente. Los mecanismos dependientes de p53 pueden influenciar la respuesta de las células de glioma inhibidas para someterse a la detención del crecimiento relativo y/o apoptosis. Los resultados en las células derivadas de U373MG también indican que la muerte celular apoptótica ocurre después de daño genómico en células humanas transformadas en las que la señalización de EGFR se inhibe involucra mecanismos que son distintos de las proteínas p53 y p21. Ratones p21^{-/-} se desarrollan normalmente y no parecen tener defectos en la muerte celular programada requerida para el desarrollo normal de órganos, lo que indica que es probable que p21 no se requiera para la apoptosis. Ratones p53^{-/-} despliegan inestabilidad genética y contienen niveles elevados de c-myc. Estos ratones se someten

a niveles significativos de apoptosis in vivo, lo que indica que los mecanismos independientes de p53 de la apoptosis son funcionales tanto en tejidos normales como en células transformadas.

De manera interesante, el trabajo reciente demuestra que la ausencia de p21 en células de carcinoma colorrectal isogénicamente emparejados dieron como resultado la detención del crecimiento reducida en comparación con los derivados positivos en p21 de la misma línea celular y esto se correlacionó con más crecimiento tumoral inhibido in vivo. Estas observaciones se atribuyen a la apoptosis incrementada debido a defectos en la detención del crecimiento del punto de control mediada por p21, aunque la tendencia incrementada para apoptosis por células p21 -/- no se muestran directamente en este trabajo. La inducción de la apoptosis se sugirió por ser preferible a la detención del crecimiento en la terapia anticáncer in vivo. En nuestros estudios, a diferencia de los de Waldmann et al. (1997), hubo una correlación entre la apoptosis, detención del crecimiento incrementado y reducción en la supervivencia clonogénica después de la radiación.

Bajo ciertas circunstancias, en particular en las células del cáncer, la apoptosis puede ser favorecida después de daño genómico si los defectos en las rutas que median la detención del crecimiento están presentes. Adicionalmente, incluso cuando las células son capaces de experimentar tanto la detención del crecimiento como la apoptosis, como en el caso de las células humanas U373MG deficientes en p21 en las que la señalización de EGFR está desactivada, las células pueden ser inducidas a la apoptosis después de ciertas señales tales como la radiación, presumiblemente mediante la activación de distintas rutas. Nuestros datos indican que la proporción relativa de la detención del crecimiento o apoptosis inducida por daño genómico está influenciada tanto por la integridad de los puntos de control específicos como por las alteraciones en las rutas de señalización de erbB. De manera notable, la modulación de las rutas de señalización de RTK pueden influenciar los resultados del punto de control después del daño del ADN en las células transformadas. Otros han demostrado que la activación de las rutas de señalización de erbB en células de cáncer de seno contribuye a la resistencia a la radiación, lo que sugiere que las rutas de señalización de la familia erbB influyen en la respuesta al daño del ADN en muchos tipos de tumores. Mediante la combinación de la inhibición biológica de señalización con agentes capaces de inhibir específicamente oncoproteínas del receptor de la familia de la tirosina quinasa, podemos ser capaces de influir en la cinética de la respuesta de las células tumorales a los agentes citotóxicos estándar. El momento de la administración de terapias citotóxicas se puede optimizar en tales terapias de combinación y estos datos sugieren que los efectos antitumorales selectivos de regímenes anticancerosos disponibles en la actualidad podrían mejorarse, incluso en el tratamiento de enfermedades malignas humanas avanzadas que contienen alteraciones en múltiples rutas de transducción de señales del punto de control.

EJEMPLO 6: adenovirus recombinante

Los adenovirus recombinantes de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención se desactivan mediante la supresión de Ela y Elb, que normalmente se requieren para activar la expresión de otros genes virales. Estos adenovirus recombinantes, que se basan en Ad5 humano, son capaces de transducir de manera muy eficiente genes en hepatocitos humanos sin efectos citopáticos aparentes o expresión de proteínas adenovirales. LA construcción de adenovirus recombinantes que se pueden adaptar para su uso en la presente invención se describen en Kozarsky et al. 1993 *Somatic Cell and Molecular Genetics* 19(5):449-458, que se incorpora aquí como referencia. La referencia enseña adenovirus recombinante con un inserto de lacZ. El inserto lacZ puede ser reemplazado por secuencias que codifican la tirosina quinasa deficiente, proteínas que dimerizan erbB de acuerdo con la invención. El constructo génico de la invención se inserta en una secuencia enlazadora en el sitio del inserción lacZ.

Materiales y métodos

Adenovirus recombinantes. Los plásmidos utilizados para generar el recombinante, los adenovirus con eliminación de E1, Ad.CBlacZ y Ad.CBhLDLR se construyeron como sigue. El plásmido CMV β AlacZ (10) se digirió con SnaB1 y NheI, y gag β AhLDLR (16) se digirió con NheI y luego parcialmente se digirió con XhoI para aislar fragmentos que contienen el promotor de β -actina y el gen lacZ o el ADNc del receptor de LDL humano. Estos fragmentos se hicieron romos en sus extremos con Klenow. El plásmido pAdCMV-lacZ (17) se digirió con SnaBI y NotI para eliminar el promotor CMV y el gen lacZ (que conserva el potenciador de CMV), transformado en extremos romos con Klenow, y se ligó con inserciones que contienen el promotor de acción β fusionado a cualquiera de los genes lacZ o LDLR. Los vectores resultantes se designaron a pAdCBlacZ y Bloc-CBhLDLR, respectivamente.

Los plásmidos fueron linealizados con NheI y cotransfectados en 293 células con ADN adenoviral de tipo silvestre (sub cepa 360 (18), que contiene una eliminación E3 parcial) que se había digerido con XbaI y ClaI para eliminar el 5'ITR. Los adenovirus recombinantes se aislaron después de la transfección (19), se sometieron a dos rondas de purificación en placa, y los lisados se purificaron mediante centrifugación de cloruro de cesio (20). Se evaluaron las reservas de virus para los títulos mediante la limitación de la placa de ensayo de dilución en 293 células y se almacenaron a 20°C después de diluir cuatro veces con Tris Cl 10 mM, pH 8.1, NaCl 100 mM, 0.1% de albúmina de suero bovino, y 50% de glicerol. Los títulos de las reservas de glicerol fueron: Ad.CBlacZ, 2.4 x 10⁹ unidades formadoras de placas (PFU)/ml; Ad, CvhLDLR, 4 x 10⁹ PFU/ml; Ad de tipo silvestre, 8 x 10⁹ PFU/ml.

Los constructos génicos de acuerdo con la invención se insertan en lugar de las secuencias lacZ en una secuencia de enlazamiento en el plásmido.

Ejemplo 7: adenovirus recombinante

5 Los adenovirus recombinantes de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención se desactivan mediante la supresión de genes E1 y E4, que normalmente se requieren para activar la expresión de otros genes virales. Estos adenovirus recombinantes, que se basan en Ad5 humano, son capaces de transducir de manera muy eficiente genes en hepatocitos humanos sin efectos citopáticos aparentes o expresión de proteínas adenovirales. LA construcción de adenovirus recombinantes que puede ser adaptada para su uso en la presente invención se describen en la solicitud PCT número de serie PCT/US96/10245, que se incorpora aquí como referencia. La referencia enseña adenovirus recombinante con un inserto de lacZ. El inserto de la carencia se puede reemplazar con secuencias que codifican tirosina quinasa deficiente, proteína que dimerizan erbB de acuerdo con la invención. El constructo génico de la invención se inserta en una secuencia de enlazamiento en el sitio de la inserción lacZ.

15 La Figura 4 es un mapa esquemático de adenovirus recombinante H5.001CBLacZ, con sitios de enzimas de endonucleasa de restricción indicada. La barra estriada representa el minigen CBLacZ; la barra de negro representa la estructura viral Ad5, la barra sombreada representa la eliminación de Ad E4.

Líneas celulares de empaquetamiento novedoso permiten la producción de adenovirus recombinantes funcionalmente eliminados en ambos genes E1 y E4.

20 La región temprana 4 (E4) del serotipo de adenovirus 5 consiste de 7 marcos de lectura abierta (ORF) que se cree están involucrados en la replicación del ADN viral, el cierre de la célula anfitriona, y la acumulación tardía de ARNm. Para generar adenovirus recombinantes (Ad) eliminados en E4, la función de la región E4 debe ser suministrada al virus recombinante mediante un virus auxiliar o línea celular de empaquetamiento.

25 Para evitar este problema, la línea celular de empaquetamiento contiene el gen Ad5 E1 y solamente el ORF6 del gen Ad5 E4. El ORF6 de E4 solo, puede proveer los requerimientos para E4 en el ciclo de vida viral. El ORF6 está además preferiblemente bajo el control transcripcional de un promotor inducible, tal como el promotor de metalotionina de oveja, inducible por zinc, o el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), inducible por un glucocorticoide, en particular, la dexametasona.

Después de que el vector lanzadera deseado que contiene las secuencias adenovirales se transfecta en la línea celular, la expresión del ORF6 de E4 puede ser inducida por el inductor apropiado.

30 En una forma preferida, la línea celular de empaquetamiento es un riñón embrionario humano (HEK) 293 E1 que expresa la línea celular en la que se introduce la secuencia ORF 6 de E4 bajo el control de un promotor inducible. El promotor de MMTV con su inductor de glucocorticoides se prefiere actualmente, debido a que el inductor de sulfato de zinc del promotor MT puede ser en sí mismo tóxico para las células.

35 La enseñanza específica de la construcción de líneas celulares de empaquetamiento que contienen solamente el ORF 6 de la región E4 de Ad5 o, para las comparaciones funcionales, toda la región E4 se expone a continuación. Descrito brevemente, toda la región E4 y una secuencia del ORF6 del gen E4 Ad se obtienen mediante técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual". 2d. Edit, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1989) y las referencias citadas allí que son todas incorporadas como referencia). Para aislar la región del ORF6, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anclada para amplificar la secuencia del ORF6 desde su codón de iniciación hasta su codón de terminación. Los cebadores seleccionados de la secuencia publicada del ORF6 se utilizan para amplificar la secuencia ORF e insertar sitios de restricción en el extremo de la secuencia. La secuencia completa del gen E4 incluyendo la secuencia ORF6 de E4 se publica en la secuencia GenBank de Ad5 (Acceso Genback No. M73260).

45 Se construye un minigen que coloca la secuencia ORF6 bajo el control de un promotor seleccionado. El gen de secuencia de ORF6 está enlazado operativamente a componentes reguladores de una manera que permite su transcripción. Tales componentes incluyen elementos reguladores convencionales, tales como un promotor para conducir la expresión de ORF6. Un promotor inducible fue un promotor de metalotionina (MT) de oveja inducible por Zn⁺², (MG Peterson et al, Eur J. Biochem, 174: 417-424 (1988)). El segundo promotor es el virus del tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona.

50 La secuencia poliA empleada en el minigen MMTV-ORF6 es suministrada por el terminador del gen de la hormona de crecimiento y un origen de SV40 de replicación.

El minigén que contiene ORF6 se subclona en un plásmido lanzadera basado en pBR322 que contenía un gen de resistencia a la neomicina, dando como resultado un vector lanzadera.

Las líneas celulares de empaquetamiento que expresan ORF6 de E1/E4 son útiles en la generación de adenovirus eliminado de E1/E4 recombinante.

Adenovirus recombinante

5 El E1/E4 novedoso que expresa línea celular es útil en la construcción adicional de adenovirus recombinantes eliminados de E1/E4 que contienen cualquier transgén seleccionado. Los adenovirus recombinantes son capaces de suministrar un gen adecuado a las células y tejidos de mamíferos. Estos adenovirus recombinantes son funcionalmente eliminados en al menos las regiones génicas de Ad E1a, E1b y E4. Por el término "eliminado funcionalmente" se entiende que se elimina una cantidad suficiente de la región del gen o de otra manera dañada, por ejemplo, por mutación o modificación, de tal manera que la región del gen ya no es capaz de producir los productos de la expresión génica. Si se desea, toda la región del gen puede ser eliminada.

de la misma forma, los métodos empleados para la selección de secuencias virales útiles en un vector, la clonación y construcción del "minigen" y su inserción en un vector de lanzadera viral deseado y la producción de un virus infeccioso recombinante están dentro de la experiencia en la técnica dadas las enseñanzas provistas aquí.

Construcción del transgen que contiene el "minigen"

15 Un minigen en este contexto se define como anteriormente, excepto que los componentes de este minigen están diseñados para expresar el producto génico in vivo. Tales componentes incluyen elementos reguladores convencionales necesarios para conducir la expresión del transgén en una célula transfectada con el virus recombinante. Para este minigen, un promotor seleccionado está enlazado operativamente al transgén y localizado, con otros elementos reguladores, dentro de las secuencias virales seleccionadas del vector recombinante. La selección del promotor es un asunto de rutina y no es una limitación de esta invención. Los promotores útiles pueden ser promotores constitutivos o promotores regulados (inducibles), que permitirán el control de la cantidad del transgén que va a ser expresado. Por ejemplo, un promotor deseable es el del promotor/potenciador temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) (véase, por ejemplo, Boshart et al, Cell, 41: 521-530 (1985)).

25 Otro promotor deseable incluye el promotor/potenciador LTR del virus del sarcoma Rous. Todavía otra secuencia de promotor/potenciador es el promotor de β -actina citoplásmica (CB) de pollo (TA Kost et al, Nucl Acids Res, 11 (23): 8287 (1983)). Otros promotores adecuados pueden ser seleccionados por un experto en la técnica.

Producción de adenovirus recombinante

30 Secuencias de adenovirus útiles en esta invención pueden incluir las secuencias de ADN de un número de tipos de adenovirus, que están disponibles de Genbank, incluyendo tipo Ad5 (GenBank No. de acceso M73260). Las secuencias de adenovirus se pueden obtener de cualquier serotipo de adenovirus conocido, tal como los serotipos 2, 3, 4, 7, 12 y 40, e incluyendo además cualquiera de los 41 tipos humanos actualmente identificados.

35 Del mismo modo los adenovirus conocidos para infectar otros animales también se pueden emplear en los constructos del vector de esta invención. La selección del tipo de adenovirus no se anticipa para limitar la siguiente invención. Una variedad de cepas de adenovirus están disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, o disponible por solicitud de una variedad de fuentes comerciales e institucionales. En la siguiente realización de ejemplo un adenovirus, tipo 5 (Ad5) se utiliza por conveniencia.

40 Un adenovirus de esta invención contiene una eliminación funcional del gen temprano E1 inmediato previo adenoviral (que cubre el mu de 1.3 a 4.5) y el gen temprano retrasado E1b (que cubre el mu de 4.6 a 11.2). Del mismo modo el adenovirus tiene una eliminación funcional de la región E4 (que cubre el mu 92 a 97.2), o al menos de ORF6 de la región E4.

45 Adenovirus recombinantes de ejemplo para uso en esta invención, por ejemplo, pueden obtenerse por recombinación homóloga de fragmentos deseados de diversos adenovirus recombinantes, una técnica que se ha empleado comúnmente para generar otros adenovirus recombinantes para el uso de terapia génica. El adenovirus recombinante, H5.001 CBLacZ, es construido por recombinación homóloga entre la estructura viral del adenovirus dl1004 (también H5dl1004) y ADN del minigen pAdCBLacZ. HSdl1004 es un virus Ad5 eliminado desde aproximadamente de la unidad de mapa 92.1 hasta la unidad de mapa 98, esto es, sustancialmente todo el gen E4. El virus dl1004 se describe en Bridge and Ketner, J. Virol, 632 (2): 631-638 (Feb. 1989), incorporado aquí como referencia.

50 El vector pAdCBLacZ es un plásmido de ADNc que contiene Ad m.u. 0-1, una eliminación de E1 en la que se inserta un gen β -galactosidasa bacteriano bajo el control de un promotor de acción β de pollo, con otros elementos reguladores como se describe a continuación, y flanqueado por Ad m.u. 9-16 y la secuencia de plásmido.

Líneas celulares de empaquetamiento que expresan E1a/E1b y E4 novedosos

Construcción de plásmidos que expresan el ORF6 de E4

pMTE4ORF6

5 Un plásmido de ejemplo útil para la construcción de una línea celular de empaquetamiento de esta invención es pMTE4ORF6, que contiene un promotor de metalotionina de oveja (promotor MT) en el control de la transcripción de una secuencia génica humana de ORF6 E4, un terminador de la hormona de crecimiento (GH), una origen de replicación de SV40, secuencias de plásmido a partir del plásmido basado en pBR322 incluyendo un gen de resistencia a la neomicina, un sitio de poliadenilación de SV40 y un gen de resistencia a la ampicilina.

Los diversos fragmentos funcionales de este plásmido pueden ser sustituidos fácilmente con otras secuencias utilizadas convencionalmente y no son críticas para el diseño del plásmido.

10 pMMTVE4ORF6

15 Otro plásmido de ejemplo útil para la construcción de una línea celular de empaque de esta invención es pMMTVE4ORF6, que contiene un promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) en el control transcripcional de una secuencia génica ORF6 E4 humano, un terminador de la hormona de crecimiento (GH), un origen de replicación de SV40, secuencias de plásmido a partir del plásmido pBR322, que incluyen un gen de resistencia a neomicina, y un gen de resistencia a ampicilina. Los diversos fragmentos funcionales de este plásmido pueden ser sustituidos fácilmente con otras secuencias utilizadas convencionalmente y no son críticas para el diseño del plásmido, pLTR.E4 (-) Promotor E4 endógeno

20 Un plásmido utilizado como control para la construcción de una línea celular de empaquetamiento de esta invención es pLTR.E4 (-). Este plásmido contiene el MLV LTR retroviral constitutivo y la mayoría de la región del gen Ad E4 excepto que el promotor E4 endógeno y una porción del ORF1 E4 están desaparecidos. Las otras secuencias de plásmidos siguen siendo las mismas como se describió anteriormente.

pLTR.E4(+) promotor E4 endógeno

Todavía otro plásmido es pLTR.E4, que contiene el MLV LTR constitutivo y un promotor E4 endógeno y un gen E4 intacto. Las otras secuencias de plásmidos siguen siendo las mismas como se describe anteriormente.

25 Transfecciones y selecciones de clones

30 Cada uno de los plásmidos descritos anteriormente se transfectaron mediante la técnica de precipitación con fosfato de calcio en la línea celular de riñón embrionario humano 293 (ATCC CRL1573) que expresa el producto de los genes E1 de adenovirus, sembrados en placas de 100 mm (10 µg de plásmido/placa). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se recolectaron y se sembraron a diluciones diferentes (1:10 - 1:100) en placas de 100 mm durante aproximadamente 10 días. Los medios de siembra contenían G418 (geneticina, BRL) a 1 mg/ml. Las colonias resistentes que se desarrollaron fueron seleccionadas mediante los siguientes ensayos y ampliadas. El análisis preliminar de los clones se basó en una eficiencia de transducción potenciada de un virus adenoasociado recombinante, AV.CMVLacZ, y la localización de inmunofluorescencia de la proteína Ad Er como sigue.

Ensayo de potenciamiento de la transducción de AV.CMVLacZ

35 Los productos génicos E1 y E4 Ad son necesarios para la función de virus adenoasociado (AAV) recombinante. Este ensayo primario involucra la siembra de las líneas celulares de empaquetamiento del Ejemplo 1 en placas de cultivo de 35 mm de 96 pozos (2x10⁶ células/pozo) y la infección de las células con AV.CMVLacZ tratadas con calor y purificadas, en un MOI de 1,000 partículas de virus/célula.

Preparación de AV.CMVLacZ

40 Un virus AAV recombinante se prepara mediante técnicas de ingeniería genética convencionales para los fines de este experimento. El AAV recombinante se genera mediante transfecciones de plásmidos en presencia de adenovirus auxiliares (Samulski et al, J. Virol., 63: 3.822-3828 (1989)). Un plásmido pAV.CMVLacZ que actúa en cis se deriva de psub201 (Samulski et al., J. Virol 61: 3096-3101 (1987)) y contiene un minigen P galactosidasa de E. coli en lugar de genes AAV Rep y Cap. La organización 5 'a 3' del genoma AV.CMVLacZ recombinante (4.9 kb) incluye

(a) el 5' AAV ITR (bp 1-173) se obtuvo por PCR usando pAV2 (C.A. Laughlin et al., Gene, 23:65-73 (1983)) como plantilla;

(b) un potenciador/promotor temprano inmediato de CMB (Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985));

(c) un intrón de SV40;

(d) ADNc beta-galactosidase de *E. coli*;

(e) una señal de poliadenilación de SV40 (un fragmento de restricción 237 Bam HI 237 que contiene las señales de escisión/poli-A de ambas unidades de transcripción temprana y tardía, y

5 (f) 3' AAV ITR, obtenido de pAV2 como un fragmento de SnaBI-BglIII. Se proveen genes Rep y Cap por un plásmido de acción trans pAAV/Ad

10 Las monocapas de 293 células cultivadas a 90% de confluencia en placas de cultivo de 150 mm (5×10^7 células/placa) están infectados con H5.CBALP a una MOI de 10. H5.CBALP (también llamado H5.010ALP) es un adenovirus recombinante que contiene un minigen de fosfatasa alcalina en lugar de secuencias génicas de adenovirus E1A y E1b (unidades de mapa 1-9.2 de la secuencia de Ad5 de GenBank (No. de acceso M73260)). El ADNc de la fosfatasa alcalina está bajo el control transcripcional de un promotor de β -actina potenciado con CMV en este virus. Este virus auxiliar se describe en Goldman et al., Hum. Gene Ther, 6: 839 hasta 851 (Julio, 1995); Engelhardt et al., Hum. Gene Ther, 5: 1217 a 1229 (octubre, 1994); y las referencias citadas en el mismo.

15 Las infecciones se realizaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 2% (FBS) en 20 ml de medio/placa de 150 mm. Dos horas después de la infección, 50 μ g del ADN plásmido (37.5 μ g de transacción y 12.5 μ g de acción cis) en 2.5 ml de cóctel de transfección se agregan a cada placa y se distribuyen de manera uniforme. Las transfecciones son basadas en fosfato de calcio como se ha descrito (B. Cullen, Meth Enzymol, 152: 684-704 (1987)). Las células se dejan en esta condición durante 10-14 horas después de que los medios de infección/transfección se reemplazan con 20 ml de DMEM fresco/FBS al 2%. De cuarenta a cincuenta horas después de la transfección, se recolectan las células, se suspenden en regulador Tris-Cl 10 mM (pH 8.0) (0.5 ml/placa de 150 mm) y un lisado preparado por sonicación. El lisado se lleva a cloruro de manganeso 10 mM, después de lo cual se agregaron DNasa pancreática bovina I (20,000 unidades) y RNasa (0.2 mg/ml de concentración final), y la reacción se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se agregó desoxicolato de sodio a una concentración final de 1% y se incubó a 37 °C durante 10 minutos adicionales.

20 El lisado tratado se enfrió en hielo durante 10 minutos y se agregó CsCl sólido a una densidad final de 1.3 g/ml. El lisado se llevó a un volumen final de 60 ml con 1.3 g/ml de solución de CsCl en Tris-Cl 10 mM (pH 8.0) y se dividió en tres alícuotas iguales. Cada muestra de 20 ml se estratificó sobre un gradiente escalonado de CsCl compuesto de dos niveles de 9.0 ml con densidades de 1.45 g/ml y 1.60 g/ml.

25 La centrifugación se realizó a 25,000 rpm en un rotor Beckman SW-28 durante 24 horas a 4 °C.

30 Las fracciones que contenían títulos máximos de virus AV.CMVLacZ funcional se combinaron y se sometieron a tres rondas secuenciales de sedimentación de equilibrio en CsCl. El rotor de selección incluye un Beckman NVT-90 (80,000 rpm durante 4 horas) y SW-41 (35,000 rpm durante 20 horas). En el equilibrio, AV.CMVLacZ aparece como una banda opalescente en 1.40-1.41 g/ml de CsCl. Las densidades se calculan a partir de mediciones del índice de refracción. El vector purificado se intercambió a regulador HEPES 20 mM (pH 7.8) que contiene NaCl 150 mM (HBS) por diálisis y se almacenó congelado a -80 °C en presencia de 10% de glicerol o como una reserva líquida a -20 °C en HBS/40% de glicerol.

35 Virus purificado se prueba para la contaminación de virus auxiliar H5.CBALP y los títulos AV.CMVLacZ. El virus auxiliar es monitorizado mediante tinción histoquímica para la actividad informadora de la fosfatasa alcalina. Una muestra de virus purificado que representa 1.0% del producto final se añade a una monocapa creciente de 293 células sembradas en una placa de 60 mm. Cuarenta y ocho horas más tarde, las células se fijaron en 0.5% de glutaraldehído/solución salina regulada con fosfato (PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron en PBS (3x10 minutos) y se incubaron a 65°C durante 40 minutos para inactivar la actividad de la fosfatasa alcalina endógena. Se deja que la monocapa se enfríe a temperatura ambiente, se enjuaga de nuevo brevemente en Tris-Cl 100 mM (pH 9.5)/ NaCl 100 mM / MgCl 5 mM, y se incuba a 37°C durante 30 minutos en el mismo regulador que contenía 0.33 mg/ml de cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT) y 0.165 mg/ml de sal p toluidina de 5-bromo-4-cloro-3-indolifosfato (BCIP). El desarrollo del color se detiene lavando la monocapa en Tris-Cl 10 mM (pH 8.0)/ EDTA 5 mM. Rutinariamente el esquema de purificación descrito anteriormente elimina todos los virus auxiliares H5.CBALP detectable por la tercera ronda de ultracentrifugación de densidad de flotación.

40 Los títulos de AV.CMVLacZ se miden de acuerdo con el número de copia del genoma (partículas de virus/ml), absorbancia a 260 nm (A_{260} partículas/ml) y Unidades Formadoras LacZ (LFU/ml). Las concentraciones de partículas de virus se basan en la inmunotransferencia Southern. Brevemente, una muestra de AV.CMVLacZ purificado se trató con regulador de digestión de la cápside (Tris-Cl 50 mM, pH 8.0/EDTA 1.0 mM, pH 8.0/0.5% de SDS/proteinasa K 1.0 mg/ml) a 50°C durante una hora para liberar el ADN del virus. Las reacciones se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se añadió colorante de carga y electroforesis a través de 1.2% de un gel de agarosa Cantidades estándar de genoma ds AV.CMVLacZ también se resuelven en el gel.

55 Los ADN son electrotransferidos sobre una membrana de nailon, son hibridizados con un fragmento de restricción cebador aleatorio marcado con 32 P, y la transferencia resultante escaneada en un PhosphorImager 445 SI

(Molecular Dynamics). Una curva estándar se genera a partir de las formas dúplex y se utiliza para extrapolar el número de genomas de virus en la muestra. Los títulos de LFU se generan mediante la infección de células indicadoras con diluciones limitantes de muestra de virus. Células indicadoras incluyen HeLa y 293. Veinticuatro horas más tarde, las células se fijaron en glutaraldehído y las células se tiñeron histoquímicamente para actividad β-galactosidasa de E. coli (LacZ) como se describe en JM Wilson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 85:3014-3018 (1988). Una LFU se describe como la cantidad de virus que es suficiente para provocar la expresión detectable visualmente de β-galactosidasa en una célula 24 horas después de la infección.

Inducción de la expresión de ORF6

La inducción de la expresión de ORF6 con dexametasona 10 μM o sulfato de zinc 150 μM (para control negativo, sin inductor utilizado) se inicia 2 horas antes de la adición de virus y continua durante toda la duración del experimento. Veinticuatro horas después de la adición del virus, las células se recolectan, los lisados se generan por sonicación y se analizan para la expresión de β-galactosidasa (esto es, la actividad de β-galactosidasa) y ADN del virus como se describe anteriormente. Extractos Hirt se preparan para el ADN de bajo peso molecular a partir de extractos de células. La preparación de los extractos de Hirt y subsecuente análisis mediante hibridación Southern se realizan recurriendo a procedimientos convencionales conocidos para un experto en la técnica.

En ausencia de los inductores, las líneas celulares de empaque generan niveles inferiores de β-galactosidasa en las células infectadas de rAAV. La inducción de la expresión de ORF6 con los resultados de dexametasona inductor en un aumento concomitante en la transducción de células AV.CMV LacZ a un nivel que es mucho mayor que la línea 293 progenitora. La expresión de E1 sola es insuficiente para tener un efecto en el aumento mediado de adenovirus de la transducción de rAAV.

Localización de Inmunofluorescencia de proteína tardía de Ad5

Los clones positivos del ensayo están infectadas con el adenovirus eliminado E4 recombinante E4 H5DI11004 y seleccionado para complementación de E4 usando un ensayo de inmunofluorescencia para la expresión génica tardía. El virus H5I1004 se obtuvo del Dr. Ketner de la Universidad Johns Hopkins y se describe en Bridge y Ketner, J. Virol, 632 (2): 631-638 (Feb. 1989), incorporado aquí como referencia. Debido a ORF6 de E4 complementa la expresión del gen posterior Ad, específicamente en la formación de las fibras hexón y pentónicas del adenovirus, las líneas celulares que contienen ORF6 son capaces de unirse con el anticuerpo contra estas proteínas.

Cada línea celular es infectada con el virus H5d11004 de virus eliminado E4 en un MOI de 0.1. Las células se tratan con el anticuerpo monoclonal marcado con FITC de antiadenovirus de ratón ya sea para las fibras hexón o pentona en una dilución 1:10 (Chemicon International Inc., Temecula, CA). Los clones positivos se identifican mediante la reacción con el anticuerpo.

Eficiencia relativa de formación de placas

Las líneas celulares que demuestran fuerte capacidad de complementación son seleccionados para la eficiencia relativa de formación de placas de H5d11004 en comparación con células W162 (una línea celular Vero que complementa E5 que no expresa E1) (Weinberg y Ketner, Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 80 (17): 5.383-5.386 (1.983)). Se determinan los % de RPE, esto es, la eficiencia relativa de formación de placas, lo que representa el título de H5d11004 en líneas/títulos celulares ensayados de H5d11004 sobre células W162. Por ejemplo, el RPE de las células 293 es 0.

Las líneas celulares positivas seleccionados por todos los criterios se identifican en la Tabla I a continuación, con los resultados de los ensayos.

TABLA I

| Líneas celulares doblemente complementarias E1/E4 | | | | | |
|---------------------------------------------------|-----------|----------|-------|-------------|----------|
| Línea celular | Trans-Gen | Promotor | IF/LP | AV.CMV LacZ | % de RPE |
| 293-10-3 | ORF6 | MT | ++++ | ++++ | 246 |
| 293-39-11 | ORF6 | LTR | ++++ | ++++ | 52 |
| 293-84-31 | E4- | LTR | ++++ | ++++ | 179 |
| 293-12-31 | E4 entero | LTR +E4 | ++++ | ++++ | 174 |
| 293-27-6 | ORF6 | MMTV | | +++++ | 327 |

| Líneas celulares doblemente complementarias E1/E4 | | | | | |
|---------------------------------------------------|-----------|----------|-------|-------------|----------|
| Línea celular | Trans-Gen | Promotor | IF/LP | AV.CMV LacZ | % de RPE |
| 293-27-17 | ORF6 | MMTV | | ++++ | 313 |
| 293-27-18 | ORF6 | MMTV | | ++++ | 339 |
| 293-27-28 | ORF6 | MMTV | | ++++ | 261 |

Construcción y purificación de H5.001 CBLacZ

- 5 El pAd.CBLacZ plásmido se construye como se describe en detalle en K. Kozarsky et al., Som. Cell Mol. Genet., 19 (5): 449 a 458 (1993), incorporado aquí como referencia. Este plásmido contiene un minigen que comprende sitio de restricción NheI de franqueo 5', seguido por secuencia Ad5 m.u. 0-1, seguida por una eliminación de E1 en la que se inserta una secuencia potenciadora de CMV/promotora de la acción β de pollo (TA Kost et al, Nucl Acids Res, 11 (23): 8287 (1983)), que controla la transcripción de la siguiente β -galactosidasa bacteriana, seguido por una secuencia poli A y flanqueado en dirección 3' por Ad mu 9.16, y otro sitio NheI. En el plásmido, el minigen está flanqueado en ambos lados por secuencia de plásmido que contiene marcadores de resistencia a fármacos.
- 10 El plásmido pAd.CBLacZ se linealiza con NheI y cotransfectado por el método de cotransfección con fosfato de calcio en la novedosa línea celular de empaquetamiento con H5dl1004 digerido con ClaI (una secuencia de Ad5 eliminada desde aproximadamente la unidad de mapa 92.1 hasta la unidad de mapa 98, que corresponde a sustancialmente todo el gen E4).
- 15 La recombinación homóloga se produce en la línea celular entre estos dos constructos virales entre las unidades de mapa Ad 9-16, dando como resultado adenovirus recombinante, designado H5.001CBLacZ. Este adenovirus recombinante contiene la secuencia desde aproximadamente el nucleótido 1 hasta aproximadamente 4628 de pAd.CBLacZ y las unidades de mapa Ad5 9-92.1 y 97.3 a 100 del H5dl1004. Este adenovirus recombinante es eliminado por lo tanto funcionalmente, y sustancialmente eliminado estructuralmente, de los genes Ad E1 y E4.
- 20 Se seleccionaron placas virales y se seleccionaron mediante el ensayo de β -galactosidasa y H5.001CBLacZ se aisló después de tres rondas de purificación en placa. El virus purificado también se somete a centrifugación en densidad de cloruro de cesio y producción a gran escala. Para los siguientes experimentos con ratones, virus se utiliza después de purificación en columna y se agrega glicerol a una concentración final de 10% (v/v). El virus se almacena a -70°C hasta su uso.
- Cinética de crecimiento de H5.001 CBLacZ en líneas celulares de empaquetamiento
- 25 Las líneas celulares descritas anteriormente son infectadas con H5.001 CBLacZ recombinante a una MOI de 0.5. El rendimiento viral máximo se reporta como LFU/ml en la Tabla II a continuación.

| Línea celular | Viral máximo |
|---------------|----------------------|
| 293-10-3 | 2.8×10^{10} |
| 293-39-11 | 9.5×10^8 |
| 293-84-31 | 1.1×10^9 |
| 293-12-31 | 4.5×10^8 |
| 293-27-6 | 2.8×10^{10} |
| 293-27-17 | 2.5×10^{10} |
| 293-27-18 | 2.9×10^{10} |
| 293-27-28 | 1.2×10^{10} |

- 30 Cuando se cultiva en células 293-27-18 (la línea celular ORF6 E4 con promotor MMTV inducible por dexametasona) el rendimiento máximo de este virus es 2.9×10^{10} LFU/ml. Varias de las líneas celulares se hacen pasar entre 5 y 20 veces y la producción viral de los pasos se mantuvo estable. Sin embargo, la RPE disminuyó después de pasos repetidos de células.

Constructos génicos de acuerdo con la invención se insertan en lugar de las secuencias lacZ en una secuencia de enlazamiento en el plásmido.

Ejemplo 8

Antecedentes:

- 5 Se han encontrado anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-p185^{neu} para inhibir el crecimiento de tumores que expresan p185^{neu} de una manera dependiente de la dosis in vitro e in vivo. Las combinaciones de reactivos mAbs anti-p185^{neu} con distintos dominios epítomos revelaron un efecto inhibitorio sinérgico sobre sobreexpresión de neu de tumores in vivo. Estos estudios demostraron el potencial de las terapias específicas de oncoproteínas basadas en mAb.
- 10 La estructura tridimensional de los complejos antígeno-anticuerpo revela que el sitio de enlazamiento se define por 6 estructuras de bucle de regiones que determinan la complementariedad (CDRs) hipervariable (Peterson y Greene, 1994), pero la especificidad de las interacciones es conferida por los bucles de CDR3. El prerrequisito de la conformación y la estructura de bucles de CDR puede ser imitado por pequeños péptidos cuando se conocen la secuencia y la estructura de los anticuerpos antirreceptor.
- 15 La inhibición del crecimiento celular y la transformación se pueden conseguir en las células gliales transformadas mediante la modulación de la señalización del receptor erbB. Estudios recientes realizados por los inventores indican que la inducción de la apoptosis puede ser la base del éxito de la terapia de los cánceres humanos. Células de glioblastoma humano resistentes a radiación en las que la señalización de receptor erbB fue inhibida por la transfección de neu T691 truncado, exhibieron una mayor detención del crecimiento y apoptosis en respuesta al daño del ADN. La inhibición de la señalización de erbB es un potente estímulo para la inducción de apoptosis. Interacciones del receptor proximales entre los miembros de los receptores erbB por lo tanto influyen en las rutas del punto de control del ciclo celular activadas en respuesta al daño del ADN. Por lo tanto, la desactivación de los receptores erbB puede mejorar la respuesta a la irradiación gamma y otras terapias citotóxicas.
- 20 Los datos sugieren que las células tumorales humanas resistentes a la radiación que necesitan ruta completa de señalización de erbB, pueden convertirse para ser sensibles a la radiación y estar en ruta apoptótica para cualquier daño en el ADN por la inhibición de la ruta de señalización de erbB.
- 25 Los datos sugieren que las células tumorales humanas resistentes a la radiación que necesitan ruta completa de señalización de erbB, pueden convertirse para ser sensibles a la radiación y estar en ruta apoptótica para cualquier daño en el ADN por la inhibición de la ruta de señalización de erbB.

Anti-p185^{c-erbB-2} mimético, CDR4D5 fue diseñado y desarrollado y utilizado para investigar si CDR4D5 mimético derivado de Ab anti-p185^{c-erbB-2} puede inhibir la proliferación de células tumorales humanas y potenciar la apoptosis después de la irradiación gamma. Los experimentos llevados a cabo se describen a continuación.

- 30 Material and método 1.

Diseño peptidomimético:

El anticuerpo anti-erbB2, 4D5 ha demostrado ser efectivo en la submodulación del receptor erbB2. Se analiza la estructura cristalina del anticuerpo humanizado (1FVD). La CDR3 de 4D5 se utilizó como una plantilla. Se generaron varios análogos de péptidos cíclicos. Los péptidos que se pueden usar incluyen.

- 35 SEQ ID NO: 1 FCGDGFYACYMDV-CONH2
- SEQ ID NO: 2 FCDGFYACYMDV-CONH2
- SEQ ID NO: 3 FCDPFYACYMDV-CONH2
- SEQ ID NO: 4 FCPDGFYACYMDV-CONH2
- SEQ ID NO: 5 FCDPPFYACYMDV-CONH2
- 40 SEQ ID NO: 6 FCDGFYACYMDV-CONH2
- SEQ ID NO: 7 FCDPFYACYMDV-CONH2
- SEQ ID NO: 8 FCDPPFYACYMDV-CONH2
- SEQ ID NO: 9 FCGDGFYACYMDV-COOH
- SEQ ID NO: 10 FCDGFYACYMDV-COOH
- 45 SEQ ID NO: 11 FCDPFYACYMDV-COOH

SEQ ID NO: 12 FCPDGFYACYMDV-COOH

SEQ ID NO: 13 FCDPPFYACYMDV-COOH

SEQ ID NO: 14 FCDGFYACYMDV-COOH

SEQ ID NO: 15 FCDPFYACYMDV-COOH

5 SEQ ID NO: 16 FCDPPFYACYMDV-COOH

2. Líneas celulares:

Se utilizaron las siguientes líneas de células tumorales humanas que expresan niveles variables del receptor p185^{c-erbB-2}: a) U87MG (p185^{c-erbB-2} indetectable), b) U373MG progenitor y U373/T691 transfectada de T691 que expresan p185^{c-erbB-2} baja moderada, c) MCF7 que expresa p185^{c-erbB-2} y SKBR3 moderadas (alto nivel de p185^{c-erbB-2}).

10 3. Análisis citométrico de flujo de expresión del receptor c-erbB-2 de superficie.

Células subconfluentes fueron recolectadas por tratamiento rápido con tripsina (<3 min), y se mantuvieron en hielo. Las células se lavaron y se resuspendieron en regulador FACS (PBS con 0.5% de BSA y 0.1% de NaAzide) a una concentración de aproximadamente 2×10^6 células/ml, luego se incubaron con los reactivos primarios (Ab anti-p185^{c-erbB-2}) y los reactivos secundarios (anti-IgG-FITC) durante 30 min cada uno a 4 °C, con 2 lavados entre cada etapa.

15 Después de la tinción, las células se resuspendieron en regulador FACS y se analizaron inmediatamente. El Análisis de Citometría de Flujo se realizó en un Becton Dickinson FACScan. Las líneas celulares p185^{c-erbB-2} positivas se determinaron por la diferencia en la fluorescencia de canal medio entre líneas de células teñidas con anticuerpo antirreceptor y las líneas celulares correspondientes teñidas con los reactivos secundario solos (anti-IgG-FITC). La homogeneidad de los clones positivos de p185^{c-erbB-2} fue determinada por el pico de la población de células teñidas positivamente alrededor de su eje. En los histogramas de FACS, el aumento de la fluorescencia se indica mediante un desplazamiento a la derecha del pico positivo, lejos del pico de fondo. La mayor expresión del receptor se correlacionó con el grado de desplazamiento. Se estiman el número de receptores relativos en cada tipo de célula comparando la intensidad media de fluorescencia con la de las células con números de copias de receptores conocidos.

25 4. Ensayo de proliferación celular.

Ensayo de proliferación medido por incorporación de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. Las líneas celulares se sembraron en placas de 96 pozos (5,000 células/pozo) en 10% de DMEM con la cantidad indicada de CDR4D5 mimético y se incubaron durante 48 horas. MTT se le dio a las células durante 4 horas. Las células se sometieron a lisis en 50% de SDS/20% de dimetil sulfóxido y se mantuvieron a 37°C durante la noche. La proliferación se estableció mediante la adopción de la lectura de la densidad óptica a 570 nm, usando un lector de ELISA. El número de células utilizadas en este ensayo se determinó para estar dentro del rango lineal para este tipo de células. 5. Efecto de la radiosensibilización del CDR4D5 mimético anti-p185^{c-erbB-2} como se determina por análisis morfológico de apoptosis.

30,000 células se dejaron unir a portaobjetos durante la noche en placas de 6 pozos. Las células se incubaron con 50 µg/ml de CDR4D5 mimético durante 48 horas antes de la irradiación. 10 Gy de la irradiación fue dada y las células se incubaron a 37°C. Se estableció la morfología nuclear en los siguientes puntos de tiempo: 12, 24, 48 y 72 horas después de la irradiación. Los portaobjetos se lavaron dos veces con PBS en los tiempos indicados, y se fijaron en mezcla 50:50 de metanol enfriado con hielo/acetona durante 1 minuto. Las células fijadas fueron posteriormente teñidas con 4', 6'-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato hidratado (DAPI) (Sigma, St. Louis, MO) a una concentración de 0.25 ng/ml en PBS y el establecimiento morfológico de núcleos apoptóticos se determinó utilizando conteo directo. La consistencia entre observadores en el recuento de la apoptosis se confirmó con tinción para marcación terminal en muesca de dUTP mediada por desoxinucleotidil transferasa (TUNEL) y mediante el análisis de tres observadores independientes.

45 Los recuentos de células se llevaron a cabo dentro de los 30 minutos de la tinción y las fotografías fueron tomadas en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioplan. Al menos tres campos independientes de 100 células fueron contadas para cada muestra.

Resultados

1. Expresión del receptor c-erbB-2 de superficie

50 Se utilizó el análisis de citometría de flujo para determinar la expresión del receptor p185^{c-erbB-2} de superficie en células tumorales humanas. La expresión del receptor c-erbB-2 de superficie fue más alta en SKBR3, moderada en

MCF7, baja moderada en U373MG, e indetectable en U87MG. La fluorescencia media de la SKBR3 fue 50 veces del control y la de MCF7, U373MG y U87MG fueron 6.5, 2, y 1 veces del control, respectivamente.

2. Inhibición de la proliferación.

5 El tratamiento con CDR4D5 inhibió la proliferación de células tumorales en una forma dependiente de la dosis y de forma inversamente proporcional a la densidad del receptor p185^{c-erbB-2} de superficie. CDR4D5 no inhibió la proliferación de c-erbB-2 que no expresa U373MG progenitor y U373/T691 se inhibió 62% con 1 µg de CDR4D5 mimético. La proliferación de células MCF7 y SKBR3 se inhibió 43%-53%, y 39%-49%, respectivamente, de una manera dependiente de la dosis (Figura 5). 3. Efecto de radiosensibilización del CDR4D5 mimético antip185^{c-erbB-2}.

10 La apoptosis fue máxima a las 72 horas después de la radiación en todas las células. El tratamiento con CDR4D5 mimético en células U373MG dio como resultado 20- 28% más de apoptosis que las células U373MG no tratadas a las 48 h y 72 h después de la radiación. El efecto del tratamiento con CFR4D5 sobre la apoptosis en las células U373MG fue comparable con el resultado con neu truncado, un mutante de receptor inhibidor que desactiva la señalización de erbB e induce la apoptosis incrementada en respuesta a la radiación (Figura 6A). Se observó un efecto radiosensibilizador significativa de CDR4D5 72 horas después de la radiación en líneas celulares MCF7 y SKBR3 así (Figura 6B). Dado que la sensibilidad a la muerte celular apoptótica se correlacionó de forma inversa con los niveles del receptor p185^{c-erbB-2} de superficie que incrementan la cantidad de CDR4D5 de acuerdo con la cantidad de la expresión del receptor c-erbB-2 de superficie, se debería mejorar el efecto.

15 Este 4D5 mimético es de aproximadamente 1.5KD de tamaño pequeño, péptido, resistente a la proteasa que es específico para el receptor p185^{c-erbB-2} humano y es menos inmunogénico que los anticuerpos de longitud completa. El 4D5 mimético ilustra el uso de miméticos antirreceptores en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, produciendo efectos sinérgicos los cuales se combinan con agentes terapéuticos citotóxicos tales como irradiación gamma.

Listado de secuencias

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> Composiciones y métodos de tratamiento de tumores

25 <130> upn3570

<140>

<141>

<150> 60/076,788 <151> 1998-03-04

<150> 09/111,681 <151> 1998-07-08

30 <160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)

<223> AMIDACIÓN

40 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia Novedosa

ES 2 551 932 T3

<400> 1

Phe Cys Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val
1 5 10

<210> 2

<211> 12

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)

10 <223> AMIDACIÓN

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia Novedosa

<400> 2

Phe Cys Asp Gly Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val
1 5 10

15 <210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <221> MOD_RES

<222> (12)

<223> AMIDACIÓN

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia Novedosa

25 <400> 3

Phe Cys Asp Pro Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val
1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)

5 <223> AMIDACIÓN

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia Novedosa

<400> 4

Phe Cys Pro Asp Gly Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val
 1 5 10

10 <210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <221> MOD_RES

<222> (13)

<223> AMIDACIÓN

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia Novedosa

20 <400> 5

Phe Cys Asp Pro Pro Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val
 1 5 10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)

<223> AMIDACIÓN

30 <220>

ES 2 551 932 T3

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia Novedosa

<400> 6

Phe Cys Asp Gly Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val
1 5 10

<210> 7

5 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (12)

<223> AMIDACIÓN

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia Novedosa

<400> 7

Phe Cys Asp Pro Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val

1 5 10

15

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<221> MOD_RES

<222> (13)

<223> AMIDACIÓN

<220>

25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia Novedosa

<400> 8

Phe Cys Asp Pro Pro Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val
1 5 10

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia Novedosa

<400> 9

```
Phe Cys Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val
      1             5             10
```

<210> 10

10 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia Novedosa

15 <400> 10

```
Phe Cys Asp Gly Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val
      1             5             10
```

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia Novedosa

<400> 11

```
Phe Cys Asp Pro Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val
      1             5             10
```

25 <210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 551 932 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia Novedosa

<400> 12

Phe Cys Pro Asp Gly Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val
1 5 10

5 <210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia Novedosa

<400> 13

Phe Cys Asp Pro Pro Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val
1 5 10

<210> 14

<211> 12

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia Novedosa

<400> 14

Phe Cys Asp Gly Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val

1 5 10

20

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia Novedosa

ES 2 551 932 T3

<400>15

Phe Cys Asp Pro Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val
1 5 10

<210> 16

<211> 13

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia Novedosa

<400> 16

Phe Cys Asp Pro Pro Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val
1 5 10

10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo para uso en el tratamiento de un individuo con un tumor mediado por erbB, para administrar a dicho individuo en combinación con radiación anticáncer,
- en donde el tumor se caracteriza por
- 5 a) homodímeros erbB que son homodímeros de EGFR mutantes u homodímeros de p185 y/o
- b) heterodímeros de erbB que son heterodímeros de p185/EGFR, heterodímeros de p185/EGFR mutantes, heterodímeros de p185/erbB3, heterodímeros de p185/erb4 o heterodímeros de EGFR/EGFR mutante,
- en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-p185 humanizado o fragmento del mismo o un anticuerpo anti-EGFR humanizado, o fragmento del mismo,
- 10 y en donde el anticuerpo o fragmento de la mismo interrumpe la actividad de quinasa asociada con los dímeros y hace sensibles a la radiación, las células tumorales previamente resistentes a la radiación.
2. El anticuerpo para uso en el tratamiento de la reivindicación 1, en donde el tumor mediado por erbB es mediado por p185.
- 15 3. El anticuerpo para uso en el tratamiento de la reivindicación 2, en donde el p185 se dimeriza con erbB3, erbB4, EGFR humano, o EGFR mutante humano.
4. El anticuerpo para uso en el tratamiento de la reivindicación 2, en donde el tumor está asociado con carcinoma de pulmón, de páncreas, de seno o de ovario.
5. El anticuerpo para uso en el tratamiento de la reivindicación 1, que inhibe la formación de los dímeros erbB.
- 20 6. El anticuerpo para uso en el tratamiento de la reivindicación 1 que es un anticuerpo anti-p185 humanizado o fragmento del mismo.
7. El anticuerpo para uso en el tratamiento de la reivindicación 1 que es un anticuerpo anti-EGFR humanizado o fragmento del mismo.
8. El anticuerpo para uso en el tratamiento de la reivindicación 1 en donde la terapia de radiación se inicia una vez que el anticuerpo ha interrumpido la actividad de quinasa asociada con los dímeros.

25

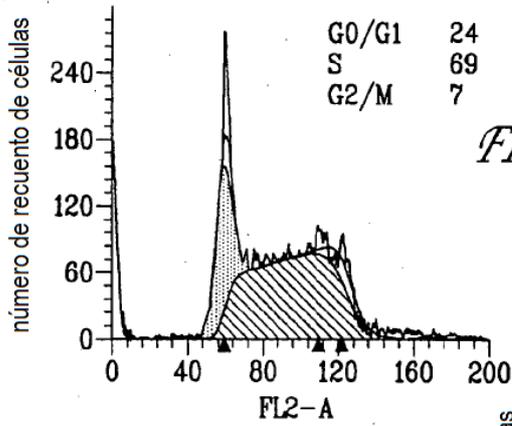


FIG. 1A

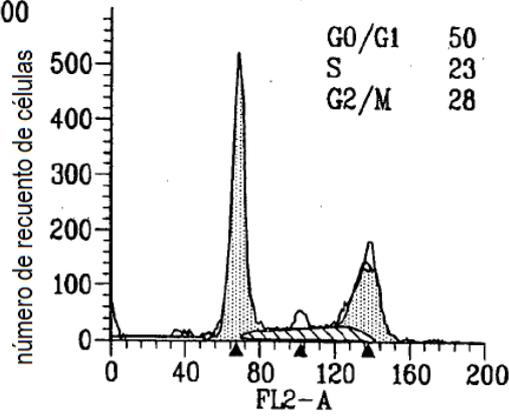


FIG. 1B

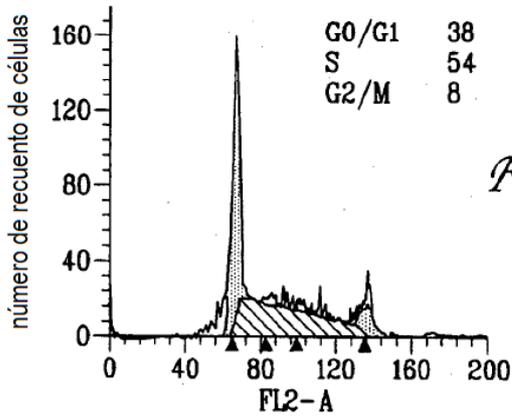


FIG. 1C

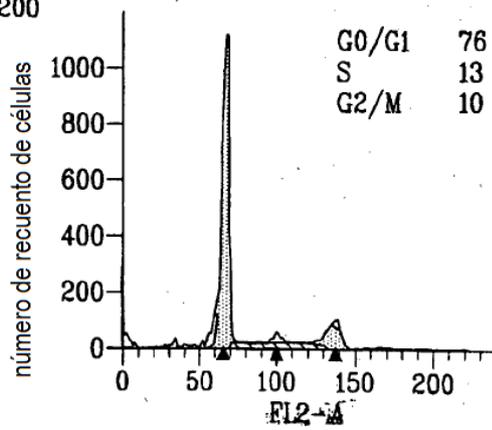


FIG. 1D

FIG. 2A

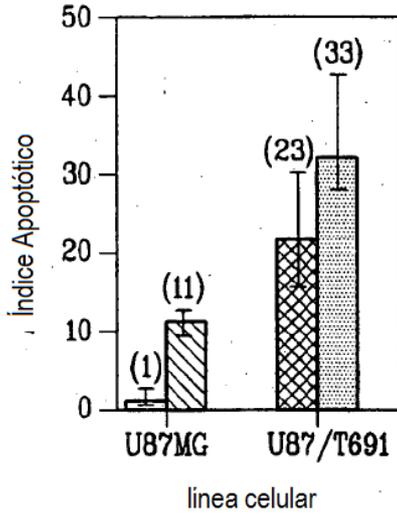


FIG. 2B

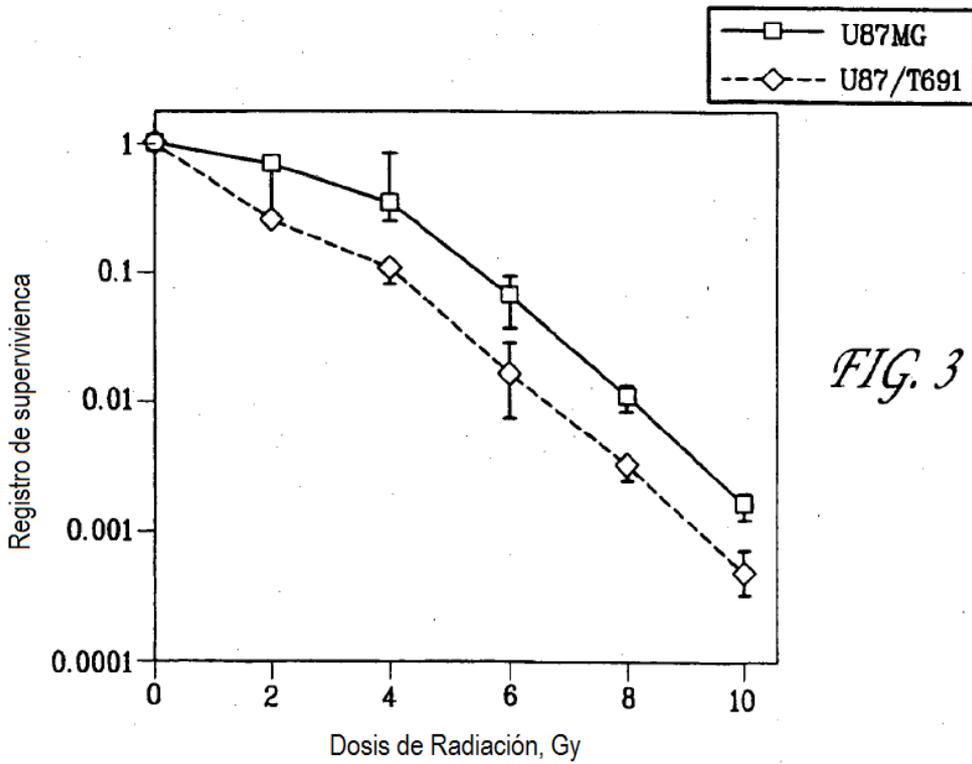
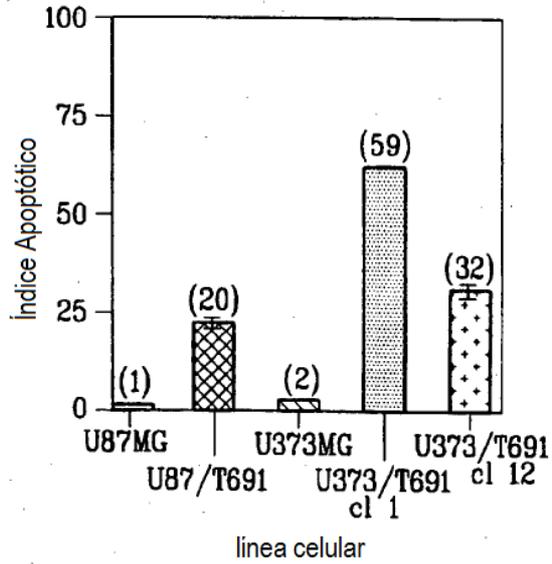


FIG. 3

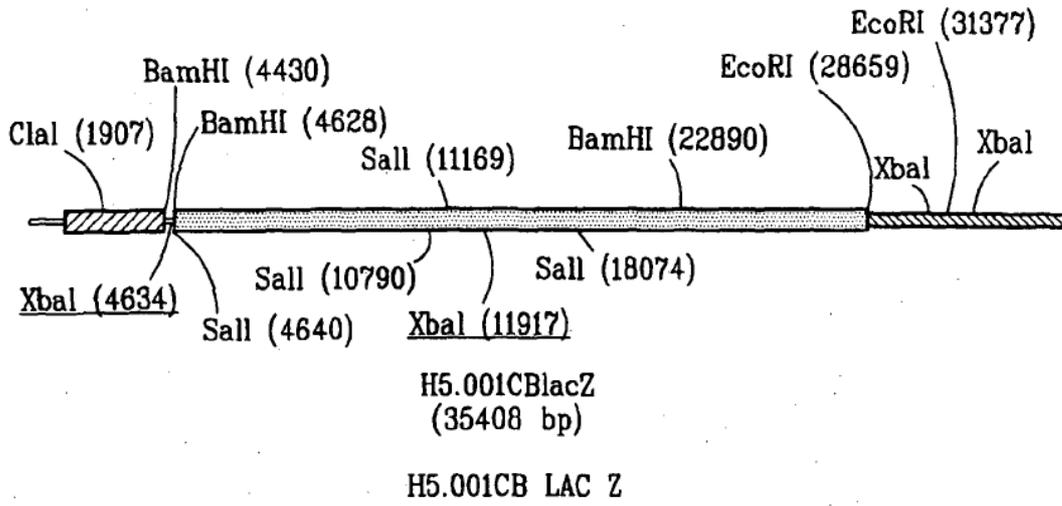


FIG. 4

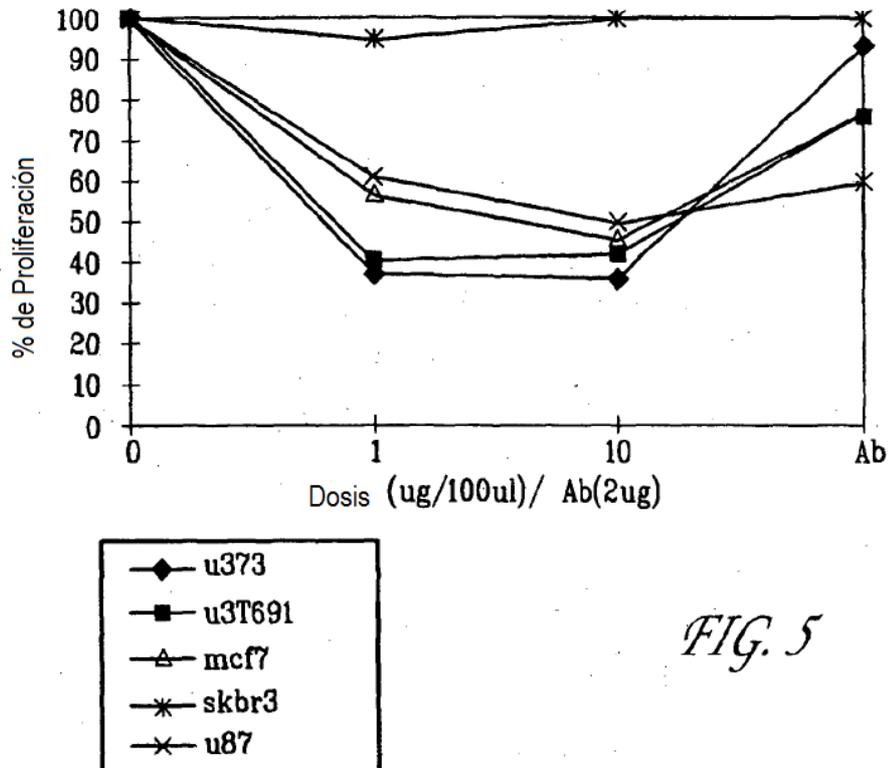


FIG. 5

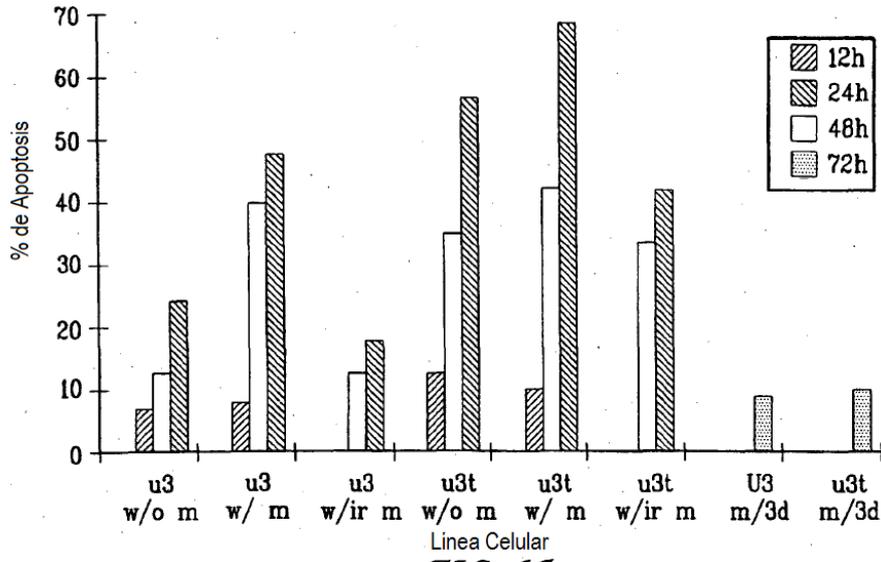


FIG. 6A

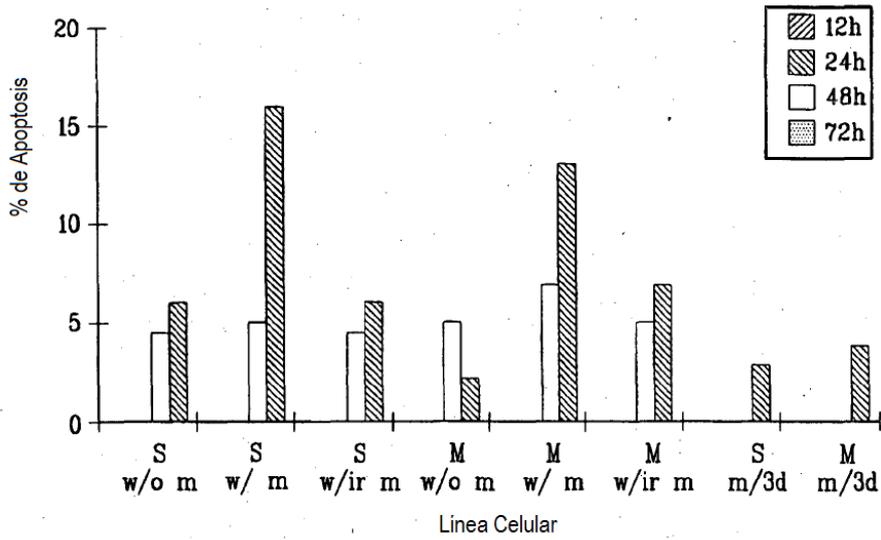


FIG. 6B