



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 270 586**

⑮ Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **99908641 .6**

⑯ Fecha de presentación : **04.03.1999**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1058562**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2000**

⑭ Título: **Compuestos y métodos para el tratamiento de tumores.**

⑩ Prioridad: **04.03.1998 US 76788 P**
08.07.1998 US 111681

⑬ Titular/es:
The Trustees of the University of Pennsylvania
3700 Market Street, Suite 300
Philadelphia, Pennsylvania 19104, US

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

⑭ Inventor/es: **Greene, Mark, I.;**
O'Rourke, Donald, M.;
Murali, Ramachandran y
Park, Byeong-Woo

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

⑭ Agente: **Durán Moya, Carlos**

ES 2 270 586 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

Compuestos y métodos para el tratamiento de tumores.

5 **Sector técnico al que pertenece la invención**

La presente invención se refiere a proteínas que carecen de actividad de tirosina cinasa y que dimerizan con miembros de la familia *erbB* de receptores; a moléculas de ácido nucleico que codifican dichas proteínas; a compuestos farmacéuticos que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico en combinación con vehículos portadores que facilitan la transferencia de la molécula de ácido nucleico a una célula; y a la utilización de dicho compuesto farmacéutico en la fabricación de un medicamento para prevenir tumores y tratar individuos que tienen tumores. La presente invención se refiere a compuestos que son útiles para convertir células tumorales resistentes a radiaciones y/o muerte celular inducida químicamente en células que son sensibles a la radiación.

15 La presente invención se refiere a la utilización de dichos compuestos en la fabricación de un medicamento a administrar en combinación con radiación y/o quimioterapia, para tratar individuos que tienen tumores.

Antecedentes de la invención

20 La familia *erbB* de receptores comprende *erbB* (EGFR), *erbB2* (p 185), *erbB3* y *erbB4*. Ullrich, y otros (1984) *Nature* 309, 418-425, que se incorpora a esta descripción a título de referencia, describe EGFR. Schechter, A.L., y otros (1984) *Nature* 312, 513-516, y Yamamoto, T., y otros (1986) *Nature* 319, 230-234, describe p185neu/*erbB2*. Kraus, M.H., y otros (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9193-9197 describe *erbB3*. Plowman, G.D., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1746-1750, describe *erbB4*.

25 El proto-oncogénico celular de rata *c-neu* y su correspondiente humano *c-erbB2* codifica glicoproteínas de membrana de 185 kDa designadas p185. La actividad de tirosina cinasa (tk) ha sido relacionada a la expresión del fenotipo transformante del p185 oncogénico (Bargmann y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 5394; y Stem y otros, *Mol. Cell. Biol.*, 1988, 8, 3969. El *neu* oncogénico fue inicialmente identificado en neuroglioblastomas de rata (Schechtler y otros, *Nature*, 1984, 312, 513 y se encontró que se activaba por una mutación de punto inducida por carcinógeno generando una única sustitución de aminoácido, una sustitución Val a Glu en la posición 664, en la región de transmembrana de la proteína transformante (Bargmann y otros, *Cell*, 1986, 45, 649). Esta alteración tiene como resultado una actividad constitutiva de su cinasa intrínseca y en transformación maligna de células (Bargmann y otros, *EMBO J.*, 1988, 7, 2043). La activación de la tirosina cinasa de la proteína p185 se muestra relacionada a un desplazamiento en el equilibrio molecular de formas monómeras a dímeras (Weiner y otros, *Nature*, 1989, 339, 230).

30 La sobreexpresión de *c-neu* o *c-erbB2* a niveles 100 veces mayores de lo normal (es decir, $>10^6$ receptores/célula) resulta también en la transformación de células NIH3T3 (Chazin y otros, *Oncogene*, 1992, 7, 1859; DiFiore y otros, *Science*, 1987, 237, 178; y DiMarco y otros, *Mol. Cell. Biol.*, 1990, 10, 3247). No obstante, las células NIH3T3 o las células NR6 que expresan p185 celular a nivel de 10^5 receptores/célula no se transforma (Hung y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 2545; y Kokai y otros, *Cell*, 1989, 58, 287), excepto que se coexpresen con el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), una tirosina cinasa homóloga (Kokai y otros, *Cell*, 1989, 58, 287). Por lo tanto, la p185 y la p185 oncogénica pueden resultar ambas en la transformación de células.

40 45 La p185 celular es altamente homóloga con EGFR (Schechter y otros, *Nature*, 1984, 312, 513; y Yamamoto, y otros, *Nature*, 1986, 319, 230) pero, no obstante, es distinta. Numerosos estudios indican que EGFR y la p185 celular son capaces de interaccionar (Stern y otros, *Mol. Cell. Biol.*, 1988, 8, 3969; King y otros, *EMBO J.*, 1988, 7, 1647; Kokai y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 5389; y Dougall y otros, *J. Cell. Biochem.*, 1993, 53, 61). La asociación intermolecular de EGFR y p185 celular muestra sobreregular la función EGFR (Wada y otros, *Cell*, 1990, 61, 1339). Además, se pueden detectar heterodímeros que forman complejos de cinasa activos tanto *in vivo* como *in vitro* (Qian y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 1330).

50 55 De manera similar, se ha informado de interacciones de p185 con otros miembros de la familia *erbB* (Carraway y otros, *Cell* 1994, 78, 5-8; Alroy y otros, *FEBS Lett.* 1997, 410, 83-86; Riese y otros, *Mol. Cell. Biol.* 1995, 15, 5770-5776; Tzahar y otros, *EMBO J.* 1997, 16, 4938-4950; Surden y otros, *Neuron* 1997, 18, 847-855; Pinkas-Kramarski y otros, *Oncogene* 1997, 15, 2803-2815). La p185 humana forma heterodímeros con cualquiera de *erbB3* o *erbB4* en condiciones fisiológicas, principalmente en los músculos cardíacos y en el sistema nervioso, particularmente en desarrollo.

60 65 Las proteínas celulares p185 se encuentran en células epiteliales secretoras de adultos del pulmón, glándula salival, senos, páncreas, ovarios, conducto gastrointestinal, y piel (Kokai y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 8498; Mori y otros, *Lab. Invest.*, 1989, 61, 93; y Press y otros, *Oncogene*, 1990, 5, 953). Estudios recientes han demostrado que la amplificación de *c-erbB2* tiene lugar con mucha frecuencia en una serie de adenocarcinomas humanos tales como adenocarcinoma gástrico (Akiyama y otros, *Science*, 1986, 232, 1644), de pulmón (Kern y otros, *Cancer Res.*, 1990, 50, 5184) y adenocarcinomas pancreáticos (Williams y otros, *Pathobiol.* 1991, 59, 46). También se ha informado de que la expresión incrementada *c-erbB2* en un subconjunto de carcinomas de seno y ovario está relacionada a un pronóstico clínico poco optimista (Slamon y otros, *Science*, 1987, 235, 177; y Slamon y otros, *Science*, 1989, 244, 707).

La asociación heterodímera de EGFR y p185 también se ha detectado en líneas celulares de cáncer de seno humano, tales como SK-Br-3 (Goldman y otros, *Biochemistry*, 1990, 29, 11024), y células transfectadas (Spivak-Kroizman y otros, *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 8056). De manera adicional, se ha informado de casos de coexpresión de erbB2 y EGFR en cánceres de seno y de próstata. Además, la asociación heterodímera de p185 y erbB3, así como la asociación heterodímera de p185 y erbB4 también se han detectado en cánceres humanos. La coexpresión de erbB2 y erbB3 ha sido observada en cánceres de seno humano. La coexpresión de EGFR, erbB2 y erbB3 se ha observado en carcinoma de próstata.

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

La amplificación de EGFr puede ser asociada con transcriptos de EGFr aberrantes junto con transcriptos EGFr normales (Sugawa, y otros *Supra*). La frecuente amplificación y subsiguiente alteración estructural sugiere que el EGFr puede ser importante para el mantenimiento del fenotipo de glioma maligno. Un EGFr mutante frecuentemente observado ha sido identificado en un subconjunto de glioblastomas humanos y resulta de un truncado en marco de 801 pb (correspondientes a los exones 2-7) en el dominio extracelular del receptor (Sugawa, y otros *Supra*; Malden y otros, (1988) *Cancer Res.* 48:2711-2714; Humphrey, y otros (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:4207-4211; Wong, y otros (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:2965-2969), que se cree que resulta en activación de la cinasa constitutiva y que puede también afectar a características de unión de ligando de la molécula (Nishikawa, y otros *Supra*; Callaghan, y otros (1993) *Oncogene* 8:2939-2948).

Las mutaciones observadas de EGFr en afecciones malignas epiteliales humanas consisten en la sobreexpresión con o sin amplificación y, de manera menos común, en alteraciones de secuencia de codificación. La transformación oncogénica provocada por mutantes de EGFr parecen ser específicos de tejidos y se han observado en leucemia eritroide, fibrosarcoma, angiosarcoma, melanoma, y también glioblastoma (Carter, y otros (1994) *Crit Rev Oncogenesis* 5: 389-428). La sobreexpresión del EGFr normal puede provocar transformación oncogénica en ciertos casos, probablemente de manera dependiente de EGF (Carter, y otros *Supra*; Haley, y otros (1989) *Oncogene* 4: 273-283). El transfectado de grandes cantidades de EGFr de tipo salvaje en células NIH3T3 tiene como resultado una transformación dependiente de ligando pero incompleta (Yamazaki, y otros (1990) *Jpn. J. Cancer Res.* 81:773-779). La sobreexpresión puede provocar regulación de ciclo celular alterado de la EGFr cinasa, y puede contribuir al estado transformado, tal como ha sido observado para p185neu oncogénica (Kiyokawa, y otros (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:1092-1096).

Existe la necesidad de compuestos terapéuticos útiles para tratar individuos identificados por tener tumores mediados por erbB. Existe la necesidad de desarrollar compuestos profilácticos para individuos susceptibles de desarrollar tumores mediados por erbB. Existe la necesidad de métodos para el tratamiento de individuos identificados como teniendo tumores mediados por erbB. Existe la necesidad de métodos para prevenir individuos que son susceptibles de desarrollar tumores mediados por erbB que desarrollen dichos tumores.

45 Características de la invención

La presente invención se refiere a la utilización de compuestos que alteran e inhiben la actividad de cinasa asociada a erbB en células de tumores en la fabricación de un medicamento a administrar en combinación con radiación de un agente citotóxico para tratar un individuo afectado de un tumor, tal como se indica en las reivindicaciones 1-23.

La presente invención se refiere a la utilización de un compuesto que inhibe la formación de dímeros de la proteína de erbB, que producen elevada actividad de tirosina cinasa en las células de un tumor en la fabricación de un medicamento a administrar en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de tratamiento de radiación anticáncer de un individuo que tiene un tumor mediado por la proteína erbB. En algunas realizaciones, el tumor mediado por la proteína erbB es un tumor mediado por p185. En algunas realizaciones, el tumor mediado por 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 del compuesto tiene lugar por administración intratumoral. En algunas realizaciones, el individuo recibe cirugía antes de la administración del compuesto. En algunas realizaciones, el compuesto administrado a un paciente comprende un compuesto que interacciona con una proteína erbB en una célula tumoral para alterar la proteína erbB de manera suficiente para resultar en una menor propensión de la misma en dimerizar con otra proteína erbB. En algunas realizaciones, el compuesto que interacciona con una proteína erbB en una célula tumoral para alterar la proteína erbB de modo suficiente para tener como resultado una menor propensión de la misma en dimerizar con otra proteína erbB es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el compuesto que es administrado a un paciente comprende un compuesto que interacciona competitivamente con una proteína erbB en una célula tumoral para inhibir competitivamente la formación de dímero con otra proteína erbB e impide una actividad de tirosina cinasa elevada. En algunas realizaciones, el compuesto que interac-

ciona competitivamente con una proteína *erbB* en una célula tumoral para inhibir de manera competitiva la formación con otra proteína *erbB* es un péptido. En algunas realizaciones, el compuesto que interacciona competitivamente con una proteína *erbB* en una célula tumoral para inhibir competitivamente la formación de dímero con otra proteína *erbB* es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el compuesto que se administra a la célula tumoral es una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que interacciona competitivamente con una proteína *erbB* en una célula tumoral para inhibir competitivamente la formación de dímero con otra proteína *erbB*. En algunas realizaciones, la proteína es una proteína *erbB* deficiente de cinasa mutante o truncada. En algunas realizaciones, la proteína es una proteína p185 deficiente de cinasa mutante o truncada. En algunas realizaciones, la proteína interacciona con la región transmembrana de una proteína *erbB*. En algunas realizaciones, la proteína comprende una región de transmembrana *neu* de rata con una mutación val a glu en el aminoácido 664. En algunas realizaciones, la proteína interacciona con la región de ectodominio de la primera proteína *erbB*. En algunas realizaciones, la proteína comprende un ectodominio p185. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico es administrada por administración intratumoral. En algunas realizaciones, el individuo recibe cirugía antes de la administración de la molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico es el genoma vírico de un adenovirus recombinante. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende secuencias codificantes enlazadas operativamente a elementos reguladores para la traslación en células del individuo, y la secuencia codificante comprende: un gen *neu* de rata truncado con un codón de interrupción en el aminoácido 691; un gen *neu* de rata truncado con un codón de interrupción en el aminoácido 691 y una mutación val->glu en el aminoácido 664; un gen p185 químérico que comprende el ectodominio p185c-*erbB2* humano enlazado a transmembrana *neu* de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691; un gen p185 químérico que comprende el ectodominio p185c-*erbB2* humano enlazado a transmembrana *neu* de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691 y mutación val->glu en el aminoácido 664; un gen p185 químérico que comprende el ectodominio EGFR humano enlazado a la transmembrana *neu* de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691; un gen p185 químérico que comprende el ectodominio EGFR humano enlazado a la transmembrana *neu* de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691 y una mutación val->glu en el aminoácido 664; un gen p185 químérico que comprende el ectodominio *erbB3* humano enlazado a la transmembrana *neu* de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691; un gen p185 químérico que comprende el ectodominio *erbB3* humano enlazado a la transmembrana *neu* de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691 y una mutación val->glu en el aminoácido 664; un gen p185 químérico que comprende el ectodominio *erbB4* humano enlazado a transmembrana *neu* de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691; o bien un gen p185 químérico que comprende el ectodominio *erbB4* humano enlazado a transmembrana *neu* de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691 y una mutación val->glu en el aminoácido 664.

La presente invención se refiere a la utilización de un compuesto que altera la actividad de cinasa de un conjunto multimérico en la fabricación de un medicamento a administrar en combinación con una cantidad terapéutica de radiación gamma a un individuo que tiene un tumor, de manera que el tumor se caracteriza por células tumorales que tienen conjuntos receptores multiméricos que proporcionan actividad de cinasa asociada con un fenotipo transformado. En algunas realizaciones, el tumor se caracteriza por células tumorales que tienen conjuntos receptores multiméricos seleccionados del grupo que consiste en: *erbB* homodímeros, *erbB* heterodímeros, y multímeros de receptores de factor de crecimiento derivado de plaquetas. En algunas realizaciones, el tumor se caracteriza por células tumorales que tienen homodímeros de *erbB* que son homodímeros de EGFR mutantes o homodímeros de p185. En algunas realizaciones, el tumor se caracteriza por células tumorales que tienen heterodímeros *erbB* que son heterodímeros p185/EGFR, heterodímeros de EGFR p185/mutantes, heterodímeros de p185/*erbB3*; heterodímeros de p185/*erbB4* o heterodímeros de EGFR/de EGFR mutante. En algunas realizaciones, el compuesto que altera la actividad de cinasa asociada con el conjunto receptor multimérico comprende un agente activo seleccionado entre el grupo que consiste en anticuerpos, péptidos e inhibidores de cinasa no proteínica. En algunas realizaciones, el compuesto que altera la actividad de cinasa asociada con el receptor multimérico comprende un agente activo que es una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína o péptido que interacciona con un componente monomérico del conjunto para impedir que el componente monomérico interaccione con un segundo componente monomérico del conjunto.

La presente invención se refiere a la utilización de un pequeño péptido, compuesto no proteínico o moléculas de ácido nucleico que codifica una proteína no anticuerpo o péptido que altera la actividad de cinasa asociada con el conjunto receptor multimérico en la fabricación de un medicamento a administrar en combinación con una cantidad terapéutica de radiación gamma y/o una cantidad terapéutica de un agente quimioterapéutico citotóxico para tratar un individuo que tiene un tumor, de manera que el tumor se caracteriza por células tumorales que tienen conjuntos receptores multiméricos que proporcionan actividad de cinasa asociada a un fenotipo transformado. En algunas realizaciones, el tumor se caracteriza por células tumorales que tienen conjuntos receptores multiméricos seleccionados entre el grupo que consiste en: *erbB* homodímeros, *erbB* heterodímeros y multímeros de receptores de factor de crecimiento derivado de plaquetas. En algunas realizaciones, el tumor se caracteriza por células tumorales que tienen homodímeros de *erbB* que son homodímeros de EGFR mutante, o bien homodímeros de p185. En algunas realizaciones, el tumor se caracteriza por células tumorales que tienen heterodímeros de *erbB* que son heterodímeros de p185/EGFR, heterodímeros de p185/EGFR mutante, heterodímeros p185/*erbB3*; heterodímeros p185/*erbB4* o heterodímeros de EGFR/EGFR mutante. En algunas realizaciones, el compuesto que altera la actividad de cinasa asociada con el conjunto receptor multimérico comprende un agente activo seleccionado entre el grupo que consiste en péptidos, e inhibidores de cinasa no proteínicos. En algunas realizaciones, el compuesto que altera la actividad de cinasa asociada con el conjunto receptor multimérico comprende un agente activo que es una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína o péptido que interacciona con un componente monomérico del conjunto para impedir que el componente monomérico interaccione con un segundo componente monomérico del conjunto.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A, 1B, 1C y 1D muestran datos relativos a la distribución de ciclos celulares en células de glioblastoma humano, con o sin tratamiento por radiación. Las células fueron aplicadas en platillos de 60 mm y se dejaron pegar 5 antes de su irradiación por rayos gamma (10Gy) (figuras 1B y 1D) o irradiadas de forma falsa (figura 1A y 1C). Después de 72 horas, las células fueron analizadas por citometría de flujo después de tinción PI. Las distribuciones de células de acuerdo con el contenido de ADN se indican en cada panel. Se llevaron a cabo experimentos representativos cuatro veces independientes.

10 Las figuras 2A y 2B muestran datos relativos a la determinación de apoptosis y supervivencia clonogénica después 15 de la irradiación mediante rayos gamma de células de glioblastoma humano. En la figura 2A, las células fueron aplicadas en forma de capa y se permitió que se pegaran antes de su exposición a irradiación gamma (10Gy), en un medio de suero al 10% o en un medio libre de suero. Después de 72h, se llevó a cabo la cuantificación de apoptosis por dos observadores independientes. El índice apoptótico es el porcentaje de células apoptóticas con evidencia morfológica 20 de apoptosis, determinado por tinción de núcleos con DAPI. Los resultados presentados son medias \pm S.E.M de cuatro experimentos independientes y la media se indica en paréntesis. Se cultivaron células U87MG en un medio de suero al 10% o en un medio libre de suero, y se cultivaron células U87/T691 en medio de suero al 10% o medio libre de suero. En la figura 2B, se sometieron a tinción células de glioma humano U87MG y U373MG con DAPI y se analizaron en cuanto a morfología apoptótica 72h después de la irradiación con rayos gamma. La media está indicada entre paréntesis y el índice mostrado en este experimento representativo es media \pm S.D. Estos resultados fueron confirmados en dos experimentos adicionales. Los índices apoptóticos se interpretó que eran subestimaciones, dado que las células flotantes no se podían ensayar por esta técnica.

25 La figura 3 muestra la supervivencia clonogénica después de irradiación. Las células fueron aplicadas en forma de capa y sometidas a irradiación por rayos gamma con diferentes dosis de irradiación, seguido de incubación durante 7-10 días a 37°C, con 5% de CO₂. Las colonias se sometieron a tinción y las que tenían más de 50 células fueron 30 contadas con un microscopio de disección. Se determinó el log de supervivencia, calculando la proporción del número de colonias formadas con respecto al número de células aplicadas en forma de capa, después de corrección por el rendimiento de la aplicación en capa. Se llevaron a cabo experimentos similares tres veces.

30 La figura 4 es un mapa esquemático del adenovirus recombinante H5.001 CBLacZ.

35 La figura 5 muestra inhibición de proliferación celular de p 185^{c-erbB-2} expresando células de tumor humano. Se aplicaron en forma de capa 5.000 células/pocillo con una cantidad indicada de CDR4D5 mimético o anti-p 185^{c-erbB-2} Ab (Neomarkers Inc., CA) y se incubó a 37 grados durante 24h. 100 μ g de MTT (en 200 μ g) fueron añadidos a cada uno de los pocillos durante 4 horas, seguido de adición de 100 μ l de tampón de lisis a cada pocillo. Después de 12-24 horas, se leyó O.D. En 570 nm con un lector ELISA. El % de proliferación indica el grado de proliferación con respecto a las células de control (sin tratamiento de CDR4D5 o anti-p185^{c-erbB-2} Ab mimético).

40 Las figuras 6A y 6B muestran que el anti-p185^{c-erbB-2} CDR4D5 mimético sensibiliza las células del tumor humano a la apoptosis inducida por irradiación de rayos gamma. U3, u3t, S y M indican líneas celulares U373MG y U373/T691, SKBR3 y MCF7, respectivamente. m e ir m indican 4D5 mimético y CD4 serina mimética ir relevante.

Descripción de las realizaciones preferentes

45 Tal como se utiliza en esta descripción, los términos “cáncer asociado a erbB” y “tumores asociados a erbB” están destinados a hacer referencia a células tumorales y neoplasias que expresan un miembro de la familia de genes erbB, cuya expresión resulta en transformación mediada por erbB. Los tumores asociados a Neu y los tumores asociados a EGFR son ejemplos de tumores asociados a erbB.

50 Tal como se utiliza en esta descripción, los términos “cáncer asociado a Neu”, “tumores asociados a Neu” y “tumores asociados a p 185” están destinados a hacer referencia a células tumorales y neoplasias que expresan el gen Neu para producir p 185. El cáncer asociado a Neu es un cáncer asociado a erbB en el que la transformación celular está mediada por actividad de tirosina cinasa, relacionada con p 185.

55 Tal como se utiliza en esta descripción, los términos “cáncer asociado a EGFR” y “tumores asociados a EGFR” están destinados a hacer referencia a células tumorales y neoplasias que expresan EGFR. El cáncer asociado a EGFR es un cáncer asociado a erbB, en el que la transformación celular está mediada por actividad de tirosina cinasa relacionada con EGFR.

60 Tal como se utiliza en esta descripción, los términos “cáncer asociado a EGFR mutante” y “tumores asociados a EGFR mutante” están destinados a hacer referencia a células tumorales y neoplasias que expresan formas mutantes de EGFR. Un cáncer asociado a EGFR mutante es un cáncer asociado a EGFR en el que la transformación celular está mediada por actividad de tirosina cinasa, relacionada con EGFR mutante. Las alteraciones de subunidades receptoras, 65 como resultado de cambios estructurales, se pueden acoplar a la oligomerización de receptor que tiene como resultado la amplificación de la señalización. Un EGFR mutante puede ser una forma de EGFR mutante activada constitutivamente con eliminación extracelular (Δ EGFR) que se observa comúnmente en los tumores gliales humanos. Una oncoproteína Δ EGFR comúnmente observada en neoplasias gliales humanos y otras enfermedades malignas epite-

liales humanas (Δ EGFR o EGFRvIII) resulta de un truncado interno que comporta los exones 2 a 7 (aminoácidos 6 a 273), en el gen que codifica la región extracelular de la molécula que resulta en la expresión de Δ EGFRs de 140-155kDa constitutivamente fosforilados y truncados. Los receptores Δ EGFR han sido observados que existen espontáneamente en forma dímera y median la señalización constitutiva y la transformación oncocénica de fibroblastos de 5 roedores de manera independiente del ligando, mientras que los p170holo-EGFRs sobreestresados se transforman, solamente de forma débil, en presencia de EGF. Las oncoproteínas Δ EGFR confieren una notable ventaja de crecimiento en vivo en células de glioblastoma humano y en fibroblastos murinos. Informes recientes indican que los receptores Δ EGFR se encuentran presentes en la superficie de las células y se internalizan más lentamente que los holo-EGFRs estimulados por ligandos, que pueden incrementar el rendimiento de la transformación de oncoproteínas de Δ EGFR. 10 Otras mutaciones que separan funcionalmente el dominio extracelular de la transmembrana y región citoplásica de polipéptidos RTK se ha observado también que llevan a dimerización espontánea y a la adquisición de potencial de transformación, sugiriendo que una parte del dominio extracelular impone una limitación estructural en la formación de dímero, que es presumiblemente eliminada por unión de ligando o acción de masa. Las eliminaciones extracelulares observadas en Δ EGFR o oncogenes v-erbB de aves facilitan, presumiblemente, la formación de dímeros al imitar los 15 cambios de conformación que resultan de unión de ligandos. Se ha observado que los dominios extracelulares solubles del EGFR oligomerizan y que la alteración estructural en el ectodomino puede inducir oligomerización espontánea de dominios extracelulares, dominios citoplásicos o ambos. La eliminación extracelular en EGFR elimina la mayor parte de aminoácidos que comprenden subdominios I y II del EGFR, lo que incluye una gran parte de la primera (más amino-terminal) de dos secuencias ricas en cisteína en la región extracelular del receptor. Subdominio III, que se 20 ha informado que confiere características de unión de ligando al EGFR, es preservado en la oncoproteína de EGFR, si bien las EGFRs no parecen unir ligandos en células NIH3T3. La coexpresión de los holo-EGFRs y Δ EGFRs ha sido observada en glioblastoma humano y otras muestras de tumores, sugiriendo que Δ EGFR/EGFR, que coexpresan células, pueden ser un correlacionado íntimo de la enfermedad humana.

25 Tal como se utiliza en esta descripción, el término “especies EGFR” está destinado a hacer referencia a EGFR de tipo salvaje y formas mutantes del mismo.

30 Tal como se utiliza en esta descripción, el término “trasnfromación celular mediada por erbB” está destinado a hacer referencia a la transformación celular que sufren células tumorales y neoplasmas asociados a erbB. Las células sufren transformación mediada por erbB en relación con niveles elevados de actividad de tirosina cinasa por miembros de la familia de receptores erbB. El genotipo transformado de las células transformadas mediadas por erbB se puede interrumpir y/o invertir por expresión de proteínas deficientes en tirosina cinasa que dimerizan con miembros de la familia de receptores erbB.

35 Tal como se utiliza en esta descripción, el término “transformación celular mediada por p185” está destinada a hacer referencia a la transformación celular que sufren las células tumorales y neoplasmas asociados a p185, y cuyo fenotipo transformado puede ser interrumpido y/o invertido por expresión de proteínas deficientes en tirosina cinasa que dimerizan con p185. La transformación celular mediada por p185 es una transformación celular mediada por erb.

40 Tal como se utiliza en esta descripción, el término “transformación celular mediada por EGFR” está destinada a hacer referencia a la transformación celular que sufren células tumorales y neoplasmas asociados a EGFR, y cuyo fenotipo transformado puede ser interrumpido y/o invertido por expresión de proteínas deficientes en tirosina cinasa que dimerizan con EGFR. La transformación celular mediada por EGFR es una transformación celular mediada por erb.

45 Tal como se utiliza en esta descripción, el término “transformación celular mediada por EGFR mutante” está destinado a hacer referencia a la transformación celular que sufren células tumorales y neoplasmas asociados a EGFR mutante, y cuyo fenotipo transformado puede ser interrumpido y/o invertido por expresión de proteínas deficientes en tirosina cinasa que dimerizan con EGFR mutante. Una transformación celular mediada por EGFR mutante es una transformación celular mediada por erb.

50 Tal como se utiliza en esta descripción, el término “componentes portadores” está destinado a hacer referencia a vehículos por los cuales se pueden suministrar moléculas de ácido nucleico a células de un individuo. Los componentes portadores están destinados a incluir partículas víricas, tales como partículas víricas de vectores de terapia genética, así como otros vehículos, portadores, complejos, entidades y estructuras que son útiles para suministrar una molécula de ácido nucleico a una célula.

55 Tal como se utiliza en esta descripción, el término “individuo de alto riesgo” está destinado a hacer referencia a un individuo que ha tenido un tumor asociado a erbB, tal como, por ejemplo, un tumor asociado a neu, que ha sido eliminado o que está en remisión y que, por lo tanto, es susceptible de relapso o recurrencia. Como parte de un régimen de tratamiento para un individuo de alto riesgo, el individuo puede ser tratado profilácticamente contra tumores que han sido diagnosticados a efectos de combatir una recurrencia. Por lo tanto, una vez es sabido que un individuo ha tenido un cáncer asociado a erbB, el individuo puede ser tratado de acuerdo con la presente invención para prevenir que las células normales se trasformen en células tumorales.

60 La presente invención es útil para tratar terapéuticamente un individuo identificado como afectado por tumores asociados a erbB, tales como tumores asociados a neu, a efectos de invertir el fenotipo transformado de las células tumorales. La presente invención es útil para tratar profilácticamente un individuo que está predisposto a desarrollar

tumores asociados a erbB o que ha tenido tumores asociados a erbB y que, por lo tanto, es susceptible de un relapso o recurrencia.

El producto de traducción del oncógeno neu es p185, una glicoproteína de transmenbrana que tiene actividad

5 de tirosina cinasa y un peso molecular de 185.000 daltons, según una determinación al llevar a cabo electroforesis de la glicoproteína y comparando su movimiento con proteínas marcadoras de peso molecular conocido. Se han demostrado por experimentos que p185 forma dímeros con otras moléculas de p185 o con receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y que estos dímeros muestran elevada actividad de tirosina cinasa que aporta el fenotipo transformado en células que tienen dicho dímeros.

10 Los mutantes p185neu interfieren con los homodímeros p185neu activados (Qian, O'Rourke, Zhao, Greene: *Oncogene* 13:2149-2157, 1996). Los mutantes p185neu interfieren también con homodímeros normales EGFR, EGFR mutante y también homodímeros de EGFR activados en fibroblastos y en células de cáncer humano primarias. La administración de moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas capaces de formar dímeros con otras moléculas de 15 p185 o con EGFR, pero cuyos dímeros no muestran elevada actividad de tirosina cinasa, eliminan el fenotipo transformado de tumores asociados a neu en una población que sufre tumores mediados por p185. Además, la administración de dichas moléculas de ácido nucleico inhibe el desarrollo neoplásico en animales susceptibles de desarrollar tumores transformados neu.

20 Tal como se ha explicado anteriormente se ha informado sobre interacciones de p185-erbB2 con otros elementos de la familia erbB (Carraway y otros, Alroy y otros, *supra*; Riese y otros, *supra*; Tzahar y otros, *supra*; y Surden y otros, *supra*; Pinkas-Kramarski y otros, *supra*). De acuerdo con ello los mutantes deficientes de cinasa de p185neu/erbB2 (homólogo humano) que requieren la habilidad de formar heterodímeros con EGFR, erbB3, y erbB4 pueden ser utilizados para formar dímeros con erbB3 y erbB4, así como EGFR y modular la señalización en células de tumores 25 humanos. Por lo tanto, la presente invención se refiere además a la administración de moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas capaces de formar dímeros con erbB3 y erbB4, pero cuyos dímeros no muestran elevada actividad de tirosina cinasa para eliminar el fenotipo transformado de tumores en una población afectada por dichos tumores. Además, la administración de moléculas de dicho ácido nucleico inhibe el desarrollo neoplásico en animales susceptibles de desarrollar tumores.

30 Además de p185 como mutantes que interfieren con la transformación celular mediada por erbB, otros elementos erbB mutantes pueden ser útiles para dimerizar con proteínas erbB de tipo salvaje e inhibir elevada actividad de tirosina cinasa asociada con homodímeros y heterodímeros de tipo salvaje.

35 La presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de nucleotidos que codifica una proteína a la que falta actividad de tirosina cinasa y dimeriza con un elemento de la familia de receptores de erbB. La proteína dimeriza con una proteína erbB seleccionada del grupo que consiste en EGFR, p185, erbB3 y erbB4, preferentemente como mínimo dos elementos de la familia erbB seleccionados del grupo que consiste en EGFR, p185, erbB3 y erbB4, más preferentemente como mínimo tres elementos de la familia erbB seleccionados del grupo que consiste en EGFR, p185, erbB3 y erbB4 y más preferentemente la proteína dimeriza con cada uno de EGFR, p185, erbB3 y erbB4. Es preferible que la proteína sea una forma mutada o truncada de una proteína que es un elemento de la familia erbB o una proteína químérica que incluye secuencias de elementos de la familia de erbB derivados de diferentes especies. En algunas realizaciones preferentes la invención da a conocer moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de nucleotidos que codifica una proteína que carece de actividad de tirosina cinasa y dimeriza con EGFR 40 humano o p185 humano. Las moléculas de ácido nucleico se aplican en combinación con componentes de transporte de manera tal que en la administración de la combinación la molécula de ácido nucleico es suministrada a células del individuo. Cuando se proporciona como compuesto farmacéutico, la combinación es útil para el tratamiento de individuos afectados de transformaciones celulares mediadas por erbB tales como transformación celular mediada por p185 y transformación celular mediada por EGFR. Este compuesto farmacéutico puede ser también útil para la prevención 45 de transformación celular mediada por erbB particularmente en individuos susceptibles de dicha transformación. Las moléculas de ácidos nucleico de la invención pueden ser también útiles para producir especies proteínicas específicas de erbB en células competentes que pueden ser subsiguientemente aisladas y utilizadas en varios inmunoensayos para detectar la presencia de anticuerpos específicos para dichas proteínas erbB presentes en diferentes fluidos corporales.

50 P185 celular de rata carente de actividad de cinasa debido a una única sustitución de aminoácido en la secuencia de consenso para unión ATP, N757 o debido a eliminación de dominio citoplasmico, interrupción N691, fué capaz de soportar heterodimerización inducida por EGF con EGFR en células vivas. El EGF fué también capaz de estimular la trans-fosforilación de N757 con intermedio de EGFR. No obstante los heterodímeros compuestos de EGFR y ciertas proteínas p185 truncadas tenían inactividad de cinasa. (Ver Qian y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 1500). 55 Se observaron resultados similares utilizando otro constructor modificado en el que la región de transmembrana de la proteína p185 truncada contenía un cambio único en la secuencia de aminoácidos, T691stop. Se ha demostrado que las alteraciones estructurales en receptores actúan como mutaciones negativas dominantes que pueden suprimir la función de receptores de tipo salvaje (wt), tal como un receptor de insulina (Chou y otros, *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 1842) o EGFR (Honegger y otros, *J. Cell Biol.*, 1990, 110, 1541; y Kashles y otros, *Mol. Cell. Biol.*, 1991, 11, 1454).

60 La presente invención da a conocer una estrategia basada en receptor de inhibición de crecimiento que se dirige a receptores de oncoproteínas activadas de la familia erbB tirosina cinasa. Muchos cánceres epiteliales sistémicos expresan formas oncogénicas de receptores de erbB que pueden conferir potencial tumorigénico por sobreexpresión,

mutación o co-expresión con otros elementos de la familia erbB. Dado que la función enzimática de cinasa de receptores erbB es activada en la dimerización u oligomerización, la presente invención inhibe la actividad catalítica de receptores de superficie por la formación de complejos receptores sin cinasa, reduciendo de esta manera los efectos tumorigénicos del producto de traducción de erbB.

5 La presente invención se refiere a moléculas de aminoácidos que comprenden una secuencia de nucleótido que codifica una proteína que carece de actividad de tirosina cinasa y dimeriza con miembros de la familia de receptores de erbB tales como erbB1 (EGFR), erbB2 (p185), erbB3 y/o erbB4. La secuencia de ácido nucleico puede ser DNA o RNA. La secuencia de ácido nucleico puede codificar cualquier proteína que dimeriza con una proteína erbB y que 10 carece de actividad de tirosina cinasa. La secuencia de ácido nucleico codifica preferentemente proteína erbB de rata o humana que puede dimerizar con proteínas erbB y que carece también de actividad de tirosina cinasa. De acuerdo con un aspecto de la invención, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que carece de actividad de tirosina cinasa y dimeriza con EGFR de humano o p185 humano. La secuencia de ácido nucleico puede ser DNA o RNA. La secuencia de ácido nucleico puede codificar cualquier proteína que 15 dimeriza con EGFR humano y/o p185 y que carece de actividad de tirosina cinasa. La secuencia de ácido nucleico codifica preferentemente especies p185 de rata o humana que pueden dimerizar con p185 humano o EGFR humano y que también carece de actividad de tirosina cinasa.

20 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 cinasa, elimina el genotipo transformado de tumores asociados a erbB en una población afectada de tumores mediados por erbB. Además, la administración de dichas moléculas de ácido nucleico inhibe el desarrollo neoplásico en animales susceptibles de desarrollar tumores asociados a erbB. Por ejemplo, se ha demostrado mediante experimentos que p185 forma dímeros con productos de traducción de erbB tales como otras moléculas p185 o con receptor de factor de crecimiento 25 epidérmico (EGFR) y que estos dímeros muestran una elevada actividad de tirosina cinasa que comporta el fenotipo transformado en células que tienen dichos dímeros. La administración de moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas capaces de formar dímeros con productos de traducción de erbB, tales como otras moléculas p185, o con EGFR pero cuyos dímeros no muestran elevada actividad de tirosina cinasa, elimina el fenotipo transformado de 30 tumores asociados a neu en una población afectada de tumores mediados por p185. Además, la administración de dichas moléculas de ácido nucleico inhibe el desarrollo neoplásico en animales susceptibles de desarrollar tumores transformados neu.

35 La aparición de células de tumores de mamíferos que expresan el producto de traducción de un elemento de la familia de genes de erbB en su superficies y por lo tanto han sufrido transformación celular mediada por erbB puede ser invertida o impedida por la administración de moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias que codifican proteínas que forman dímeros con productos de traducción de genes de erbB pero que no tienen actividad 40 de tirosina cinasa. De acuerdo con la invención estas moléculas de ácido nucleico son suministradas en combinación con componentes de suministros, es decir, vehículos de suministro o portadores, a efectos de facilitar la incorporación de dichas moléculas de ácido nucleico en las células de un animal. Una cantidad efectiva de dichas combinaciones se administra a un individuo identificado como afectado o susceptible a tumores asociados con erbB.

45 La presente invención da a conocer moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína carente de actividad de tirosina cinasa y que dimeriza con el producto de traducción de un miembro de la familia de genes de erbB. Las moléculas de ácido nucleico se facilitan en combinación con componentes de suministro de manera tal que en la administración de la combinación, la molécula de ácido nucleico es suministrada a células del individuo. Cuando se facilita como compuesto farmacéutico, la combinación es útil para el tratamiento de individuos afectados de transformaciones celulares mediadas por erbB. Este compuesto farmacéutico puede ser también útil para la prevención de transformación celular mediada por erbB, particularmente en individuo susceptibles a dicha transformación. Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser también útiles para producir 50 productos de traducción específicos de un elemento de la familia de genes erbB en células competentes que pueden ser aisladas a continuación y utilizadas en diferentes inmunoensayos para detectar la presencia de anticuerpos específicos para el producto de traducción presente en diferentes fluidos corporales.

55 Las moléculas de ácido nucleico de la invención son utilizadas en combinación con una serie de componentes de suministro, tales como vectores recombinantes de expresión vírica u otros medios de suministros adecuados, para afectar su introducción y expresión en células huésped compatibles. En general los vectores víricos pueden ser virus de DNA tales como adenovirus recombinantes y virus de vacunas recombinantes o de virus de RNA tales como retrovirus recombinantes. Otros vectores recombinantes comprenden procariotas recombinantes que pueden infectar células y que expresan genes recombinantes. Además de los vectores recombinantes, también se prevén otros componentes de suministro tales como encapsulado en liposomas, transfección mediada por lipofectina, transfección mediada por 60 transferrina y otros medios mediados por receptores. La invención está destinada a incluir estas otras formas de vectores de expresión y otros medios de suministro adecuados que sirven en funciones equivalentes y que son conocidos en el estado de la técnica.

65 En una realización preferente de la presente invención se suministra DNA a células huésped competentes por medio de un adenovirus. Un técnico en la materia comprendería fácilmente esta técnica de suministrar DNA a una célula huésped por dichos medios. Si bien la invención incluye preferentemente adenovirus, la invención está destinada a incluir cualquier virus que sirva para funciones equivalentes. Se incluyen entre los ejemplos de vectores adenovíricos

recombinantes los que tienen la región E1a eliminada y que comportan una mutación sensible a la temperatura en E2a (Engelhardt y otros, *Hum Gene Ther* 5:1217-1229, 1994). Otros ejemplos de vectores adenovíricos recombinantes útiles para suministrar una secuencia de ácido nucleico según la presente invención se describen en las patentes USA Nº 5.756.283 y Nº 5.707.618.

5 En otra realización preferente de la presente invención se suministra RNA a células huésped competentes por medio de un retrovirus. Un técnico en la materia comprendería con facilidad esta técnica de suministro de RNA a una célula huésped con dichos medios. Cualquier retrovirus que sirva para expresar la proteína codificada por el RNA está destinado a quedar incluido en la presente invención.

10 En otra realización preferente de la presente invención el ácido nucleico se suministra a través de medios receptores de folato. La secuencia de ácido nucleico a suministrar a una célula huésped está relacionada con polilisina y el complejo es suministrado a la célula tumoral por medio del receptor de folato. La patente USA 5.108.921 de 28 de abril de 1992 de Low y otros describe estos componentes de suministro.

15 En otra realización preferente de la presente invención se suministra ácido nucleico con intermedio de la utilización de transferencia de DNA mediada por lipofectina. El reactivo de liposoma lipofectAMINE™ (Life Technologies, Gaithersburg MD) es un reactivo de encapsulado de liposomas disponible comercialmente que puede ser utilizado para encapsular células de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Moléculas de ácido nucleico encapsuladas 20 con reactivo de liposomas lipofectAMINE™ pueden ser suministradas a una célula huésped utilizando métodos de administración de formulación de liposomas.

25 En otra realización preferente de la presente invención se suministra ácido nucleico por la utilización de transferencia catiónica de DNA mediada por lípido, tal como el descrito en la patente USA No. 5.703.055.

25 En otra realización preferente de la presente invención, el ácido nucleico es suministrado mediante la utilización de transferencia de DNA mediada por liposomas, tal como se describe en las patentes USA Nos. 4.235.871, 4.241.046 y 4.394.448.

30 Los compuestos farmacéuticos de acuerdo con la invención incluyen componentes de suministro en combinación con moléculas de ácido nucleico que comprenden, además, portadores farmacéuticamente aceptables o vehículos, tales como, por ejemplo, solución salina. Se puede utilizar cualquier medio que permita el suministro satisfactorio del ácido nucleico. Los técnicos en la materia comprenderán fácilmente la multitud de medios farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en la presente invención.

35 Se pueden formular compuestos farmacéuticos por un experto en la materia con compuestos seleccionados dependiendo de la modalidad de administración escogida. Se describen portadores farmacéuticos adecuados en *Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol*, un texto de referencia en este sector, que se incorpora a la presente descripción a título de referencia.

40 Los compuestos farmacéuticos de la presente invención se pueden administrar por cualesquiera medios que posibilitan que el agente activo llegue al lugar de acción del agente en el cuerpo de un mamífero. Se pueden administrar compuestos farmacéuticos parenteralmente, es decir, de forma intratumoral, intravenosa, subcutánea, intramuscular. Las rutas preferentes son las administraciones intravenosa e intratumoral.

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

50 En algunas realizaciones, la invención se refiere a la utilización de los compuestos en la fabricación de un medicamento para tratar pacientes afectados de adenocarcinomas humanos que son cánceres asociados a *erbB*, tales como adenocarcinomas gástricos, de pulmón y de páncreas y carcinomas humanos de mama y ovarios, así como cáncer humano de seno y próstata que son casos de cáncer asociados a *erbB*. En algunas realizaciones, la invención se refiere a la utilización de los compuestos en la fabricación de un medicamento para la prevención de estos cánceres asociados a *erbB* en individuos de alto riesgo. En algunas realizaciones, la invención se refiere a la utilización de los compuestos en la fabricación de un medicamento para tratar pacientes afectados de progresión de tumor glial, particularmente en glioblastoma, el tumor glial de mayor malignidad. En algunas realizaciones, la invención se refiere a métodos para la prevención de estos cánceres asociados a *erbB* en individuos de alto riesgo.

60 En algunas realizaciones, la invención se refiere a métodos para el tratamiento de pacientes afectados de enfermedades malignas epiteliales humanas, tales como leucemia eritroide, fibrosarcoma, angiosarcoma y melanoma. En algunas realizaciones, la invención se refiere a métodos para la prevención de estos cánceres asociados a *erbB* en individuos de alto riesgo.

65 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los compuestos farmacéuticos son administrados localmente en el lugar del tumor. En algunas realizaciones, los compuestos farmacéuticos son administrados directamente en las células del tumor y tejidos que rodean de manera inmediata el tumor. En algunas realizaciones, los compuestos farmacéuticos se suministran a tumores cerebrales, tales como, por ejemplo, glioblastomas. En algunas realizacio-

nes, los compuestos farmacéuticos son suministrados a los tumores cerebrales como parte de la resección quirúrgica del tumor. En ciertas realizaciones, los compuestos farmacéuticos son suministrados a tumores cerebrales utilizando técnicas quirúrgicas estereotácticas.

5 El paciente es tratado mediante radiación u otro tipo de quimioterapia en conjunción con la administración de compuestos farmacéuticos de acuerdo con la invención. Los enfoques de quimioterapia incluyen la administración de agentes citotóxicos y/o citoestáticos. Se ha observado que la expresión de moléculas de nucleótidos, de acuerdo con la invención, en tumores asociados a *erbB* hace los tumores radiosensibles. Es decir, los tumores son más vulnerables a la destrucción por radiación durante la radioterapia cuando el paciente es tratado con compuestos farmacéuticos de acuerdo con la invención. La utilización de múltiples enfoques terapéuticos proporciona al paciente una intervención de base más amplia. En algunas realizaciones preferentes, el tratamiento con compuestos farmacéuticos, según la invención, viene precedido de intervención quirúrgica. En realizaciones preferentes, la radioterapia sigue a la administración de compuestos farmacéuticos de acuerdo con la invención. En realizaciones preferentes, la terapia por radiación utilizando radiación de rayos gamma es facilitada después de la administración de compuestos que convierten los tumores resistentes a la radiación en sensibles a la radiación. Los técnicos en la materia pueden formular fácilmente un régimen radioterapéutico apropiado. Carlos A Perez & Luther W Brady: *Principles and Practice of Radiation Oncology*, 2^a Edición JB Lippincott Co, Phila., 1992 describe protocolos de terapia de radiación y parámetros que pueden ser utilizados en la presente invención. En cuanto a GBM (glioblastoma, tumor cerebral glial más maligno), Simpson W.J. y otros: *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, describe protocolos clínicos útiles en la presente invención. De manera similar, Borgelt y otros, *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 describe protocolos clínicos útiles en los métodos de la presente invención.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

230

235

240

245

250

255

260

265

270

275

280

285

290

295

300

305

310

315

320

325

330

335

340

345

350

355

360

365

370

375

380

385

390

395

400

405

410

415

420

425

430

435

440

445

450

455

460

465

470

475

480

485

490

495

500

505

510

515

520

525

530

535

540

545

550

555

560

565

570

575

580

585

590

595

600

605

610

615

620

625

630

635

640

645

650

655

660

665

670

675

680

685

690

695

700

705

710

715

720

725

730

735

740

745

750

755

760

765

770

775

780

785

790

795

800

805

810

815

820

825

830

835

840

845

850

855

860

865

870

875

880

885

890

895

900

905

910

915

920

925

930

935

940

945

950

955

960

965

970

975

980

985

990

995

1000

1005

1010

1015

1020

1025

1030

1035

1040

1045

1050

1055

1060

1065

1070

1075

1080

1085

1090

1095

1100

1105

1110

1115

1120

1125

1130

1135

1140

1145

1150

1155

1160

1165

1170

1175

1180

1185

1190

1195

1200

1205

1210

1215

1220

1225

1230

1235

1240

1245

1250

1255

1260

1265

1270

1275

1280

1285

1290

1295

1300

1305

1310

1315

1320

1325

1330

1335

1340

1345

1350

1355

1360

1365

1370

1375

1380

1385

1390

1395

1400

1405

1410

1415

1420

1425

1430

1435

1440

1445

1450

1455

1460

1465

1470

1475

1480

1485

1490

1495

1500

1505

1510

1515

1520

1525

1530

1535

1540

1545

1550

1555

1560

1565

1570

1575

1580

1585

1590

1595

1600

1605

1610

1615

1620

1625

1630

1635

1640

1645

1650

1655

1660

1665

1670

1675

1680

1685

1690

1695

1700

1705

1710

1715

1720

1725

1730

1735

1740

1745

1750

1755

1760

1765

1770

1775

1780

1785

1790

1795

1800

1805

1810

1815

1820

1825

1830

1835

1840

1845

1850

1855

1860

1865

1870

1875

1880

1885

1890

1895

1900

1905

1910

1915

1920

1925

1930

1935

1940

1945

1950

1955

1960

1965

1970

1975

1980

1985

1990

1995

2000

2005

2010

2015

2020

2025

2030

2035

2040

2045

2050

2055

2060

2065

2070

2075

2080

2085

2090

2095

2100

2105

2110

2115

2120

2125

2130

2135

2140

2145

2150

2155

2160

2165

2170

2175

2180

2185

2190

2195

2200

2205

2210

2215

2220

2225

2230

2235

2240

2245

2250

2255

2260

2265

2270

2275

2280

2285

2290

2295

2300

2305

2310

2315

2320

2325

2330

2335

2340

2345

2350

2355

2360

2365

2370

2375

2380

2385

2390

2395

2400

2405

2410

2415

2420

2425

2430

2435

2440

2445

2450

2455

2460

2465

2470

2475

2480

2485

2490

2495

2500

2505

2510

2515

2520

2525

2530

2535

2540

2545

2550

2555

2560

2565

2570

2575

2580

2585

2590

2595

2600

2605

2610

2615

2620

2625

2630

2635

2640

2645

2650

2655

2660

2665

2670

2675

2680

2685

2690

2695

2700

2705

2710

2715

2720

2725

2730

2735

2740

2745

2750

2755

2760

2765

2770

2775

2780

2785

2790

2795

2800

2805

2810

2815

2820

2825

2830

2835

2840

2845

2850

2855

2860

2865

2870

2875

2880

2885

2890

2895

2900

2905

2910

2915

2920

2925

2930

2935

2940

2945

2950

2955

2960

2965

2970

2975

2980

2985

2990

2995

3000

3005

3010

3015

3020

3025

3030

3035

3040

3045

3050

3055

3060

3065

3070

3075

3080

3085

3090

3095

3100

3105

3110

3115

3120

3125

3130

3135

3140

3145

3150

3155

3160

3165

3170

3175

3180

3185

3190

3195

3200

3205

3210

3215

3220

3225

3230

3235

3240

3245

3250

3255

3260

3265

3270

3275

3280

3285

3290

3295

3300

3305

3310

3315

3320

3325

3330

3335

3340

3345

3350

3355

3360

3365

3370

3375

3380

3385

3390

3395

3400

3405

3410

3415

3420

3425

3430

3435

3440

3445

3450

3455

3460

3465

3470

3475

3480

3485

3490

3495

3500

3505

3510

3515

3520

3525

3530

3535

3540

3545

3550

3555

3560

3565

3570

3575

3580

3585

3590

3595

3600

3605

3610

3615

3620

3625

3630

3635

3640

3645

3650

3655

3660

3665

3670

3675

3680

3685

3690

3695

3700

3705

3710

3715

3720

3725

3730

3735

3740

3745

3750

3755

3760

3765

3770

3775

3780

3785

3790

3795

3800

3805

3810

3815

3820

3825

3830

3835

3840

3845

3850

3855

3860

3865

3870

3875

3880

3885

3890

3895

3900

3905

3910

3915

3920

3925

3930

3935

3940

3945

3950

3955

3960

3965

3970

3975

3980

3985

3990

3995

4000

4005

4010

4015

4020

4025

4030

4035

4040

4045

4050

4055

4060

4065

4070

4075

4080

4085

4090

4095

4100

4105

4110

4115

4120

4125

4130

4135

4140

4145

4150

4155

4160

4165

4170

4175

4180

4185

4190

4195

4200

4205

4210

4215

4220

4225

4230

4235

4240

4245

4250

4255

4260

4265

4270

4275

4280

4285

4290

4295

4300

4305

4310

4315

4320

4325

4330

4335

4340

4345

4350

4355

4360

4365

4370

4375

4380

4385

4390

4395

4400

4405

4410

4415

4420

4425

4430

4435

4440

4445

4450

4455

4460

4465

4470

4475

4480

4485

4490

4495

4500

4505

4510

4515

4520

4525

4530

4535

4540

4545

4550

4555

4560

4565

4570

4575

4580

4585

4590

4595

4600

4605

4610

4615

4620

4625

4630

4635

4640

4645

4650

4655

4660

4665

4670

4675

4680

4685

4690

4695

4700

4705

4710

4715

4720

4725

4730

4735

4740

4745

4750

4755

4760

4765

4770

4775

4780

4785

4790

4795

4800

4805

4810

4815

4820

4825

4830

4835

4840

4845

4850

4855

4860

4865

4870

4875

4880

4885

4890

4895

4900

4905

4910

4915

4920

4925

4930

4935

4940

4945

4950

4955

4960

4965

4970

4975

4980

4985

4990

4995

5000

5005

5010

5015

5020

5025

5030

5035

5040

5045

5050

5055

5060

5065

5070

5075

5080

5085

5090

5095

5100

5105

5110

5115

5120

5125

5130

5135

5140

5145

5150

5155

5160

5165

5170

5175

5180

5185

5190

5195

5200

5205

5210

5215

5220

5225

5230

5235

5240

5245

5250

5255

5260

5265

5270

5275

5280

5285

5290

5295

5300

5305

5310

5315

5320

5325

5330

5335

5340

5345

5350

5355

5360

5365

5370

5375

5380

5385

5390

5395

5400

5405

5410

5415

5420

5425

5430

5435

5440

5445

5450

5455

5460

5465

5470

5475

5480

5485

5490

5495

5500

5505

5510

5515

5520

5525

5530

5535

5540

5545

5550

5555

5560

5565

5570

5575

5580

5585

5590

5595

5600

5605

5610

5615

5620

5625

5630

5635

5640

5645

5650

5655

5660

5665

5670

5675

5680

5685

5690

5695

5700

5705

5710

5715

5720

5725

5730

5735

5740

5745

5750

5755

5760

5765

5770

5775

5780

5785

5790

5795

5800

5805

5810

5815

5820

5825

5830

5835

5840

5845

5850

5855

5860

5865

5870

5875

5880

5885

5890

5895

5900

5905

obstante, la inhibición de la señalización del receptor de *erbB* por receptores mutantes T691 stop neu hace la población celular de un tumor en división más sensible a la muerte celular apoptótica inducida por irradiación. La forma T691 stop neu incluye también una fracción más elevada de interrupción de crecimiento en células tumorales tratadas con irradiación de rayos gamma. La inhibición de señalización de crecimiento mediado por factores se ha correlacionado 5 con una mayor sensibilidad a reactivos estándar anticáncer en una serie de sistemas.

La enfermedad residual, local, puede ser tratada de acuerdo con la presente invención con una estrategia basada en receptores de inhibición de crecimiento que desactiva la señalización a través de oncoproteínas de la familia *erbB*. Esta estrategia de terapia de genes es parte de un tratamiento combinado para conseguir inhibición sinérgica de crecimiento 10 por mecanismos directos (inhibición de señalización de receptor) e indirectos (es decir, al hacer las células cancerosas más sensibles al tratamiento simultáneo con agentes preexistentes).

Muchos tumores son notables por sobreexpresión y/o mutación o receptores *erbB*, incluyendo EGFR (*erbB1*), 15 p185neu/*erbB2*, *erbB3*, y/o *erbB4*. En muchos casos, la coexpresión de elementos de la familia *erbB* tiene como resultado una señalización sinérgica y que contribuye a transformación de las células. Tumores notables para sobreexpresión de p185neu/*erbB2* incluyen cánceres de seno, ovario, pulmón y páncreas. Los tumores notables para sobreexpresión de EGFR incluyen tumores primarios gliales de cerebro y cánceres de próstata. El suministro de gen 20 de formas p185neu truncadas, es decir los cDNA o proteínas T691 stop neu, proporciona una estrategia racional para el tratamiento de cánceres residuales, de enfermedad local, en estos cánceres humanos.

La presente invención es particularmente útil para el tratamiento de pacientes que tienen tumores cerebrales gliales, 25 es decir tumores caracterizados por glioblastomas. Estas células expresan una forma mutante de EGFR asociado de manera típica con la tumorigenidad. Se ha descubierto que la presente invención es particularmente útil para el tratamiento de dichos pacientes.

En algunas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico que codifican las diferentes especies de p185 de rata 30 están construidas a partir de cDNA *c-neu* de acuerdo con el procedimiento indicado en los ejemplos. Las secuencias de ácido nucleico que codifican especies WT, truncadas y de p185 de rata mutadas, se preparan de este modo. Las secuencias de nucleótidos de los constructos de p185 preparados son verificadas por secuenciado de DNA. Un técnico en la materia encontraría fácilmente métodos de construcción de dichos constructos de ácido nucleico.

Después de preparar dichos constructos, éstos son transfectados en células huésped adecuadas dentro de las que se expresan. El técnico en la materia comprendería fácilmente el vasto número de células huésped que se podrían utilizar. Dentro de estas células huésped adecuadas se ha examinado la capacidad de la especie p185, producida a partir del 35 constructo nucleótido preparado, en dimerizar con p185 o EGFR. Este examen puede incluir la transferencia inmuno, citometría de flujo, análisis SDS-PAGE, así como otras técnicas que son bien conocidas por los técnicos en la materia. Además, la actividad de tirosina cinasa de la especie p185 puede ser también evaluada. También se encuentra dentro de los conocimientos de un técnico en la materia el evaluar la actividad de tirosina cinasa por una serie de técnicas distintas.

Una vez que se ha establecido la falta de fenotipo tk de la especie p185, así como la capacidad de dimerizar 40 con EGFR o p185, la secuencia de ácido nucleico que codifica la especie p185 puede ser subclonada en un vector de expresión adecuado para transfección en células humanas. De manera alternativa, la secuencia de ácido nucleico puede ser utilizada en combinación con otro medio de suministro, tal como se ha indicado anteriormente.

De acuerdo con un aspecto de la invención, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que carece de actividad de tirosina cinasa y dimeriza con EGFR humano o p185 humano. La secuencia de ácido nucleico puede ser o bien de DNA o RNA. La secuencia de ácido nucleico puede codificar cualquier proteína que dimeriza con EGFR humano y/o p185 y que carece de actividad de tirosina cinasa. La secuencia 45 de ácido nucleico codifica preferentemente especie p185 de rata o humana que puede dimerizar con p185 o EGFR humanos y que carece también de actividad de tirosina cinasa. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico codifica una proteína que comprende la región de ectodominio de la especie p185 de rata o humana. Estas proteínas dimerizan con proteínas *erbB*, tal como p185 o EGFR humanos, y carecen, también, de actividad de tirosina cinasa.

En algunas realizaciones preferentes, los constructos incluyen la región trasmenbrana neu de rata. En algunas 55 realizaciones preferentes, la región trasmenbrana neu de rata contiene una mutación val->glu en el aminoácido 664. La región trasmenbrana neu de rata sin la mutación en el aminoácido 664 se designa como forma "N" y la región transmenbrana neu de rata con la mutación en el aminoácido 664 se designa forma "T".

En alguna realizaciones preferentes de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico codifica especies de truncado de p185 de rata. La presente invención incluye cualquier especie truncada de p185 de rata que comprende eliminaciones de terminal N o de terminal C que dimerizan con p185 o EGFR humanos y que carecen de actividad de tirosina cinasa. Además, las especies truncadas que comprenden aminoácidos sustituidos pueden ser también efectivos. No obstante, la especie de truncado debe ser capaz de dimerizar con p185 o EGFR humanos. Por lo tanto, cualquier 60 parte de p185 capaz de dimerizar con p185 o EGFR humanos, mientras que tiene simultáneamente un fenotipo tk-, está incluida también. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico codifica una proteína que consiste en residuos de aminoácido de p185 de rata desde 1-690 hasta 1-740 aproximadamente. En algunas realizaciones preferentes, comprenden la forma N de la región transmenbrana mientras que en otras, se encuentra presente la forma T.

En otra realización preferente de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico codifica especies de p185 de rata que carecen de actividad de tirosina cinasa por medio de la sustitución o eliminación de partes de aminoácidos, específicamente las de la región de la molécula responsable de la actividad de tirosina cinasa. La presente invención incluye cualquier especie tk de p185 de rata, comprendiendo sustitución o eliminación de aminoácidos responsables de la actividad tk, en la que la especie dimeriza también con p185 o EGFR humanos. Además, estas especies que comprenden aminoácidos sustituidos fuera de las secuencias tk asociadas pueden ser también efectivas. En algunas realizaciones preferentes, comprenden la forma N de la región transmenbrana, mientras que en otras la forma T se encuentra presente.

Las posiciones de 753-758 de p185 de rata comprenden el residuo de lisina crítico que directamente une la molécula ATP que es el donante de fosfato en la reacción de tirosina cinasa (Moller y otros, FEBS Lett., 1985, 186, 1; y Sternberg y otros, FEBS Lett., 1984, 175, 387). Lys⁷⁵⁷ es 15 residuos de aminoácido más abajo de un motivo conservado que se encuentra también en proteínas de unión con nucleótidos sin actividad de cinasa (Wierenga y otros, Nature, 1983, 302, 842). Se cree que los residuos de glicina forman una bolsa hidrofóbica alrededor del residuo de lisina crítico que une directamente la molécula de ATP (Moller y otros, FEBS Lett., 1985, 186, 1; y Sternberg y otros, FEBS Lett., 1984, 175, 387). Por lo tanto, cualquier especie de p185 que comprenda una interrupción en el dominio de unión de ATP o región circundante, en la que ATP ya no se une al residuo crítico Lys, queda también incluida. No obstante, esas especies deben dimerizar también con p185 o EGFR humanos. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácido de p185 de rata, definida en GENE BANK Accession N° X03362, y Bargmann y otros, (1986) Nature 319, 226-230, MEDLINE Identifier: 86118662; y Loftus, y otros (1993) Oncogene 8, 2813-2820; en la que esta secuencia de aminoácidos contiene una sustitución o eliminación o cualquier combinación de las mismas, desde la posición 753 a la posición 758 aproximadamente, de manera que dicha sustitución no comprende un residuo de lisina. En algunas realizaciones preferentes comprenden la forma N de la región de transmenbrana, mientras que en otras se encuentra presente la forma T.

En otra realización preferente de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico codifica p185 de rata, mientras que la secuencia de aminoácido contiene una sustitución o eliminación en la posición 757. Esta sustitución o delección elimina específicamente el residuo Lys crítico en esta posición. Por lo tanto, ATP no puede ya unir esta molécula resultando en un fenotipo tk⁻; en algunas realizaciones preferentes, comprende la forma N de la región de trasmembrana, mientras que en otras se encuentra presente la forma T.

En otra realización preferente de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico codifica especie de truncado de p185 humana. La presente invención incluye cualquier especie de truncado de p185 humana que comprende eliminaciones en el terminal N o en el terminal C que dimeriza con p185 o EGFR humanos y que carece de actividad de tirosina cinasa. Además, las especies de truncado que comprenden aminoácidos sustituidos pueden ser también efectivas. No obstante, las especies de truncado deben ser capaces de dimerizar con p185 o EGFR humanos. Por lo tanto, cualquier parte de p185 humana capaz de dimerizar con p185 o EGFR humanos, teniendo simultáneamente un fenotipo tk⁻, está incluida en esta invención. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico codifica una proteína que consiste en residuos de aminoácidos de p185 humana desde 1-646 a 1-704 aproximadamente. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico codifica una proteína que consiste en residuos de aminoácido de p185 humana desde 1-653 aproximadamente.

En otra realización preferente de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico codifica especies de p185 humana que carecen de actividad de tirosina cinasa por medio de sustitución o eliminación de partes de aminoácidos, específicamente los que se encuentran dentro de la región de la molécula responsable de la actividad de tirosina cinasa. La presente invención incluye cualquier especie de tk⁻ p185 humana, comprendiendo sustitución o eliminación de aminoácidos responsables de la actividad tk, mientras que la especie dimeriza también con p185 o EGFR humanos. Además, dichas especies que comprenden aminoácidos sustituidos fuera de las secuencias asociadas a tk pueden ser también efectivas.

Las posiciones 749-754 de p185 humana comprenden el residuo de lisina crítico que se une directamente a la molécula de ATP que es donante de fosfato en la reacción de tirosina cinasa. Cualquier especie de p185 que comprende una interrupción en el dominio de unión de ATP o región circundante, en la que ATP ya no se une al residuo Lys crítico, está incluida en la invención. No obstante, estas especies deben también dimerizar con p185 o EGFR humanos. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácido de p185 humana que se define en el número de acceso GENE BANK X03363 que se incorpora a la descripción actual a título de referencia y la publicación Yamamoto y otros, (1986) Nature 319, 230-234, MEDLINE identificador: 86118663, y Papewalls y otros, (1991) Nucleic acids Res. 19, 5452-5452, identificador MEDLINE: 92020265, en la que esta secuencia de aminoácido contiene una sustitución o eliminación o cualquier combinación de las mismas, desde la posición 749 a la posición 754 aproximadamente, de manera que dicha sustitución no comprende un residuo de lisina.

En otra realización preferente de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico codifica p185 humana en la que la secuencia de aminoácido contiene una sustitución o eliminación en la posición 753. Esta sustitución o delección elimina, específicamente, el residuo lys crítico en esta posición. Por lo tanto ATP ya no puede unir esta molécula resultando en un fenotipo tk⁻.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica una proteína EGFR humana, una proteína p185 humana, una proteína derivada de erbB3 humana o una proteína derivada de erbB4 humana. En algunas realizaciones, el ácido

ES 2 270 586 T3

nucleico codifica una proteína de fusión. La proteína de fusión es codificada por secuencias quiméricas derivadas de secuencias humanas y no humanas, particularmente de rata.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico es seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 - una neu de rata truncada con un codón de interrupción en el aminoácido 691 (constructo de interrupción N691);
- 10 - una neu de rata truncada con un codón de interrupción en el aminoácido 691 y una mutación val->glu en el aminoácido 664 (constructo T691 de interrupción);
- 15 - un gen p185 químérico que comprende el ectodominio p185c-erbB2 humano enlazado a transmenbrana neu de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691 (constructo de N691 de interrupción);
- 20 - un gen químérico p185 que comprende ectodominio p185c-erbB2 humano ligado a transmenbrana neu de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691 y una mutación val->glu en el aminoácido 664 (constructo de interrupción T691);
- 25 - un gen p185 químérico que comprende ectodominio EGFR humano ligado a transmenbrana neu de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691 y mutación val->glu en el aminoácido 664 (constructo de interrupción T691);
- 30 - un gen p185 químérico que comprende ectodominio erbB3 humano ligado a transmenbrana neu de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691 y mutación val->glu en el aminoácido 664 (constructo de interrupción T691);
- 35 - un gen p185 químérico que comprende ectodominio erbB4 enlazado a transmenbrana neu de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691 (constructo de interrupción N691); y
- un gen p185 químérico que comprende ectodominio erbB4 humano ligado a transmenbrana neu de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691 y mutación val->glu en el aminoácido 664 (constructo de interrupción T691).

40 A diferencia de las células replicantes no transformadas que pueden ser exterminadas por exposición a radiación terapéutica, las células tumorales son resistentes a la inducción de muerte celular por radiación. Se ha descubierto ahora que al alterar los conjuntos multiméricos que producen elevada actividad de cinasa asociada con el fenotipo transformado de una célula tumoral, esta célula tumoral, que ordinariamente es resistente a la muerte celular inducida por radiación, se hace sensible a la radiación. De acuerdo con ello, un aspecto de la presente invención da a conocer 45 métodos para hacer que las células tumorales resistentes a la radiación sean sensibles a la misma. La presente invención se refiere a la utilización de un compuesto que altera la actividad de cinasa asociada con el conjunto receptor multimérico en la fabricación de un medicamento a administrar en combinación con radiación gamma para tratar un individuo que tiene células tumorales que tienen conjuntos receptores multiméricos que proporcionan actividad de cinasa asociada con un fenotipo transformado.

50 Hay varios conjuntos receptores conocidos que en células tumorales muestran elevada actividad de cinasa que es asociada con el fenotipo transformado. Se conoce que miembros de la familia erbB de receptores forman conjuntos multiméricos que resultan en elevadas actividad de tirosina cinasa en células tumorales. Los conjuntos multiméricos que comportan miembros de la familia erbB incluyen homodímeros erbB, así como heterodímeros erbB que comprenden componentes monómeros de diferentes miembros de la familia erbB. Los conjuntos receptores multiméricos de receptores de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) muestran también elevada actividad de cinasa que está asociada con el fenotipo transformado.

55 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la formación de dímeros de las proteínas erbB en células tumorales mediadas por erbB es interrumpida para hacer dichas células más susceptibles a la destrucción celular utilizando radiación. De acuerdo con ello, se prevén terapias de combinación que comprenden la administración en primer lugar a un individuo de un compuesto que comprende un agente activo que resulta en interferencia de dimerización de erbB seguida de exposición del paciente a cantidades terapéuticas de radiación. De acuerdo con estos aspectos de la invención, se prevén compuestos a utilizar en tratamiento de individuos afectados por un tumor mediado por la proteína erbB. Un compuesto que inhibe elevada actividad de tirosina cinasa que resulta de la dimerización de proteínas de erbB en una célula tumoral es administrado al individuo, seguido de, después de un tiempo suficiente para que el compuesto inhiba la actividad de tirosina cinasa asociada con la dimerización de proteínas erbB de la célula tumoral, exponer el individuo a una cantidad terapéuticamente efectiva de radiación anticáncer.

En algunas células tumorales, el producto de traducción de p185 del gen *c-erbB2* es sobreexpresada y forma homodímeros y heterodímeros con otros miembros de la familia *erbB*. Esta dimerización de p185 sobreexpresada conduce a elevadas actividades de tirosina cinasa que está asociada con el fenotipo transformado. La interrupción de actividad de tirosina cinasa, tal como por inhibición de formación de dímero entre componentes monómeros, resulta 5 en un efecto citoestático sobre las células tumorales. Se ha descubierto ahora que la alteración transforma también las células tumorales previamente resistentes a la radiación en sensibles a la radiación.

De manera similar, en algunas células tumorales se expresa una forma mutante de EGFR (Δ EGFR) que es independiente de ligando. El Δ EGFR forma homodímeros y heterodímeros con EGFR de tipo salvaje y otros elementos de 10 la familia *erbB*. Esta dimerización de Δ EGFR conduce a elevadas actividades de tirosina cinasa que es asociada con el fenotipo transformado. La alteración de la actividad de tirosina cinasa, tal como formación de dímero de inhibición entre componentes monómeros, tiene como resultado un efecto citoestático en las células tumorales. Se ha descubierto 15 ahora que esta alteración hace también que las células tumorales anteriormente resistentes a la radiación sean sensibles a la radiación.

En algunas realizaciones, el tumor mediado por proteína *erbB* es un tumor de cáncer cerebral. En algunas realizaciones preferentes, el tumor mediado por la proteína *erbB* es un tumor glial. En algunas realizaciones preferentes, 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 mama. En algunas realizaciones, el tumor mediado por la proteína *erbB* es un tumor de 20 cáncer de ovario. En algunas realizaciones, el tumor mediado por proteína *erbB* es un tumor de cáncer de páncreas.

En algunas realizaciones, la actividad de cinasa asociada con el conjunto receptor multimérico queda alterada por administración al individuo de un compuesto que comprende un agente activo que interacciona con un componente monómero del conjunto, y al proceder de este modo impide la dimerización al alterar físicamente el monómero de 25 manera que es menos termodinámicamente dispuesto para formar el conjunto. Estas alteraciones físicas pueden ser, por ejemplo, cambios de conformación, estéricos y/o electroestáticos que transforman al monómero en un estado menos favorable para la formación de dímero. Se incluyen entre los ejemplos de agentes activos que físicamente alteran el monómero, los anticuerpos, proteínas, péptidos y moléculas no proteínicas.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término "anticuerpo" está destinado a designar anticuerpos y también 30 fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos FAb y F(Ab)₂. Los anticuerpos pueden ser, en algunas realizaciones preferentes, los anticuerpos monoclonales o anticuerpos humanizados. Se describen anticuerpos contra p185 en las patentes USA Nos. 5.677.171 y 5.705.157 que describen también anticuerpos contra EGFR. La patente USA No. 5.470.571 describe también anticuerpos contra EGFR.

En algunas realizaciones se disponen péptidos que imitan anticuerpos para inhibir la formación del conjunto multimérico y la elevada actividad de cinasa asociada con dicha formación. Por ejemplo, se diseñan péptidos que tienen 35 secuencias correspondientes a regiones CDR procedentes de anticuerpos. Se describen también métodos para la preparación de dichos péptidos en el documento WO 95/34312. Se describen imitaciones de péptidos de anticuerpo contra p185 en la patente USA No. 5.663.144.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, el compuesto que se administra al individuo para alterar la actividad de cinasa asociada con el conjunto receptor multimérico comprende un agente activo que es una molécula de 40 ácido nucleico que codifica una proteína o péptido deficiente de cinasa que interacciona con un componente monómero de dicho conjunto para impedir que interaccionen con otro componente del conjunto. Es decir, la molécula de ácido nucleico codifica una proteína deficiente de cinasa que compite con las proteínas endógenas de la célula para formar complejos multiméricos. Los complejos formados entre la proteína deficiente de cinasa y las proteínas endógenas de la célula no proporcionan actividad de cinasa elevada. Por lo tanto, las proteínas deficientes de cinasa actúan como coadyuvantes para ligar proteínas endógenas y prevenir, por lo tanto, la formación de complejos multiméricos con actividad de cinasa. Se describen ejemplos de dichas moléculas de ácido nucleico en la patente USA No. 5.837.523.

De acuerdo con ciertos métodos, el compuesto que se administra a un paciente que comprende un compuesto que interacciona competitivamente con una proteína *erbB* en una célula tumoral para inhibir competitivamente la formación de dímero con otra proteína de *erbB* para una dimerización más reducida de proteínas de *erbB* es una molécula 50 de ácido nucleico que codifica una proteína. La proteína bloquea la formación de dímero al interaccionar competitivamente con la proteína *erbB*. En algunas realizaciones, la proteína interacciona con la región de transmembrana de dicha proteína *erbB*. En algunas realizaciones, la proteína que interacciona con la región de transmembrana de una proteína *erbB* comprende una región de transmembrana de *neu* de rata con una mutación val a glu en el aminoácido 664. En algunas realizaciones, la proteína interacciona con la región de ectodominio de una proteína *erbB*. En 55 algunas de dichas realizaciones, la proteína que interacciona con la región de ectodominio de una proteína de *erbB* comprende un ectodominio p185. En algunas realizaciones preferentes, la molécula de ácido nucleico que codifica las proteínas es un genoma vírico. En algunas realizaciones preferentes, es un genoma de un adenovirus recombinante. De acuerdo con algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende secuencias de codificación enlazadas 60 operativamente a elementos reguladores para traducción en células de dicho individuo. En algunas realizaciones, la secuencia de codificación comprende secuencias seleccionadas del grupo que consiste en: gen *neu* de rata truncado con un codón de interrupción en el aminoácido 691; un gen *neu* de rata truncado con un codón de interrupción en el aminoácido 691 y una mutación val->glu en el aminoácido 664; un gen p185 químérico que comprende ectodominio humano p185c-*erbB2* humano enlazado a transmembrana *neu* de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 65

691; un gen quimérico p185 que comprende ectodominio p185 c-erbB2 enlazado a transmembrana *neu* de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691 y mutación val->glu en el aminoácido 664; un gen p185 quimérico que comprende ectodominio EGFR humano enlazado a transmembrana *neu* de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691; un gen p185 quimérico que comprende ectodominio EGFR humano enlazado a transmembrana *neu* de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691 y mutación val->glu en el aminoácido 664; un gen quimérico p185 que comprende ectodominio *erbB3* humano, enlazado a transmembrana *neu* de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691; un gen p185 quimérico que comprende ectodominio *erbB3* humano ligado a transmembrana *neu* de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691 y mutación val->glu en el aminoácido 664; un gen p185 quimérico que comprende un ectodominio *erbB4* humano enlazado a transmembrana *neu* de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691; y un gen p185 quimérico que comprende ectodominio *erbB4* humano enlazado a transmembrana *neu* de rata con un codón de interrupción en el aminoácido 691 y una mutación val->glu en el aminoácido 664.

En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico codifican péptidos que interaccionan con regiones de transmembrana de proteínas *erbB* y de este modo impiden la dimerización de proteínas *erbB*. Se dan a conocer ejemplos de dichas moléculas de ácido nucleico en Loftis, y otros 1993 *Oncogene* 8:2813-2820.

De acuerdo con ciertas realizaciones preferentes, el compuesto que comprende un agente activo que provoca interrupción de la actividad de cinasa asociada con el receptor multimérico es administrado por cualquier vía de administración que puede ser utilizada para facilitar el agente al tumor. En algunas realizaciones, el compuesto es administrado por medio de administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea, parenteral o intratumoral. De acuerdo con ciertas realizaciones preferentes, el individuo ha recibido cirugía para eliminar masas tumorales antes de la administración del compuesto.

De acuerdo con aspectos de la presente invención, después de administrar el compuesto que comprende un agente activo que provoca alteración de la actividad de cinasa asociada con el conjunto receptor multimérico, el individuo es expuesto a una cantidad terapéutica de radiación gamma. La terapia de radiación puede empezar en cualquier momento, después de que ha transcurrido un determinado período de tiempo para que el agente activo provoque la interrupción de la actividad de cinasa asociada con el conjunto receptor multimérico. En general, el individuo es expuesto a radiación en algunos casos 1-10 minutos después, en algunos casos 1-10 horas después y en otros casos 24-72 horas después de la administración del agente activo. En algunos casos, la radiación es facilitada en una dosis única, mientras que en otras realizaciones se administran dosis múltiples durante varias horas, días y/o semanas. El agente activo hace que las células tumorales resistentes a la radiación se vuelvan sensibles a la radiación. Por lo tanto, una vez que el agente activo inhibe la actividad de cinasa, puede tener lugar la exposición a la radiación. La radiación de rayos gamma es suministrada de acuerdo con protocolos radioterapéuticos habituales utilizando dosificaciones y regímenes normales. La administración del agente activo hace la radiación más eficaz en la erradicación de células tumorales.

De acuerdo con aspectos de la presente invención, después de la administración del compuesto que comprende un agente activo que provoca la interrupción de la actividad de cinasa asociada con el conjunto receptor multimérico, el individuo recibe la administración de un agente quimioterapéutico citotóxico además de, o en sustitución, de la exposición a una cantidad terapéutica de radiación gamma. Igual que en el caso de la terapia por radiación, la quimioterapia puede empezar en cualquier momento después de que ha transcurrido un período de tiempo suficiente para que el agente activo provoque la interrupción de la actividad de cinasa asociada con el conjunto receptor multimérico. En general, el individuo recibe la administración quimioterapéutica en algunos casos 1-10 minutos, en otros 1-10 horas y en otros caso 24-72 horas después de la administración del agente activo inhibidor de cinasa. En algunos casos, el agente quimioterapéutico es utilizado en una dosis única, mientras que en otras realizaciones se administran varias dosis a lo largo de varias horas, días y/o semanas. El agente activo hace las células tumorales más sensibles a agentes citotóxicos. Por lo tanto, una vez que el agente activo inhibe la actividad de cinasa, la administración de agentes quimioterapéuticos puede tener lugar. Los agentes quimioterapéuticos son suministrados de acuerdo con protocolos radioterapéuticos estándar utilizando agentes, dosificaciones y regímenes estándar. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es seleccionado entre el grupo que consiste en: cisplatina, doxirrubicina, danurubicina, tamoxifén, taxol, y metotrexato. En algunas realizaciones, se utilizan ambos tratamientos de quimioterapia y radiación después de la administración del agente activo. En estas realizaciones, se utilizan combinaciones estándar de las dos modalidades terapéuticas conjuntamente con administración del agente activo inhibidor de cinasa.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de Mutantes, Vectores de Expresión y Creación de Líneas Celulares

Se han descrito con anterioridad métodos detallados para la construcción de especies p185 mutantes, vectores de expresión y líneas celulares (Qian y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 1500; y Weiner y otros, *Oncogene*, 1989, 4, 1175).

ES 2 270 586 T3

Construcción del mutante N757

El mutante Nneu K757M (N757) de unión de ATP fue derivado de pSV2TneuK757M (Weiner y otros, Oncogene, 1989, 4, 1175) por técnicas de subclonado. Este constructo fue preparado por mutagénesis dirigida al lugar para sustituir un Met por Lys⁷⁵⁷. Los técnicos en la materia comprenderán fácilmente la preparación de este mutante por mutagénesis dirigida al sitio. De modo breve, un fragmento Xba 1 de pSV2neuT correspondiente a una banda de 1,2 kb que abarca el probable lugar de unión de ATP de la secuencia de nucleótido publicada fue clonado en M13Mp18 y transfectado en la cepa de *E. Coli* CJ236 (dot⁻, ung⁻) pUC13 de manera que en lugar HindIII del polienlazador pasó al extremo 5' de las secuencias insertadas. La mutagénesis fue llevada a cabo tal como se ha descrito utilizando un cebador en el que el codón AAG, que codifica para Lys, fue sustituido por el codón Aug correspondiente a Met (Bargmann y otros, Nature, 1986, 319, 226). Las mutaciones puntuales creadas de esta manera fueron verificadas por secuenciado de DNA. El plásmido que lleva la nueva mutación fue fraccionado con Xba1 que liberó el fragmento original. Ese fragmento fue aislado por técnicas estandares, conocidas por los técnicos en la materia, y ligada nuevamente en pSV2-neu para regenerar el vector de expresión oncogénico p185neu excepto que el vector contenía la sustitución de Met por Lys en la posición aminoácido 757 (clon M757).

Construcción del mutante N691stop

El terminal carboxi 591 del mutante de eliminación de aminoácido N691 de interrupción fue derivado de pSV2Nneu (Bargmann y otros, Nature, 1986, 319, 226) por sustitución de un codón de interrupción (stop) por el codón normal Thr⁶⁹¹ por mutagénesis dirigida al sitio.

Construcción de Ndx

El mutante Ndx de eliminación de aminoácido 541 del terminal carboxi fue derivado de c-neu cDNA por la eliminación de un fragmento XbaI e inserción de un codón de interrupción para el codón normal en la posición 741 con intermedio de mutagénesis dirigida al sitio.

Construcción de vectores de expresión

Para vectores de expresión, fragmentos conteniendo dihidrofolato reductasa de ratón (DHFR) cDNA de pSV2DHFR y gen resistente a la neomicina fosfotransferasa bacteriana (neo') de pSV2NEO (Southern y otros, J. Mol. Appl. Genet., 1982, 1, 327) fueron subclonados en pSV2Nneu de manera que se generó un vector combinado 14,8 kb DHFR, neo', y Nneu cDNA. Los fragmentos neu wt o mutados fueron aislados y agregados nuevamente en un vector de expresión pSV2 neo'/dhfr/Nneu. Todos estos CDNA se encontraban bajo el control del promotor previo del virus de simio 40 (SV40). Una unidad de gen que codifica el gen de resistencia a la higromicina bacteriana (Hyg^r) bajo el control de promotor de timidina cinasa de virus simplex de herpes fue aislado de pHyg y sustituido por un fragmento de gen neo' en pEGFR1 (Gorman y otros, J. Cell. Biochem., 1988, 12A, Suppl., C219) para generar otro vector de expresión combinado, pEGFR/Hyg^r. El EGFR cDNA humano se encontraba bajo el control del promotor S_α, un elemento de control transcripcional eficiente contenido el promotor previo de SV40 y el segmento R-U5 del virus humano de leucemia de células T de tipo 1 con repetición de terminal largo (Takebe y otros, Mol. Cell. Biol., 1988, 8, 466).

Transfección y mantenimiento de líneas celulares

El constructo pEGFR/Hyg^r fue transfectado, en primer lugar, en células NR6 (Pruss y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 3918, que se incorpora a la descripción actual como referencia) por precipitación de fosfato cálcico. Después de 3 semanas de selección de higromicina (35 µg/ml), la expresión de EGFR de las colonias resultantes fue identificada por inmunotransferencia anti-EGFR. Las células que expresaron EGFR fueron clonadas adicionalmente por limitación de la dilución antes de transfección de segunda pasada con vectores de expresión neu cDNA. Las células de expresión de EGFR, designadas NE91, junto con las células NR6 fueron transfectadas con pSV2neo'/dhfr/neu codificando proteínas neu wt o mutantes y seleccionadas con G418. Los clones expresando Neu en células NR6 y células NE91 fueron seleccionadas por ensayo de flujo citométrico con tinción del anticuerpo monoclonal anti-neu 7.16.4 (Drebin y otros, Cell, 1985, 41, 695) y se designaron respectivamente NR6 Neu y NE Neu. Estos clones transfectados dobles (expresando Neu y EGFR) simples (expresando solamente Neu) conteniendo DHFR fueron mantenidos en medio de Eagle, modificado Dulbecco (DMEM) conteniendo 5% de suero fetal bovino, G418 (0,3 mg/ml) e higromicina (15 µg/ml). La amplificación de Neu fue conseguida por dosificaciones incrementadas progresivamente (0,3-1,0 µM) de metrotrexato durante algunos meses a efectos de elevar el nivel de expresión del receptor.

Citometría de flujo

Se retiran las células de platillos de cultivo de tejidos con EDTA (Versene, M.A. Bioproducts) con tampón y se lavaron dos veces en medio FACS (solución salina equilibrada de Hank (Gibco) suplementada con 2% de suero fetal de vaca, 0,2% de azida sódica y 10 mM HEPES). Se incubaron 1 x 10⁶ células en medio 0,1 ml FACS con anticuerpo monoclonal anti-neu 7.16.4 (Drebin y otros, Cell, 1985, 41, 695) o anticuerpo de control irrelevante compensado con isótipos durante 1 hora a 4°C. Las células fueron lavadas dos veces con 2,5 ml de medio FACS. La pastilla de células fue resuspendida y las células fueron incubadas con 0,1 ml de IgG anti-ratón de conejo, cabra, conjugado de FITC (reactivo con cadenas pesada y ligera del anticuerpo, Tago) diluido a 1:50 en medio FACS durante 1 hora a 4°C. Las células se lavaron dos veces y se analizaron en un aparato FACS IV Becton Dickenson.

Ejemplo 2

*Actividad de tirosina cinasa*5 *Purificación de membrana*

Se sometieron a lisis células por la combinación de congelación-descongelación y homogeneización Doutice, tal como se describe en Gaulton y otros, J. Immunol., 1986, 7, 2470. La fracción nuclear fue eliminada por centrifugación a 2000 x g durante 5 minutos. La fracción sobrenadante de 2000 x g fue entonces centrifugada a 25.000 x g durante 30 10 minutos a 4°C y el sobrenadante de 25.000 x g fue retenido como fracción citosol. La pastilla fue redissuelta en 1,5 ml de tampón de membrana (40 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 20 mM HEPES (pH 6,8), 2 mM PMSF, y 5 mM Na pirofosfato), aplicada a continuación en capas sobre una solución de sacarosa (20%-37%) en tampón de membrana y centrifugada a 22.000 rpm durante 18 horas durante 2°C utilizando un rotor Beckman SW50.1. El interfaz rico en membrana fue 15 eliminado en un volumen total de 1 ml, diluido con 10ml de tampón de membrana y recentrifugado a 40.000 rpm durante 60 minutos utilizando un rotor SW40.1 exactamente igual a lo descrito en Zick y otros, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984, 119, 6. La pastilla resultante conteniendo fragmentos de membrana purificada se redissolvió en 100 µl de tampón de cinasa (ver más adelante) por cada 10⁷ células originales. Las proteínas de la membrana fueron cuantificadas utilizando un equipo de ensayo de proteínas BioRad y fueron almacenadas a -80°C hasta el ensayo.

20 *Actividad de tirosina cinasa en membranas*

Se determinaron concentraciones de membranas por el método de Bradford descrito en Gaulton y otros, J. Immunol., 1986, 7, 2470.

25 Se incubaron diluciones de membranas en cuadriplicado en presencia o ausencia de tirosina, conteniendo polipeptido sintético, como indicador específico de fosforilación de tirosina. El tampón de reacción de cinasa (50 µl de 0,1 M Hepes pH 7,3, 10 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 50 µM Na₃VO₄) fue incubado en presencia de ATP (1 µCi de rayos gamma [³²P]ATP; Amersham) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones fueron interrumpidas por adición de 5 mM EDTA (concentración final) seguida inmediatamente de inmunoprecipitación TCA sobre filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/A). Los filtros fueron lavados a fondo con TCA seguido de éter, secados al aire, sumergidos en un cóctel de centelleo (Biofluor) y se determinaron las emisiones beta. Pozos cuadriplicados ensayados en ausencia de substrato que contenía quirosina fueron substraídos de los pozos que contenían substratos de tirosina.

35 Las proteínas de membrana fueron incubadas con el polímero al azar de ácido glutámico-tirosina (4:1) poligli:tyr, PGT) como substrato para fosforilación de tirosina, tal como se describe en ZicK y otros, Biophys. Res. Commun., 1984, 119, 6. De manera breve, las proteínas de membrana fueron incubadas en 50 µl de 10 mM HEPES pH 7,2, conteniendo 10 mM MgCl₂, 100 µM Na₃VO₄, y 150 µM (10 µCi) [³²P]ATP durante 15 minutos a temperatura ambiente en presencia (específico) o ausencia (fondo) de substrato poli glu:tyr a 2,5 mg/ml. Las reacciones fueron interrumpidas por la adición de EDTA hasta 50 mM de concentración final y exceso de ATP en frío y se aplicaron muestras sobre 40 papel de filtro de fibra de vidrio Whatman. Los filtros fueron lavados 3 veces con TCA al 10% enfriado con hielo, conteniendo 10 mM de pirofosfato y 1 mM de ATP seguido de acetado 1 vez. Las muestras fueron secadas a continuación y contadas en BioFlur (NEN). Para la inmunoprecipitación de las proteínas de membrana conteniendo fosfotirosina, se incubaron en tampón de cinasa 50 µG de membranas purificadas, tal como se ha descrito anteriormente, durante 15 minutos. Después de marcado, las muestras fueron solubilizadas en tampón lisis suplementado con 5 mM EDTA, se 45 preclararon y se precipitaron de forma inmune con 2 µl de ascitos de MA-2G8A6 + proteína A agarosa. El anticuerpo MA-2G8 precipita específicamente polipéptidos marcados con fosfotirosina, tal como se describe en Daniel y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 2084.

Ejemplo 3

50 *Dimerización con p185 o EGFR*

Se detectaron heterodímeros EGFR y p185 por inmunoprecipitación de anticuerpos anti-receptores específicos e inmunotrasferencia después de EGF y tratamiento químico de enlazador cruzado. La asociación física de EGFR y de 55 proteínas p185 deficientes de cinasa se examinó de esta manera.

Ensayo de reticulación química

Se cultivaron células durante una noche en platillos Petri de 10 cm, se incubaron con o sin EGF (GIBCO/BRL) 60 a 37°C durante 10-15 minutos, y se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato en frío (PBS). Tres ml de PBS conteniendo 2 mM bis (sulfosuccinimidil) suberato (BS³) ó 3,3'-ditriobis (sulfosuccinimidilpropionato) (DTSSP) (Pierce) fueron añadidos e incubados a 18°C durante 30 minutos con un balanceo ocasional de las placas. Después de atemperar la mezcla de reacción de reticulación con tampón conteniendo 10 mM Tris-HCl, 0,9% NaCl, y 0,1 M glicina, las células fueron lavadas dos veces con PBS en frío y solubilizadas con tampón PI/RIPA (Wada y otros, Cell, 1990, 61, 1339).

Marcado e inmunoprecipitación

Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma si no se indica de otra manera. Para marcado [³²P] se aplicaron en forma de capas 1 x 10⁶ células y se cultivaron durante 24 horas y a continuación fueron incubadas con [³²P] 5 (Amersham) inorgánico a 0,5 mCi/ml en 5% FCS/RPMI libre de fosfato durante 6 horas. Después del marcado, las células fueron lavadas con solución salina tamponada con fosfato en frío conteniendo 400 μM EDTA, 10 mM de fluoruro sódico, 10 mM de pirofosfato sódico y 400 μM de ortovanadato sódico y se sometieron a lisis en un tampón de lisis (1% NP40, 0,1% desoxicolato, 0,1% SDS, 0,15 M NaCl, 0,01 M de fosfato sódico pH 7,4, 1% Trasylol, 1 10 mM PMSF, 2 mM EDTA, 10 mM de fluoruro sódico, 10 mM de pirofosfato sódico, 400 μM Na₃VO₄, 10 mM de yodo acetamida y 1 mMATP) durante 30 minutos. Los sobrantes preclarados fueron sometidos a inmunoprecipitación 15 con anticuerpo monoclonal 7.16.4, o antisueros de conejo, reconociendo proteínas neu humanas y de rata DBW-2 (Kokai y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 84 8498). Los inmunoprecipitados fueron hervidos en tampón de muestra Laemmli y analizados en 8% SDS-PAGE (Laemmli, Nature, 1970, 227, 680). Se expusieron los geles secos a 20 película pretratada ("prefogged") a -70°C. Se llevaron a cabo rastreos de densitómetro de geles en un densitómetro de exploración Hoefer GS300. Las densidades relativas fueron determinadas recortando en experimentos secundarios los picos relevantes escaneados y pesándolos en una balanza analítica. La incorporación de p185neu proto oncogénico y oncogénico fue comparada directamente.

Formación de foco y ensayos de tumorigenidad

20 Se aplicaron en capas células (10⁴) en platillos Petri y se cultivaron en DMEM conteniendo 2% de FBS. El medio fue cambiado cada 3-4 días. Después de 3 semanas de cultivo, las células fueron fijadas con 10% de formalina y sometidas a tinción con hematoxilina para observar focos transformados morfológicamente. Para analizar el crecimiento del tumor en ratones simples atípicos, se suspendieron células (10⁶) de cada una de las líneas en 0,1 ml de PBS y se 25 inyectaron, de forma intradérmica, en la parte media del dorso de ratones simples en NCR. También se inyectó solo PBS como control. El crecimiento de tumores fue monitorizado cada 4-5 días hasta 10-12 semanas.

Resultados

30 NE91 es una línea celular transfectada que expresa EGFR en células NR6 (Pruss y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 3918), una línea celular de fibroblastos de ratón libre de EGFR endógeno. P185 (Nneu) celular de tipo salvaje (WT) o Neu deficiente en cinasa (es decir, N757 y N691stop, llevando un punto de mutación K757M en el lugar de unión ATP y eliminación de dominio citoplásmico, respectivamente) fueron expresados en células NR6 y NE91. Los clones transfectados resultantes fueron designados NR6 Neu o NE Neu, respectivamente.

35 Las proteínas neu mutantes deficientes en cinasa suprimieron la función EGFR en transformación celular y evitaron la sinergia de transformación con EGFR.

40 Previamente se ha indicado que la coexpresión de niveles incrementados de EGFR y p185 celular, pero no se paradamente, transformaron células de fibroblastos murinos completamente, tal como se ha demostrado con la línea celular M1 (Kokai y otros, Cell, 1989, 58, 287). En el presente estudio los fenotipos transformados de estas células transfectadas expresando WT o proteínas Neu deficientes de cinasa en presencia o ausencia de EGF fueron analizados.

45 Las células NE91 expresando solo EGFR formaron una monocapa en ausencia de EGF y focos en presencia de EGF. La transformación incompleta observada (es decir, de modo dependiente de EGF) está de acuerdo con informes anteriores (DiFiore y otros, Cell, 1987, 51, 1063; Dobashi y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88, 8582). No obstante, de manera similar a las células M1, la coexpresión de p185 celular WT y EGFR en células NE NneuB2 tuvo como resultado una transformación completa, es decir, la formación de foco era independiente de EGF. Las líneas celulares coexpresando EGFR con cualquier forma de Neu deficiente de cinasa (NE N757 y NE N691 células stop) no 50 formaron focos incluso en presencia de EGF. Se observaron resultados similares cuando se ensayó el crecimiento de colonias independiente del anclaje en agar blando.

55 El crecimiento tumoral en ratones simples fue utilizado como criterio de transformación completa *in vivo*. Células B104-1-1 expresando p185 encogénico fueron utilizadas como control positivo y los tumores causados por estas células aparecieron con rapidez (con una latencia de 5 días). Las líneas celulares expresando medidas equivalentes de EGFR (NE91) o p185 celular (NR6 Nneu) solas no dieron lugar a tumores. No obstante, la inyección de células coexpresando EGFR y p185 celular (M1 y NE NneuB2) provocaron tumores (latencia de 2-3 semanas). Los resultados eran consistentes con un informe anterior (Kokai y otros, Cell, 1989, 58, 287).

60 No obstante, no se observaron tumores (>10 semanas) después de la inyección de líneas celulares expresando Neu deficiente de cinasa solo o coexpresado con EGFR. Estos datos sugieren que la actividad cinasa celular normal de p185 y la función EGFR se requerida para transformación sinérgica y formación de tumores. La coexpresión de proteínas Neu deficientes en cinasa con EGFR no solamente cancelaba este tipo de sinergia, sino que asimismo suprimía el potencial de transformación dependiente de EGF de EGFR. Por lo tanto, la función del receptor EGF mediada por estimulación de ligando fue analizada adicionalmente en los estudios siguientes.

La regulación descendente de receptor, inducida por EGF, fue menos eficaz en células mutantes deficientes en Neu cinasa.

Los inventores examinaron, a continuación, si la regulación descendente de receptor normal estaba afectada por la coexpresión con Neu deficiente de cinasa. Se incubaron células con EGF durante varios períodos de tiempo antes de la tinción superficial de las células con anti-neu mAb 7.16.4 o anti-EGFR mAb 425 seguido de tinción con IgG antirratón conjugado de F1TC. La expresión de la superficie celular de cualquiera de los receptores fue analizada utilizando análisis citométrico de flujo. La expresión de la superficie celular de EGFR en células NE91 se redujo después de 15 minutos de tratamiento de EGF y más del 60% de los receptores desaparecieron de la superficie celular después de 1 hora de tratamiento. La eficacia de la regulación descendente de EGFR en células M1 (coexpresando WT Neu y EGFR) era similar a la observada en células NE91. Aproximadamente 20% de p185 celular se co-regularon de forma descendente (“co-downregulated”) junto con EGFR en células M1. Se observaron resultados similares en células NE Nneu B2. No obstante, las líneas celulares expresando p185 celular solamente no respondieron a EGF. En líneas celulares en las que EGFR fue coexpresado con proteínas Neu mutantes deficientes en cinasa, la regulación descendente de EGFR fue menos eficaz (reducción máxima de aproximadamente 20-25%). Además, la expresión superficial de cualquiera de las proteínas Neu mutantes no fue alterada significativamente en estas células por el tratamiento de EGF.

Medias vidas de receptor incrementadas observadas en células coexpresadas con neu mutante deficiente en cinasa

Para determinar si los receptores que fueron regulados de forma descendente de la superficie celular sufrieron degradación, se llevó a cabo el marcado por impulsos (“pulse-chase”) de proteínas receptoras, tal como se ha descrito en materiales y métodos, y las proteínas Neu y EGFR inmunoprecipitadas fueron analizadas mediante SDS-PAGE. El tratamiento por EGF provocó una rápida degradación de EGFR en células NE91 (expresando EGFR solamente). Se observó una tasa de degradación similar de EGFR en células M1 después del tratamiento de EGF. No obstante, la degradación de EGFR inducida por EGF fue ralentizada en células coexpresando EGFR con cualquiera de las formas de Neu mutante deficiente en cinasa (NE N757 o NE N691 stop).

Los modelos de degradación de proteínas Neu WT o mutantes como respuesta a tratamiento EGF también fueron investigados. El p185 celular WT marcado en las células M1 y en las células NE NneuB2 desapareció proporcionalmente al tiempo de tratamiento con EGF, indicando que p185 celular WT es codegradado de forma eficaz con EGFR. Existió solamente una ligera reducción de niveles de proteína N757 y ningún cambio sensible en la redundancia de la proteína N691 stop truncada después de tratamiento de EGF hasta 6 horas. La vida media normal sugerida de c-erbB2 en células epiteliales de mamífero es de 11-13 horas (Kornilova y otros, *Oncogene*, 1992, 7, 511). Los ensayos densitométricos de los autorradiogramas de los inventores confirmaron que la vida media de p185 celular WT se redujo a 3-4 horas después de tratamiento EGF, mientras que los niveles de Neu mutante no cambiaron significativamente a lo largo del tiempo del examen.

Afinidad de unión de EGF en células expresadas con proteína neu wt o mutante

Los experimentos de los inventores han demostrado que los mutantes Neu deficientes en cinasa suprimen las funciones EGFR, tales como actividad de cinasa (Qian y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 1500), transformación mediada por EGF, regulación descendente de receptor y degradación. Dado que estos efectos podrían ser interpretados en parte por afinidades de unión alterada de EGF, los inventores han analizado los parámetros de unión [¹²⁵I]-EGF por análisis de Scatchard.

Las constantes de disociación media (Kd) de [¹²⁵I]-EGF que se unen a estas líneas celulares se determinaron mediante tres experimentos individuales. EGFR en células NE91 mostraron dos componentes de unión representando afinidades de unión alta ($7,5 \times 10^{-11}$ M) y baja ($4,4 \times 10^{-9}$ M), y la fracción de receptores de alta afinidad era de 5,4% de los receptores totales. La coexpresión de EGFR con WT Neu en células NE NneuB2 resultó en un incremento ligero de las afinidades de unión de EGF ($3,2 \times 10^{-11}$ M) y ($2,0 \times 10^{-9}$ M) para ambas subclases de afinidad alta y baja respectivamente y la fracción de receptores de alta afinidad fue de 5,7%. Las afinidades incrementadas para células M1 fueron reproducibles y los valores Kd ($1,3 \times 10^{-11}$ M y $1,8 \times 10^{-9}$ M) estaban de acuerdo con los informes anteriores de los inventores, Kokai y otros, *Cell*, 1989, 58, 287; y Wada y otros, *Cell*, 1990, 61, 1339). No obstante, el EGFR en células coexpresando Neu deficiente en cinasa mostró predominantemente una baja afinidad de unión de EGF, $4,9 \times 10^{-9}$ M y $5,2 \times 10^{-9}$ M en células NE N691 y NE N757, respectivamente, si bien fue detectable en algunos casos una subclase de rara afinidad elevada de EGFR, es decir, $7,2 \times 10^{-11}$ M (0,5%) en células stop NE N691 y $6,6 \times 10^{-11}$ M ($\leq 1\%$) en células NE N757. Estas especies raras pueden representar un conjunto de homodímeros de EGFR observados todavía cuando se coexpresan con proteínas Neu inactivas de cinasa (Qian y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 1500). Es evidente del análisis Scatchard que EGFR en células que coexpresaban Neu WT activo en cinasa muestran el porcentaje normal de receptores EGF de alta afinidad con una afinidad ligeramente incrementada para EGF en comparación con células NE91. No obstante, la coexpresión de proteína Neu deficiente en cinasa redujo notablemente las afinidades de unión de EGF en correlación con las actividades reducidas de cinasa heterodímera.

65 Comentarios

En los estudios actuales, las funciones receptoras y fenotipos de células han sido analizadas utilizando líneas celulares transfectadas de forma estable coexpresando EGFR con proteínas Neu WT o mutantes. A diferencia de Neu

WT, el Neu deficiente en cinasa no cooperó con EGFR para mediar la transformación celular; además, los inventores han demostrado nuevos aspectos de funciones de receptor negativas dominantes resultado de la interacción de Neu mutante con EGFR.

5 La asociación intermolecular y la activación de tirosina cinasa resultante entre EGFR y WT (Qian y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 1330) o proteínas Neu mutantes (Qian y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 1500) han sido bien caracterizadas. Los estudios de los inventores han demostrado que la heterodimerización de EGFR y productos c-neu puede ser detectada incluso en ausencia de EGF, y están favorecidos con respecto a cualquier otra forma de homodimerización. No obstante, la homodimerización y codimerización de WT EGFR y de EGFR con 10 dominio citoplásmico de eliminado fueron igualmente eficientes y dependientes de EGF (Kashles y otros, *Mol. Cell Biol.*, 1991, 11, 1454). La predominancia de heterodímeros puede ayudar a explicar los fenotipos celulares resultantes, y el efecto negativo dominante que se puede inducir de neu deficiente en cinasa o supresión de función EGFR que 15 tuvo lugar de manera significativa incluso con una proporción 1:1 de EGFR y proteínas Neu mutantes.

15 La interacción de receptor con activación resultante de tirosina cinasa tiene lugar por un mecanismo intermolecular y es seguida frecuentemente de eventos de transforilación rápida, tal como se ha observado en pp60^{c-src} (Cooper y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 4232), receptor de insulina (Boni-Schnetzler y otros, *J. Biol. Chem.*, 1988, 263, 6822) y EGFR (Honegger y otros, *Mol. Cell. Biol.*, 1990, 10, 4035). La transfosforilación tiene lugar también entre especies heterorreceptoras, EGFR y Neu/c-erbB2 (Connelly y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 6054; 20 Spivak-Kroizman y otros, *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 8056; y Qian y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 1500). La heterodimerización preferente de EGFR y receptor Neu (Qian y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 1500) puede facilitar la transfosforilación de N757 por EGFR. Actualmente, los sustratos específicos para EGFR y Neu 25 cinasa no se han caracterizado bien. En ensayos de unión *in vitro* se ha demostrado que la N757 deficiente en cinasa fosforilada era todavía capaz de asociarse con proteína recombinante contenido SH2 después del tratamiento con EGF. No obstante, a diferencia de los heterodímeros activos en M1 y células NE NneuB2, la pérdida de actividad Neu 30 cinasa del heterodímero mutante de células NE N757 puede impedir la fosforilación de ciertos sustratos celulares. Además, la transfosforilación predominante de N757 by EGFR y la ocupación de sustratos celulares en N757 no funcional puede competir con EGFR para señalar moléculas conducentes a reducciones cualitativa y cuantitativa de la función EGFR. Por lo tanto, el heterodímero defectivo puede no transmitir señales de manera tan efectiva como el 35 heterodímero con actividad de cinasa y el homodímero EGFR, dificultando de este modo la señalización sinérgica que conduce a la transformación de células apreciada en M1 y células NE NneuB2 e inhibiendo la función EGFR. Los estudios de heterodimerización de EGFR con N691 stop con eliminación de dominio citoplásmico demostraron que la 40 forma heterodímera era inactiva debido al fallo de la interacción proteína-proteína entre los dominios citoplásmicos, indicando que Neu/c-erbB2 no es simplemente un sustrato para EGFR, sino que es asimismo un transactivador para EGFR (Qian y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 1500). Por lo tanto, las cantidades reducidas de la forma homodímera de EGFR normal y la preponderancia de heterodímeros no productivos resultó en la supresión de fenotipo de función EGFR normal y negativo dominante resultante. La observación es comparable a los efectos de dímeros formados entre EGFR WT y EGFR con eliminación del dominio citoplásmico (Kashles y otros, *Mol. Cell. Biol.*, 1991, 11, 1454).

40 Se ha informado que receptores activos en cinasa han sido direccionados a lisosomas para degradación con la unión de ligandos (Chen y otros, *Cell*, 1989, 59, 33; Felder y otros, *Cell*, 1990, 61, 623). Estudios anteriores utilizando receptores de insulina deficientes en cinasa (McClain y otros, *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 14663; y Russell y otros, *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 11833) y EGFR (Honegger y otros, *Cell*, 1987, 51, 199) sugieren que los dominios activos en cinasa 45 son esenciales para direccionado normal de receptores inducido por ligando. Los inventores utilizaron líneas celulares tratadas con EGF para estudiar la forma en la que se correlacionan las actividades y complejos de receptores de cinasa con la endocitosis y destrucción del receptor. El trabajo de los inventores demuestra que EGFR en células coexpresadas Neu WT (M1 o NE NneuB2) sufre una regulación descendente rápida y degradación en la estimulación de EGF. Este proceso se retrasaba significativamente en células mutantes en comparación con células NE91 expresando EGFR solo. 50 Solamente p185 celular WT, pero no la proteína Neu mutante deficiente en cinasa, mostró co-regulación descendente y co-degradación con EGFR. De manera similar, el tratamiento con EGF de células de la línea celular HC11 mamaria humana afectaba la expresión superficial de la proteína c-erbB2 y la producción de la proteína: un incremento de 3-4 veces en la proteína lisosómica c-erbB2 y la media vida de proteínas c-erbB2 se redujo de 11 horas (sin tratamiento) a 3,5 horas (con tratamiento de EGF) (Kornilova y otros, *Oncogene*, 1992, 7, 511). Junto con las observaciones de los 55 inventores estos resultados sugieren que WT Neu/C-erbB2, (pero no Neu deficiente de cinasa), se asocia con EGFR y un complejo de tirosina cinasa receptor activo y sufre un direccionado normal de receptor.

Como conclusión, los resultados de los inventores facilitan prueba experimental de que los heterodímeros defectivos o inactivos de EGFR y proteínas Neu deficientes en cinasa dificultan la señalización sinérgica de hetero-5 receptor, 60 suprime la función de EGFR normal, y suprimen el fenotipo transformado en células vivas. El modelo experimental de los inventores sugiere una relación causal entre las actividades de cinasa heterodímera y el carácter maligno de las células que puede tener implicaciones clínicas. Un informe reciente ha mostrado que un ectodominio truncado de la proteína c-erbB2 producido por un proceso de RNA alternativo en células de carcinoma humano sobreexpresaba los resultados del receptor p185^{c-erbB2} en la resistencia a los efectos inhibidores de crecimiento del anticuerpo monoclonal 65 anti-c-erbB2 (Scott y otros, *Mol. Cell. Biol.*, 1993, 13, 2247). Se ha especulado en que la transferencia directa de gen de Neu cDNA deficiente en cinasa a las líneas celulares del tumor con co-sobreexpresión de EGFR y Neu/c-erbB2 puede liberar el fenotipo maligno, dado que las proteínas Neu mutantes pueden suprimir la función de los receptores EGFR normal o c-erbB2 por interacciones de homo o hetero receptor.

Ejemplo 4

Inhibición de una oncoproteína natural EGFR por el ectodominio p185neu: implicaciones para contribuciones de subdominio al conjunto receptor

5

Introducción

La activación del receptor de la familia erbB comporta formación de conjunto homodímero y heterodímero. En 10 muchos casos, la formación de heterodímeros entre elementos de la familia erbB incrementa la afinidad de unión de ligando y resulta en la formación de un complejo de señalización más activa que influye en el fenotipo de la célula. Utilizando mutantes receptores p185neu y EGF, el ectodominio solo de estos receptores erbB se ha demostrado 15 que es suficiente para permitir una asociación física heteromérica preferente termodinámicamente y que los contactos citoplásmicos en el dímero resultante afectan la actividad del ligando, la señalización y el fenotipo. Los análisis bioquímicos de p185neu y EGFR sugieren que las consecuencias de formación del dímero entre dominios extracelulares 20 solos son distintas de la señalización resultante de la formación de dímero de endodominio. Los mutantes de p185neu derivados de ectodominio son capaces de transinhibiciones específicas de señalización del receptor EGF en fibroblastos murinos y células humanas transformadas de modo primario que sobreexpresan EGFR. El complejo receptor activo para el factor de diferenciación Neu (NDF/heregulina) parece ser un heterodímero erbB2-erbB3 o erbB2-erbB4, sugiriendo que p185neu/erbB2 funcionen, en parte, como trans-regulador u otras cinasas receptoras de la familia erbB.

20

Para examinar adicionalmente los subdominios receptores responsables para las interacciones regulatorias trans 25 mediadas por el dominio extracelular en la familia erbB, se analizó la interacción entre EGFR y p185neu/c-erbB2 en células trasformadas. Una oncoproteína EGFR, comúnmente observada en neoplasias gliales humanos y otros estados malignos epiteliales humanos (Δ EGFR o EGFRvIII), resulta de un truncado interno ("in-frame") comportando 30 los exones 2 a 7 (aminoácidos 6 a 273) en el gen que codifica la región extracelular de la molécula que resulta en la expresión de Δ EGFRs o 140-155kDa, truncadas, constitutivamente fosforiladas. Los receptores Δ EGF se ha observado que existen espontáneamente en forma dímera y median la señalización constitutiva y la transformación oncogénica de fibroblastos de roedores de forma independiente de ligando, mientras que las p170 holo-EGFR sobreexpresadas se transforman, solamente de manera débil, en presencia de EGF. Las oncoproteínas Δ EGFR confieren una notable ventaja de crecimiento *in vivo* en células de glioblastoma humano y en fibroblastos murinos.

Informes recientes indican que los receptores Δ EGF se encuentran presentes en la superficie de la célula y se internalizan de manera más lenta que los holo-EGFR estimulados por ligando, que pueden incrementar la eficacia de transformación de las oncoproteínas Δ EGFR. También se han observado otras mutaciones que separan funcionalmente 35 el dominio extracelular con respecto a la transmembrana y región citoplásmica de polipéptidos RTK, conduciendo a la dimerización espontánea y a la adquisición de potencial de transformación, sugiriendo que una parte del dominio extracelular impone una limitación estructural en la formación del dímero que es presumiblemente eliminada por unión de ligando o acción de masa. Las eliminaciones extracelulares observadas en las Δ EGFR u oncogenes aviares v-erbB 40 presumiblemente facilitan la formación de dímeros al imitar los cambios de conformación resultantes de la unión de ligando. Se ha observado que los dominios extracelulares solubles del EGFR oligomerizan y que la alteración estructural en el ectodominio puede inducir oligomerización espontánea de dominios extracelulares, dominio citoplásmico o ambos.

La eliminación extracelular en Δ EGFR elimina la mayor parte de aminoácidos que comprenden subdominios I y II 45 del EGFR, lo que incluye una importante parte de la primera secuencia (más amino-terminal) de dos secuencias ricas en cisteína, en la región extracelular del receptor. El subdominio III, que se ha informado que confiere características de unión de ligando al EGFR, queda preservado en la oncoproteína Δ EGFR, si bien las Δ EGFR no parecen unirse a ligando en las células NIH3T3. La coexpresión de holo-EGFR y Δ EGFR se ha observado en glioblastoma humano y otras muestras de tumores, sugiriendo que las células que coexpresan EGFR/DEGFR pueden ser un correlacionado 50 próximo de la enfermedad humana.

Un mutante de eliminación de terminal carbóxilo, derivado de ectodominio del oncogen p185neu (T691stop neu), que carece del dominio de cinasa completo y lugares de autofosforilación con terminal carbóxilo, fue expresado en 55 células de glioblastoma humano que coexpresan EGFR y Δ EGFR de longitud completa para examinar si el ectodominio p185neu se podía asociar con Δ EGFR truncadas, con eliminación de ectodominio, modulando la señalización mediada por Δ EGFR.

Resultados

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

Las células de glioblastoma humano U87MG expresan niveles elevados (10^5 receptores/célula) de EGFR endógeno de tipo salvaje. Tres derivados clonales de células de glioblastoma humano parenteral U87MG se utilizaron para 65 estos estudios: Las células U87/T691-1 contienen T691stop neu en el fondo U87MG; las células U87MG. Δ EGFR expresan niveles elevados (10^6 receptores/célula) de proteínas EGFR humanas en células parenterales U87MG y las células doblemente transfectadas U87MG. Δ EGFR/T691 contienen EGFR, Δ EGFR y proteínas T691stop mutante neu. Se compararon los niveles de expresión de proteínas EGFR y truncadas neu en células de glioblastoma humano derivadas de U87MG después de marcado metabólico. Los subclones derivados de células de glioblastoma humano

parenteral U87MG, notables para la expresión de Δ EGFR y/o receptores mutantes T691stop neu fueron marcados con 35 S-cisteína durante 15h y los lisados de células fueron inmunoprecipitados con anti-EGFR mAb 528 reactivo con ambos ectodominios EGFR y Δ EGFR o bien con anti-neu mAb 7.16.4 que reconoce el ectodominio p185neu. Se resolvieron complejos inmunes y se separaron mediante 8% SDS-page. Se observaron señales de proteínas representando EGFR (170kDa), Δ EGFR (140-155kDa) y proteínas truncadas T691stop neu (115kDa). Las células U87MG expresan solamente EGFR endógeno de longitud completa; las células U87/T691-1 expresan EGFR endógeno y proteínas T691stop neu; las células U87MG. Δ EGFR expresan EGFR endógeno y Δ EGFR transfectadas; y las células U87MG. Δ EGFR/T691 expresan EGFR, Δ EGFR y proteínas T691stop neu. Todas las señales fueron observadas después de autorradiografía (exposición de 24h). La inmunoprecipitación con reactivo mAb 528 (Oncogene Science) con reactivo EGFR y Δ EGFR demostró todas las formas de EGFR expresadas en las líneas celulares derivadas de U87MG. Las EGFR fueron identificadas en células U87MG. Δ EGFR y U87MG. Δ EGFR/T691 solamente. El marcado metabólico y la inmunoprecipitación con reactivo mAb 7.16.4 con el ectodominio p185neu permitió la identificación de receptores T691stop mutante neu de 115kDa en células U87/T691-1 y en células U87MG. Δ EGFR/T691. El análisis por flujo citométrico de los subclones U87/T691-1 y U87MG. Δ EGFR/T691 con mAb 7.16.4 confirmó la localización superficial de las proteínas T691stop neu. El análisis por flujo citométrico confirmó, también, la localización en la superficie de las células de Δ EGFR en ambos subclones U87MG. Δ EGFR y U87MG. Δ EGFR/T691. Las células U87MG de glioblastoma contienen niveles despreciables de erbB-2 o erbB-3.

La inmunoprecipitación y la inmunotransferencia de EGFR en células U87MG. Δ EGFR reveló la presencia de EGFR (170kDa) endógeno y de Δ EGFR transfectadas como especie doblete de Mr140kDa y 155kDa. Los lisados de células U87MG. Δ EGFR fueron inmunoprecipitados con reactivo mAb Δ 124 con Δ EGFR solamente o reactivo mAb 528 con el dominio extracelular de EGFR y Δ EGFR. Cantidad iguales de proteína, según determinación por el equipo de ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories), fueron inmunoprecipitadas y se separaron inmunocomplejos por SDS/8% PAGE en condiciones reductoras. Las EGFR inmunoprecipitadas fueron detectadas por inmunotransferencia con Ab-4, un anticuerpo policlonal contra EGFR humano. El anticuerpo Δ 124 precipitó dos especies de Δ EGFR de 140-155 kDa. El reactivo mAb 528 precipitó EGFR(M_r=170kDa) endógeno, así como Δ EGFR (140-155 kDa). Las dos especies de Δ EGFR en células U87MG. Δ EGFR se resolvieron con mayor claridad por mAb Δ 124. Todas las señales de proteínas fueron visualizadas por el sistema de quimioluminiscencia incrementada (ECL) (Amersham). La densitometría de exploración de receptores Δ EGFR inmunoprecipitados con mAb Δ 124 reveló que la proporción de formas de Δ EGFR de 155kDa a 140kDa era de 2,3 en células U87MG. Δ EGFR. Adicionalmente, el análisis densitométrico de inmunocomplejos mAb 528 demostró que la proporción de Δ EGFR/EGFR en células U87MG. Δ EGFR era aproximadamente 10:1. Este modelo fue también demostrado en transfectantes dobles U87MG. Δ EGFR/T691. Se utilizó densitometría de exploración para confirmar una proporción estoiquiométrica de Δ EGFR/AGFR de 10:1 por inmunoprecipitación de lisados de células utilizando el reactivo mAb 528 con los dominios extracelulares de EGFR y Δ EGFR, seguido de inmunotransferencia con un reactivo antisuero policlonal con EGFR en células U87MG. Δ EGFR y U87MG. Δ EGFR/T691.

Se demostró que el ectodominio T691 stop neu formaba, de manera eficaz, heterodímeros de longitud completa, EGFR de tipo salvaje sobre la superficie de células parentales U87MG y en fibroblastos de roedores, utilizando el enlazador de membrana impermeable DTSSP (3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato)). El ectodominio p185neu inhibió la regulación descendente inducida por EGF de EGFR endógeno en células derivadas de U87MG, según determinación por inmunotransferencia. El análisis citométrico de flujo indicó que la asociación de receptor, que tenía lugar en la superficie de las células, intermedia la inhibición de EGFR en vez de endocitosis y degradación. En particular, se llevaron a cabo experimentos demostrando la asociación entre EGFR endógeno y receptores neu truncados *in vivo* y la inhibición de la modulación descendente inducida por EGF de EGFR en células de glioma expresando receptores T691 stop neu. Se precipitaron células parentales U87MG y U87/T691-1 (células U87MG que expresan T691 stop neu) con anti-EGFR mAb 528 (Oncogene Science) o anti-neu mAb 7.16.4 después de reticulación con DTSSP (3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (2 Mm) (Pierce) con o sin tratamiento de EGF (100 ng/ml a 37°C durante 10-15 min). Se analizaron inmunocomplejos por SDS/8%PAGE en condiciones de reducción. Se detectó EGFR (Mr=170kDa) por inmunotransferencia con Ab-4 (Oncogene Science), un anticuerpo policlonal contra EGFR humano. Se detectaron proteínas EGFR coprecipitadas en células U87/T691-1 inmunoprecipitadas con anti-neu mAb 7.16.4. El tratamiento EGF resultó en una modulación descendente más eficaz de EGFR en células U87MG que en células U87/T691-1. Estos datos están de acuerdo con estudios anteriores llevados a cabo en fibroblastos de roedores. El ectodominio T691 stop neu inhibió la fosforilación inducida por EGF de EGFR endógeno de tipo salvaje de células derivadas de U87MG. Δ EGFR es fosforilado constitutivamente en células U87MG. Δ EGFR, mientras que p170 EGFR es fosforilado en células parentales U87MG y en células U87MG. EGFR solamente después de la adición de EGF. La transferencia con un anticuerpo antifosfotirosina reveló que la especie de menor peso molecular (p140) de Δ EGFR es subfosforilada con respecto a la especie p155 en células U87MG. Δ EGFR. La activación dependiente de ligando de las EGFR en células de glioglastoma humano derivadas de U87MG se determinó del modo siguiente. Se determinó el contenido de fosfotirosina de inmunocomplejos anti-EGFR en células U87MG, células U87/T691-1 (contienen EGFR endógeno de longitud completa y T691stop mutante-neu) y células U87MG. Δ EGFR (contienen EGFR y Δ EGFR endógeno). Se aplicaron en capas igual número de células y se dejaron sin alimentación en un medio libre de suero durante 24h, después de fijación en platillos de 10 cm. Se trataron las células \pm EGF (100 ng/ml a 37°C durante 10-15 min), se lavaron dos veces con PBS frío y se solubilizaron con tampón PI/RIPA. Se inmunoprecipitaron lisados de iguales concentraciones de proteína, según determinación, por el ensayo Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories) con anti-EGFR mAb 528 y se analizaron los inmunocomplejos por SDS/8%PAGE en condiciones de reducción. Se detectaron EGFR fosforiladas en células parentales U87MG y U87MG. Δ EGFR, pero no en células U87/T691-1. La fosforilación de EGFR (170kDa) endógeno, de longitud completa, era dependiente de EGF en células U87MG y en

células U87MG.ΔEGFR. No obstante la fosforilación de las ΔEGFR no dependía del tratamiento EGF en células U87MG.ΔEGFR. La transferencia fue separada y experimentada nuevamente con el anticuerpo anti-EGFR polyclonal Ab-4. Se confirmó la presencia de todas las EGFR en los tipos de células tratados de la forma indicada anteriormente. Las proteínas EGFR aparecen como doblete de 140-155kDa, con la especie de peso molecular más elevado fosforilada de modo más significativo. Todas las señales de proteína fueron visualizadas por el sistema de quimioluminiscencia incrementada (ECL) (Amersham).

Modulación de crecimiento de células mediado por ΔEGFR y transformación por el mutante T691stop neu

10 Se evaluó la proliferación de células y el rendimiento de la transformación de líneas de células de glioblastoma humano, derivadas de U87MG *in vitro* e *in vivo* a efectos de determinar la modulación del receptor ΔEGF de señalización por proteínas mutantes p185*neu* derivadas de ectodominio. Se estudió la inhibición de crecimiento celular en condiciones de suero completo o reducido en los experimentos siguientes. 2×10^4 células de cada línea celular fueron aplicadas en placas de 6 pocillos y se permitió su acoplamiento en un medio de crecimiento pleno. Al día siguiente, las 15 células se mantuvieron en medio de crecimiento pleno (10% FBS) o se cambiaron a 2% suero FBS. Se permitió el crecimiento de las células durante cuatro días y, a continuación, fueron tripsinizadas y contadas. Se utilizaron las células parentales U87MG para normalización (proporción de crecimiento= 1,0 para todos los experimentos). El crecimiento de todas las líneas celulares derivadas fue expresado como fracción de la línea celular parental a efectos de comparación. Las células U87MG.ΔAEGFR expresan EGFR y ΔEGFRs endógenos, las células U87MG.ΔEGFR/T691 20 expresan EGFR, ΔEGFR, y T691 stop *neu*, y las células U87/T691-1 expresan proteínas EGFR y T691 endógenas. La expresión de ΔEGFR (células U87MG.ΔEGFR) incrementó la proliferación celular en condiciones de suero reducido sobre células parentales U87MG, lo cual es coherente con la activación independiente de ligando de las ΔEGFR. La expresión de las proteínas T691 stop mutante *neu* inhibió el crecimiento celular en medio de suero reducido y 25 notablemente en medios de crecimiento completo tanto en células de glioblastoma que coexpresan EGFR/DEGFR como en células parentales U87MG que contienen solamente EGFR endógeno. Se debe observar que los subclones de U87MG.ΔEGFR/T691 mostraron una menor proliferación celular que las células parentales U87MG careciendo de EGFR en medio de crecimiento completo y en mayor grado, en condiciones de suero reducido.

30 ΔEGFR no incrementó la eficacia de transformación *in vitro* en ensayos de crecimiento independientes del anclaje con respecto a células parentales U87MG. Se estudió el crecimiento independiente del anclaje en los siguientes experimentos. De 1000 a 3000 células de cada línea celular fueron sembradas en platillos de agar blando y se cultivaron durante 21-28 días. A continuación, se visualizaron colonias y se contaron después de tinción. Las células U87MG son primariamente células humanas transformadas que contienen múltiples alteraciones genéticas somáticas, incluyendo eliminaciones de p16 y en el gen putativo de la proteína tirosina fosfatasa, *PTEN*. El crecimiento en agar blando de células U87MG.ΔEGFR/T691 se redujo en 41,3% y 45% en comparación con las células parentales U87MG y U87MG.ΔEGFR, respectivamente. La inhibición de crecimiento independiente de anclaje realizada por proteínas T691 stop *neu* era más significativa en células parentales U87MG careciendo de ΔEGFR (inhibición media 75,2% con respecto a células parentales U87MG en tres experimentos independientes).

40 El receptor ΔEGF confiere una ventaja de crecimiento selectiva *in vivo* en el fondo de células U87MG, mientras que muchos estudios han demostrado que las holo-EGFR no se transforman *in vivo*, excepto en condiciones definidas en las que los receptores p185*neu* se coexpresan. La expresión del ectodominio T691 stop mutante *neu* en células U87MG se ha demostrado que inhibe preferentemente el fenotipo oncogénico U87MG cuando se compara con una forma de p185 *neu* truncado (N691 stop) que difiere de T691 stop al contener la región de transmembrana protooncogénica. La 45 comparación del crecimiento de tumor en ratones atípicos entre líneas celulares derivadas de U87MG era la siguiente. 10^6 células de cada línea celular fueron inyectadas intradérmicamente en el día 0 y el volumen del tumor fue registrado 1-2 x/semana. Las células U87MG fueron inyectadas en un lado y la línea celular transfectada fue inyectada en el lado contralateral del animal. La expresión de la proteína T691 stop *neu* suprimió la ventaja de crecimiento selectiva *in vivo* mediada por ΔEGFR en células U87MG. Este resultado ha sido confirmado por un análisis de tres subclones adicionales U87MG.ΔEGFR/T691. El subclón U87MG.ΔEGFR/T691 mostró cinética de crecimiento similar a las 50 células parentales U87MG, si bien se mostró más inhibido que las células U87MG *in vivo*. La inhibición observada *in vivo* para todos los subclones U87MG.ΔEGFR/T691 se relacionó de manera directa a la estequiometría de la expresión T691 stop mutante *neu*.

55 La T691stop *neu* mutante forma heterodímeros con ΔEGFR *in vivo*.

60 A causa de la complejidad genética de los transfectantes U87MG.ΔEGFR y subclones doblemente transfectados U87MG.ΔEGFR/T691 y los múltiples complejos homodiméricos y heterodiméricos que emigran a similares pesos moleculares en análisis de gradiente SDS-PAGE, se utilizó el enlazador cruzado DTSSP impermeable a la membrana, tiodivisible, para examinar componentes individuales de complejos heteroméricos putativos localizados superficialmente. Se utilizó mAb 528 para immunoprecipitar todas las EGFR (tipo salvaje y ΔEGFR) que pueden formar heterodímeros con proteínas *neu* mutantes. Se eliminaron monómeros ΔEGFR coprecipitados de inmunocomplejos anti-*neu* mediante experimentos de reticulación *in vivo* utilizando DTSSP. La reticulación de células U87MG.ΔEGFR/T691 y separación de inmunocomplejos por SDS/6-8% PAGE en condiciones de reducción mostró prueba de formación de heterodímero entre proteínas T691stop *neu* y las formas p140ΔEGFR, p155ΔEGFR y p-170EGFR. La mayor parte 65 de los receptores T691 stop *neu* mutante se asociaron con la forma p140ΔEGFR utilizando estos métodos, si bien se observaron repetidamente débiles bandas identificando las proteínas heterodimerizadas p155ΔEGFR y p170EGFR. La identificación de las proteínas ΔEGFR en la superficie celular de células U87MG.ΔEGFR y transfectantes dobles

U87MG.ΔEGFR/T691 por citometría de flujo soporta las observaciones realizadas con el enlazador impermeable a la membrana. Los receptores T691 stop neu mutantes forman heterodímeros con receptores ΔEGF sobre la superficie de la célula. Se llevaron a cabo experimentos para detectar ΔEGFR co-precipitados de inmunocomplejos anti-neu por reticulado *in vivo*. 1 mg de células parentales lisadas U87MG (bandas 1, 2), células U87MG.ΔEGFR y células U87MG.ΔEGFR/T691 fueron inmunoprecipitadas con anti-EGFR mAb 528 o anti-neu mAb 7.16.4 después de reticulación con DTSSP (3,3'-ditiobis (sulfosuccinimidilpropionato) (2mM) (Pierce) siguiendo tratamiento de EGF (37°C durante 15 minutos). Se analizaron los inmunocomplejos por SDS/8% PAGE en condiciones de reducción y la membrana de nilón fue transferida con Ab-4, un Ab policlonal contra EGFR humano. Se identificaron las EGFR en células U87MG (EGFR endógeno solamente, Mr=170kDa); células U87MG.ΔEGFR (EGFR y ΔEGFRs endógenas, Mr 140-155kDa); y células U87MG.ΔEGFR/T691 (EGFR y ΔEGFR, Mr 140-155kDa endógenas). Se detectaron proteínas EGFR co-precipitadas en células a U87MG.ΔEGFR/T691 inmunoprecipitadas con anti-*neu* mAb 7.16.4. En células U87MG.ΔEGFR/T691, se encontró T691 stop neu para co-precipitar con la forma de peso molecular bajo de ΔEGFR (140 kDa, señal más potente), la forma menos migrante de ΔEGFR (p155), y holo-EGFR (p 170) endógeno. El tratamiento EGF resultó en mejor visualización en monómeros inmunocomplejados pero se pudieron identificar EGFR co-precipitados en inmunocomplejos anti-*neu* de líneas celulares derivadas de U87MG sin tratamiento EGF.

Se determinó el contenido de fosfotirosina de células EGFR en U87MG.ΔEGFR/T691 inmunoprecipitadas utilizando la transferencia antes descrita. La transferencia fue separada y probada nuevamente con el anticuerpo antifosfotirosina, mAb PY-20 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.). Las proteínas EGFR detectadas en inmunocomplejos anti-*neu* tenían un contenido despreciable de fosfotirosina después de tratamiento EGF en células U87MG.ΔEGFR/T691 en comparación con inmunocomplejos anti-EGFR en células parentales U87MG y en células U87MG.ΔEGFR y U87MG.ΔEGFR/T691. El contenido de fosfotirosina de inmunocomplejos anti-EGFR en células U87MG.ΔEGFR y U87MG.ΔEGFR/T691 no era apreciablemente distinto para estas concentraciones de lisado de proteína. La transferencia con un anticuerpo antifosfotirosina confirmó que ambas especies de ΔEGFR asociadas con T691 stop *neu* son subfosforiladas. Se demostró en todos los experimentos un contenido despreciable de fosfotirosina para monómeros EGFR inmunocomplejados a receptores T691 stop *neu*. Se ha observado que EGF aumenta la eficacia de formación de heterodímeros entre p170EGFR y el ectodominio *neu*, si bien esta asociación es independiente de ligando. El EGF incrementa de manera mínima la formación de inmunocomplejos de ectodominio EGFR-p185*neu*, sugiriendo que EGF puede estabilizar la formación heteromérica, o quizás la formación homodimérica EGFR.

Reducción de contenido de fosfotirosina de monómeros de EGFR *in vivo* por coexpresión de T691stop *neu*

El contenido de fosfotirosina para monómeros para ΔEGFR inmunocomplejados a receptores T691 stop *neu* era despreciable en todos los experimentos. Los resultados también revelaron que el peso molecular más abajo de ΔEGFR (140kDa) era relativamente subfosforilado en comparación con la forma p155ΔEGFR tanto en las células U87MG.ΔEGFR como en los transfectantes dobles U87MG.ΔEGFR/T691.

No se observaron diferencias en contenido de fosfotirosina de monómeros de ΔEGFR entre células U87MG.ΔEGFR y células U87MG.ΔEGFR/T691 en inmunoprecipitaciones de lisados de células más grandes utilizando mAb 528, que reacciona con todas las formas de EGFR, para experimentos de reticulación *in vivo*. Por lo tanto, a efectos de examinar específicamente el contenido de fosfotirosina *in vivo* de las ΔEGFR en células que expresan T691 stop *neu*, se utilizó un anticuerpo reactivo con ΔEGFR solamente para precipitar las ΔEGFR de los lisados de células que contienen concentraciones reducidas de proteínas, de las requeridas para detectar complejos heterodiméricos. El contenido de fosfotirosina de ΔEGFR *in vivo* en células U87MG.ΔEGFR con o sin coexpresión de T691 stop mutante *neu* se determinó del modo siguiente. Lisados (200 µg) de células U87MG.ΔEGFR y células U87MG.ΔEGFR/T691 se inmunoprecipitaron con reactivo mAb Δ124 con ΔEGFR solamente y con antifosfotirosina mAb PY-20 o el anticuerpo policlonal anti-EGFR Ab-4. La transferencia con PY-20 después de inmunoprecipitación con reactivo mAb Δ124 con ΔEGFR reveló solamente varias fosfoproteínas en células U87MG.ΔEGFR y U87MG.ΔEGFR/T691. La forma de migración más lenta de ΔEGFR (155kDa) se detectó mientras que la forma de migración más rápida de ΔEGFR (140kDa) no se detectó por el anticuerpo PY-20, indicando un contenido de fosfotirosina relativamente menor de p155kDa. Después de retirar la membrana y probar nuevamente con reactivo Ab-4 con todas las EGFR, se visualizaron ambas formas de ΔEGFR en ambos transfectantes dobles U87MG.ΔEGFR y U87MG.ΔEGFR/T691. El análisis densitométrico de exploración del contenido de fosforilación de monómeros inmunoprecipitados p155ΔEGFR en estas líneas celulares reveló una disminución de 33,7% en células U87MG.ΔEGFR/T691 en comparación con células U87MG.ΔEGFR, en condiciones de crecimiento completo. Las diferencias constitutivas observadas en el contenido de ΔEGFR fosfotirosina no fueron, por lo tanto, superadas por los factores que contienen suero. La proporción de PTyr/ΔEGFR en células U87MG.ΔEGFR fue de 1,57; esta relación en células U87MG.ΔEGFR/T691 se observó que era 1,04, por determinación mediante densitometría de exploración. La diferencia fue observada en dos experimentos adicionales.

El contenido de fosfotirosina en células vivas de monómeros ΔEGFR inmunoprecipitados, no solamente monómeros ΔEGFR inmunocomplejados a proteínas T691 stop *neu*, fue objeto de análisis. Además de observar que ΔEGFR inmunocomplejadas a receptores T691 stop neu mutantes tienen un contenido de fosfotirosina despreciable, estos datos indican que la expresión superficial de T691 stop *neu* sola es suficiente para reducir el contenido de fosfotirosina monómera ΔEGFR en trans. En células que contienen T691 stop *neu* la reducción observada de 33,7% en el contenido de fosfotirosina de monómeros ΔEGFR inmunoprecipitados puede disminuir la señalización del complejo receptor ΔEGF activado, dado que el complejo de señalización puede ser un multímero de orden elevado y ΔEGFR se ha indicado que tiene una menor estequiometría de contenido de fosfotirosina que EGFR de tipo salvaje estimulado por EGF.

La unión del sustrato y/o actividad catalítica de la cinasa del receptor Δ EGFR se pudo alterar por una reducción del contenido de fosfotirosina Δ EGFR monomérica. El menor nivel de contenido de fosfotirosina constitutiva de Δ EGFR con respecto a EGFR de tipo salvaje estimulada por ligando puede ser la responsable del efecto de desactivación del comportamiento de crecimiento *in vivo* de mutaciones de puntos individuales en lugares de autofosforilación terminal de Δ EGFR. Los hetero-olígoreros formados por la asociación entre dímeros Δ EGFR y dímeros T691 stop neu pueden ser un mecanismo para la reducción del contenido de Δ EGFR fosfotirosina y la inhibición fenotípica resultante de la expresión de T691 stop neu y de la localización superficial.

*Reducción de la actividad de cinasa *in vitro* de Δ EGFR por la expresión de T691 stop neu*

Dado que se observó una reducción de contenido de Δ EGFR fosfotirosina monomérica en células expresando receptores mutantes T691 stop neu, se investigó si la actividad catalítica de la cinasa del receptor EGFR podría ser alterada por la expresión de la proteína T691 stop neu. Utilizando condiciones idénticas a las que confirmaron la presencia de Δ EGFR en heterodímeros asociados a T691 stop neu reticulado, se llevaron a cabo experimentos estudiando la reducción de la actividad de cinasas de EGFR *in vitro* por la expresión de T691 stop neu. Se obtuvieron 200 μ g de lisados a partir de células U87MG. Δ EGFR y U87MG. Δ EGFR/T691 con y sin pretratamiento con el enlazador impermeable a la membrana de DTSSP (2 mM). Se suspendieron complejos inmunes anti-EGFR (mAb Δ 124) de estas células en 50 μ l de tampón de reacción de cinasa, conteniendo 0,2 mCi [32 P]- γ -ATP a temperatura ambiente durante 30 min. Se separaron muestras de proteínas por 10% SDS-PAGE y se analizaron por autorradiografía. Los complejos anti-EGFR inmunes se demostró que tenían una mayor actividad de cinasa *in vitro* en células U87MG. Δ EGFR pretatadas con un enlazador impermeable a membrana (DTSSP), pero no en células doblemente transfectadas expresando receptores mutantes T691 stop neu. La expresión de T691 stop neu resultó en una notable inhibición de la transfosforilación de la forma más lentamente migrante (155kDa) de Δ EGFR, debido a la formación de heterodímero confirmada por la utilización de DTSSP. Estos resultados fueron confirmados en tres ocasiones independientes. Dado que el 155kDa Δ EGFR se muestra con mayor abundancia en ambas células U87MG. Δ EGFR y U87MG. Δ EGFR/T691, la reducción mediada por T691 stop neu de la actividad catalítica de la cinasa del receptor Δ EGFR 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*; no obstante, dado que esta especie fue fosforilada *in vitro*, una fracción puede ser fosforilada *in vivo*. La inhibición de la actividad catalítica del receptor Δ EGFR se observó de manera continuada para la transfosforilación del receptor. A las concentraciones más bajas de proteínas utilizadas en experimentos de cinasa *in vitro* se tenía una fosforilación mínima del substrato de Histone III exógeno en todos los complejos inmunes anti-EGFR.

La inhibición fenotípica de señalización de Δ EGFR mediada por receptores mutantes T691 stop neu en células de glioblastoma humano parece, por lo tanto, resultante de: (1) formación de heterodímero entre proteínas T691 stop neu y ambas formas de Δ EGFR, si bien se observó una formación incrementada de heterodímero con p140 Δ EGFR; (2) transinhibición del contenido de fosfotirosina monomérica de 155 Δ EGFR en la expresión *in vivo* por T691 stop neu y (3) inhibición de transfosforilación de cinasa de p155 Δ EGFR como consecuencia de la expresión de T691 stop neu y formación de heterodímeros.

Comentario

Las células U87MG en las que se coexpresan constitutivamente receptores Δ EGF activos con EGFR endógenos representan una aproximación íntima de un subconjunto especialmente agresivo de glioblastomas humanos, es decir, los tumores en la que tienen lugar la eliminación de p16, pérdida alélica en el cromosoma 10q y activación de EGFR, mientras que p53 no ha mutado. Células de glioblastomas humanos derivadas de U87MG expresando EGFR endógeno, cantidades elevadas de oncoproteínas de Δ EGFR, y receptores mutantes de T691 stop deficientes en cinasa (subclones doblemente transfectados U87MG. Δ EGFR/T691) fueron inhibidos en todos los ensayos *in vitro* e *in vivo* en mayor medida que las células parentales U87MG. Esto representó una reducción significativa en el fenotipo observado con 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 salvaje sola es no oncogénica *in vivo*, la formación observada de heterodímeros de ectodominio Δ EGFR-neu y la proporción de proteínas Δ EGFR:EGFR en estas células, se demuestra que la inhibición de crecimiento observada conferida por T691 stop neu y mostrada por las células U87MG. Δ EGFR/T691 fue mediada por la desactivación de la señalización, por intermedio de receptores Δ EGFR en vez de p170 EGFR endógenos.

Es posible que los receptores mutantes de T691 stop neu desactiven un complejo heterodimérico Δ EGFR-EGFR, si bien la proporción estoquiométrica de Δ EGFR:EGFR es aproximadamente 10:1 en células U87MG. Δ EGFR y en células U87MG.EGFR/T691. A diferencia de EGFR endógeno de tipo salvaje, la formación de dímero receptor Δ EGF y la autofosforilación en células de glioma tienen lugar independientemente de ligando y las células NIH3T3 que expresan Δ EGFR muestran crecimiento independiente de ligando y características de trasformación, sugiriendo que la señalización oncogénica resulta de dímeros de 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 cinasa de Δ EGFR, expresados en células U87MG, no se puede restablecer al activar EGFR de tipo salvaje con tratamiento de ligando sugiriendo la carencia de transfosforilación substancial entre EGFR y Δ EGFR. Dada la preferencia termodinámica de las proteínas p185neu erbB2 en heterodimerizar con EGFR y otros receptores erbB, las Δ EGFR pueden formar dímeros con proteínas derivadas del ectodominio p185neu más fácilmente que con holo-EGFR.

T691stop inhibe la fosforilación de 170EGFR en células U87MG, y los monómeros EGFR y Δ EGFR inmunocomplejados a proteínas T691 stop neu tienen un contenido de fosftotirosina despreciable. La demostración de asociación entre T691stop y Δ EGFR no indica necesariamente una asociación preferente con respecto a p170 EGFR porque Δ EGFR y EGFR no son expresados a niveles comparables en estas células. El análisis por citometría de flujo de todas las EGFR en subclones que expresan U87MG. Δ EGFR y U87MG. Δ EGFR/T691 indicó que la expresión del ectodominio p185neu no alteró las poblaciones totales de EGFR, EGFR de tipo salvaje o Δ EGFR de la superficie celular, en células U87MG conteniendo EGFR endógeno sólo o en transfectantes U87MG. Δ EGFR conteniendo EGFR y Δ EGFR. Esto se corresponde con la observación de que el ectodominio p185neu desactiva la señalización EGFR por la formación de conjuntos receptores defectivos heteroméricos u oligoméricos localizados sobre la superficie de la célula, en vez de la inducción de internalización del receptor de Δ EGFR y modulación descendente.

La autofosforilación de los residuos de tirosina en receptores EGF activa los lugares de unión para señalar moléculas y también puede regular la actividad catalítica del receptor EGF. El contenido de fosftotirosina constitutiva de los monómeros Δ EGFR *in vivo* y la actividad de cinasa de Δ EGFR *in vitro* se reduce en trans como consecuencia de expresión de T691 stop neu. La inhibición fenotípica observada *in vitro* e *in vivo* en células U87MG que coexpresan proteínas Δ EGFR y T691 stop neu (células U87MG. Δ EGFR/T691) con respecto a Δ EGFR sola (Células U87MG. Δ EGFR) podría ser debida en parte a los reducidos lugares de unión en las EGFR para señalar moléculas como resultado de formación de heterodímeros con T691 stop neu. Adicionalmente, la actividad de cinasa para transfosforilación del receptor Δ EGF u otros substratos se puede reducir, también, por un cambio conformacional inducido por asociación con receptor mutante T691 stop neu. Los datos soportan el argumento de que una disminución de actividad de cinasa para transfosforilación del receptor contribuye a una reducción en la transformación. La actividad de cinasa *in vitro* para un substrato Histone exógeno fue observada con una magnitud mucho menor que para la transfosforilación del receptor y no quedaba apreciablemente alterada por la expresión de T691 stop neu. La actividad de cinasa *in vitro* de Δ EGFR para substrato exógeno está alterada solamente de forma mínima por substituciones de los lugares de autofosforilación del terminal carbóxilo; la reducción de contenido de fosftotirosina *in vivo* como consecuencia de mutaciones del punto terminal carbóxilo en Δ EGFR parecía correlacionarse de manera más fiable con la inhibición fenotípica. El nivel de inhibición conseguido *in vivo* por el mutante T691 stop neu, expresado en células U87MG. Δ EGFR, era similar al mostrado por un mutante de punto del lugar de unión ATP en Δ EGFR o por un mutante Δ EGFR con substitución de tirosinas 1068, 1148, y 1173.

Estudios utilizando mutantes transdominantes p185neu han indicado que los ectodominios de p185neu y EGFR son suficientes para asociación física y que la señalización de EGFR puede ser modulada con estos mutantes p185neu negativos de cinasa. Las interacciones de receptores del dominio citoplásmico determinan señalización productiva para ambos receptores p185neu y EGF. En ausencia de datos cristalográficos de las regiones extracelulares de p185neu y EGFR, las características estructurales de interacciones de ectodominio entre estos dos receptores son indefinidas. Se ha observado que los receptores Δ EGF existen en forma dimerizada en ausencia de ligando. Se ha observado que regiones extracelulares solubles de EGFR oligomerizan como respuesta a reticulación posterior de EGF, si bien fragmentos proteolíticos derivados del subdominio III sólo no oligomerizaron, sugiriendo que otros subdominios contribuyen a la formación del dímero. Se ha informado que el subdominio III confiere características de unión de ligando a EGFR. Los oncógenes aviarios activados de erbB forman homodímeros en ausencia de ligando con eliminaciones de la totalidad de la región extracelular distinta de una parte del subdominio IV (segundo dominio rico en cisteína). No obstante, la significación fisiológica de la formación observada de este homodímero no era clara dado que no se correlacionaba con las características de transformación específicas de tejidos de estos mutantes.

La asociación física puede tener lugar entre las regiones extracelulares p185neu y EGFR en células transformadas, a pesar de una eliminación que incluye la mayor parte de los dos subdominios independientes (I, II) en la región extracelular del receptor EGF. Los mutantes extracelulares de p185neu eliminados de cualquier subdominio I o II conservan, todavía, la capacidad de formar heterodímeros con EGFR de longitud completa, confirmando que estas secuencias no son críticas para las asociaciones físicas, heteroméricas de p185neu/EGFR. La inhibición fenotípica de oncoproteínas EGFR por proteínas T691 stop neu soporta un argumento de que una asociación física principalmente gobernada por los subdominios III y IV es suficiente para modular la señalización. Basándose en un análisis de la eficiencia de transformación de fibroblastos expresando EGFR humano de tipo salvaje y mutantes de p185neu de eliminación de subdominio extracelular, subdominio III en p185neu parece ser el subdominio extracelular menos relevante para la formación de un complejo de señalización heterodímero transformante p185neu/EGFR, sugiriendo que las interacciones mediadas por el subdominio IV pueden ser las más importantes para el inicio y/o estabilización de complejos receptores homodímeros y heterodímeros.

Cada uno de los dos dominios extracelulares ricos en cisteína del subdominio II y IV de p185neu y EGFR puede poseer un plegado único conocido como “plegado EGF” o “nudo de cisteína”. El motivo se caracteriza por una repetición de seis residuos de cisteína y como mínimo dos enlaces entre cadena de bisulfuro. Si bien se ha observado un motivo similar en otras proteínas, su presencia se conserva en elevado grado en citoquinas y receptores de transmembrana, incluyendo el receptor de factor de necrosis tumoral (TNF) resuelto estructuralmente. Se ha demostrado que varios receptores de tirosina cinasa contienen estos dominios ricos en cisteína y se presume que adoptan conformaciones similares a la del receptor TNF. Se han observado receptores de factor de necrosis tumoral (TNF) como dímeros en estructuras cristalinas de forma no complejada. En esta forma, el último dominio extracelular rico en cisteína forma los contactos dímericos principales. En estos estudios, el dominio próximo a la membrana está desordenado debido, quizás, a la falta de región transmembrana que mantiene este dominio en estado estable. Por lo tanto, se ha hecho la hipótesis de que en el receptor en conjunto, el último dominio rico en cisteína, aminoterminal con respecto a la

secuencia de transmembrana, puede ser estabilizado por la secuencia de transmembrana y posiblemente involucrado en la formación de dímeros funcionales. Un elevado grado de homología de secuencia entre el segundo dominio rico en cisteína (subdominio IV) de p185neu y EGFR y el plegado del nudo de cisteína en el receptor TNF han sido identificados. Una simple comparación de secuencias en los dominios próximos a la transmembrana de los receptores TNF y p185neu muestra que como mínimo cuatro de las seis cisteínas se han conservado.

La regulación por interacciones trans-receptor se ha observado para todos los miembros de la familia erbB, muchos de los cuales muestran expresión o regulación alterada en casos de enfermedad maligna del epitelio humano. La tendencia fisiológica de esta familia de receptores a formar asociaciones heteroméricas sugiere que el direccionado 10 de oncoproteínas de erbB humano, con la estructura o agentes farmacéuticos que limitan ciertos subdominios, en el ectodominio p185neu puede ser asequible en ciertos casos de enfermedad maligna humana. De manera alternativa, el ectodominio p185neu cDNA pudría ser suministrado a células tumorales positivas de receptor erbB en terapia de genes a neoplasia humana. Las oncoproteínas ΔEGFR son expresadas de manera diferencial en muchos neoplasmas epiteliales humanos y pueden representar un objetivo específico del tumor, no obstante, estos receptores no están regulados 15 por unión de ligando, están fosforilados de manera constitutiva y se internalizan de manera reducida. Estas características pueden limitar los esfuerzos en inhibir la señalización de receptores ΔEGF en tumores humanos. La tendencia termodinámica preferente para formación de heterodímero erbB en ausencia de ligando sugiere que direccionando las oncoproteínas grbB con el ectodominio p185neu, nuevos agentes farmacéuticos o limitaciones de péptidos revelantes a la formación de dímeros serían más eficaces en conseguir la inhibición de crecimiento que la inhibición de la 20 activación inducida de ligando con anticuerpos monoclonales o antagonistas de unión con ligando.

Materiales y método

Construcción del vector

25 El mutante de eliminación T691 stop neu fue derivado del oncogénico de rata neu cDNA, pSV2Tneu, conteniendo una mutación de punto único en la zona de transmembrana. Se utilizó mutagénesis dirigida a sitio para introducir un codón de interrupción en la posición Thr-691 en el endodominio. Esta forma eliminada citoplásmicamente de p185neu, que carece del dominio catalítico de cinasa, y de los sitios de autofosforilación del terminal carboxílico, fue 30 insertada a continuación en un vector de expresión de mamífero. Un fragmento conteniendo el gen hygromicin^r de pHYG fue subclonado en APtag-1, un vector de expresión de fosfatasa alcalina (AP) bajo el control del promotor de virus de leucemia Maloney y LTR (MuLVLTR). El gen AP fue sustituido, a continuación, por el mutante T691 stop neu cDNA. Por lo tanto, el T691 stop fue expresado en el vector de expresión pMuLVLTR/T691 1stop/Hyg^r.

35 *Mantenimiento de células y desarrollo de líneas de células transfectadas establemente*

La línea celular de glioblastoma humano de células parentales U87MG y el subclon de glioblastoma humano del que se ha informado con anterioridad U87MG.ΔEGFR conteniendo receptores de ΔEGFR humanos (Nishikawa y otros, 1994) se obtuvieron de Dr. Webster Cavenee (Ludwing Cancer Institute, San Diego, California). Para transfecciones de células estable se transfecaron diez microgramos del constructo pMuLVL-TR/T691stop/Hyg^r en células U87MG.ΔEGFR con intermedio del reactivo lipofectamina (GIBCO/BRL, Gaithersberg, MD) en condiciones determinadas por transfecciones utilizando el constructo informador pCMV-β (β bacteriana-galactosidasa) (Clontech). Se determinó la eficacia óptima de la transfección por quimioluminiscencia detectada mediante un luminómetro (Tropix). Todas las células fueron cultivadas en medio Eagle modificado Dulbecco (DMEM, Bio-Whittaker, Walkersville, MD) con 10% de suero fetal bovino ((Hyclone, Ogden, UT), 100U penicilina, 50 µg/ml estreptomicina, y 2 mM L-glutamina (GIBCO BRL). Se mantuvieron células cultivadas a 37°C en 95% aire/5%CO₂. Se suplementaron células U87MG.ΔEGFR con 4 mg/ml de G418 (Geneticin, GIBCO BRL) para mantenimiento de la expresión transgénica de ΔEGFR.

50 Para el desarrollo de transfectantes dobles derivados de U87MG expresando proteínas ΔEGFR y T691 stop neu los medios fueron suplementados con G418 sulfato e higromicina B. Después de 2-3 semanas en medios de selección conteniendo 70 µg/ml de higromicina B (Boehringer Manheim), y 4 mg/ml G418 sulfato (Geneticin, GIBCO BRL), se aislaron clones establecidos U87MG.ΔEGFR expresando T691 stop neu (designadas células U87MG.ΔEGFR/T691) y se rastrearon por análisis de citometría de flujo, utilizando mAb 7.16.4 contra el ectodominio neu. El medio para 55 subclones transfectados de forma estable fue suplementado con 4 mg/ml G418 sulfato y 35-70 µg/ml higromicina B para el mantenimiento de la expresión transgénica. Se comprobaron periódicamente líneas celulares transfectadas establemente por análisis de citometría de flujo con mAb 7.16.4 para documentar niveles estables de expresión transgénica T691 stop neu.

60 *Marcado metabólico de células seguido de inmunoprecipitación*

Se siembran células subconfluentes (1 x 10⁶) en una noche, en platos de 10 cm, en un medio de crecimiento completo (10% FBS-DMEM). Al día siguiente las células son sometidas a DMEM sin cisteína durante una hora y a continuación sometidas a pulsación con ³⁵S-cysteine (50 µCi/ml)(Amersham) durante 15h en 3% de FBS dializado/DMEM libre de cisteína. Los lisados son recogidos, después de dos lavados en PBS, utilizando un tampón PI/RIPA. Las inmunoprecipitaciones son llevadas a cabo sobre hielo durante 60 minutos y se separan complejos por unión a proteína A-sefarosa antes de separación por 8% SDS-PAGE, secado y exposición a película. Se describe el anticuerpo monoclonal 7.16.4 contra el ectodominio p185neu en la patente USA N° 5.677.171. El anticuerpo monoclonal 528

ES 2 270 586 T3

contra los dominios extracelulares EGFR y EGFR fue obtenido de Oncogene Science. Se utilizaron 5 μ g de anticuerpo para la inmunoprecipitación de proteínas de lisados recuperados de los platos de 10 cm.

Estudios de reticulación, inmunoprecipitaciones y transferencia western

5 Se aplicaron números de células iguales y se cultivaron durante una noche en platos de 10 cm. Las células fueron sometidas durante 24h a un medio libre se suero y fueron tratadas con EGF (100 mg/ml a 37°C durante 10-15 min) y a continuación se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato en frío (PBS). Para la reticulación se añadió PBS contenido 2 mM DTSSP (3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (Pierce) y las células se incubaron 10 a 23°C durante 30 min con balanceo ocasional de las placas. La reacción de reticulación fue interrumpida con tampón contenido 10 mM Tris HCl, 0,9% NaCl, y 0,1 M glicina. Las células fueron lavadas a continuación dos veces con PBS en frío y solubilizadas con tampón PI/RIPA. Los lisados de células fueron sometidos a inmunoprecipitación 15 con anti-neu mAb 7.16.4, anti-EGFR mAB 528, o anti- Δ EGFR mAb Δ 124. Los inmunocomplejos de proteínas neu o proteínas EGFR fueron solubilizados y separados por geles SDS-PAGE (6-8%) y transferidos sobre nitrocelulosa 15 antes de inmunotransferencia con el anticuerpo policlonal anti-EGFR, Ab-4 (Oncogene Science) o la anti-fosfotirosina mAb PY-20 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Ensayo de cinasa in vitro

20 Se aplicaron células en platos de cultivo de 100 mm y al día siguiente se lavaron dos veces en PBS frío y se sometieron a lisado en 1 ml de tampón de lisado (50 mM Hepes, pH 7,5, 150mM NaCl, 3% Brij-35, 2 mM EDTA, 0,02mg/ml Aprotinin, 10% gricerol, 1,5 mM MgCl₂). Los lisados de células fueron centrifugados a 20.000 g durante 15 min. Se midieron las concentraciones de proteína de lisados en células con Dc protein Assay (Bio-Rad). Se utilizaron 25 40 microlitros de proteína A -sefarosa al 50% (vol/vol) para recoger los complejos inmunes que fueron lavados a continuación tres veces con un tampón de lavado (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1% Brij-35, 2 mM EDTA, 0,01 mg/ml Aprotinin 0,03 mM Na₃VO₄). Las pastillas fueron suspendidas en 20 microlitros de 20 mM HEPES (pH 7,4, 5 mM MnCl₂, 0,1% Brij-35, 0,03 mM Na₃VO₄, 0,02 mg/ml aprotinin) contenido 5 μ Ci o ³²p- γ -ATP, e incubados a temperatura ambiente durante 30 min. La reacción se ha terminado por la adición de tapón de muestra de electroforesis 30 3x contenido 2 mM ATP. Después de incubación de las células a 100°C durante 3 min, las muestra fueron analizadas por SDS-PAGE.

Ensayos de tumorigenidad in vitro e in vivo

35 Se evaluó crecimiento de células en condiciones de suero completo o reducido del modo siguiente: 2x10⁴ células de cada línea celular fueron aplicadas en placas de 6 posillos y se dejaron pegar en medio de crecimiento completo. Al día siguiente las células fueron o bien mantenidas en medio de crecimiento completo (10%-FBS) o cambiadas a suero 2%-FBS. Se dejaron crecer las células durante cuatro días y a continuación fueron trisinizadas y contadas.

40 Se determinó el crecimiento independiente del anclaje a través de la eficiencia de formación de colonias de células suspendidas en agar blando. Se suspendieron 1-3 X 10³ células en 1 ml de capa superior (0,18% de agarosa/10% FBS-DMEM), en platos de cultivo de 6cm, contenido una capa de alimentación de 3 ml libre de células consistiendo en 0,25% de agarosa en DMEM suplementado con 10% FBS y 20 mM Hepes (pH 7,5). Se visualizaron colonias (> 0,3 mm) y se contaron en los días 21-28 para todas las líneas de células después de tinción con violeta de p-yod-nitrotetrazolio (1 mg/ml). Cada una de las líneas de células fue examinada por triplicado para los tres experimentos 45 separados.

50 Se compraron del National Cancer Institute ratones simples homocigóticos NCr de 6-8 semanas de edad. Se suspendieron células (1 X 10⁶) en 0,1 ml de PBS y se inyectaron por vía intradérmica en la parte media del dorso de cada animal. Se inyectaron células U87MG en un lado de los animales individuales y se inyectaron líneas de células transfectadas de manera estable en el lado contralateral para hacer comparaciones directas de crecimiento dentro de cada animal. También se inyectó PSB solo en cada animal como control adicional. Los animales se mantuvieron de acuerdo con las normas del Committee on animals de la Universidad de Pensilvania y los preparados por el Committee on Care and Use of Laboratory Animals del Institute of Laboratory Animal Resource. El crecimiento del tumor es controlado dos veces a la semana durante un periodo de 10-12 semanas. Las dimensiones del tumor se calcularon 55 midiendo el volumen del tumor (longitud x anchura x grosor).

Anticuerpos

60 Se ha descrito, con anterioridad, el anticuerpo monoclonal (mAb) 7.16.4 reactivo con el ectodominio de p185neu. El anticuerpo antifosfotirosina mAB PY-20 fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz CA). Se adquirió mAb 528 (Ab-1) reactivo con la región extracelular de EGFR y Δ EGFR de Oncogene Science (Uniondale, NY). Se obtuvo mAb Δ 124 reactivo con Δ EGFR de Dr. Webster K. Cavenee, Ludwig Cancer Institute, San Diego, CA. El anticuerpo policlonal Ab-4, reactivo con EGFR y utilizado para inmunotransferencias, fue obtenido de Oncogene Science (Uniondale, NY).

Ejemplo 5

Conversión de un fenotipo radiorresistente en otro más sensible por desactivación de la señalización del receptor ERBB en células de cáncer humano

5

Introducción

Los parámetros moleculares que determinan la forma en la que una célula pasa a ser más o menos sensible a daños en el DNA inducidos por radiación o agentes quimioterapéuticos, no son bien comprendidos. La situación de 10 las rutas de señalización de puntos críticos del ciclo celular se ha indicado que es un importante determinante de la respuesta a daños en el DNA y las mutaciones en los componentes del punto crítico ("checkpoint") son prevalentes en cánceres humanos. Una hipótesis recientemente introducida sugiere que las células del tumor muestran interrupción de crecimiento o apoptosis como respuesta a terapias citotóxicas que dependen del estado funcional de las rutas de punto crítico y que la apoptosis inducida por radiación puede resultar de rutas de interrupción del crecimiento. De 15 manera similar, en otros sistemas que utilizan células no transformadas, los mecanismos de reparación incompleta de DNA, que tienen lugar durante el retardo de la fase de punto crítico, incrementan la tendencia a la apoptosis.

Los glioblastomas humanos muestran muchas alteraciones genéticas incluyendo la amplificación y/o mutación 20 del gen que codifica el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) resultando en algunos casos en la expresión de una cinasa de un receptor de EGF constitutivamente activado.

La expresión de un inhibidor transreceptor de EGFR, derivado del ectodomino del oncogéno p185^{neu} (T691stop 25 *neu*), forma heterodímeros con ambos EGFR de longitud completa y un mutante constitutivamente activado, de eliminación extracelular EGFR (Δ EGFR), siendo observada comúnmente esta forma en tumores gliales humanos, particularmente los que tienen un grado patológico más elevado. El crecimiento y transformación de las células de EGFR positivo o EGFR/ Δ EGFR co-expresando células de glioma humano están inhibidos por mutantes de eliminación deficientes en cinasa de p185^{neu}. El complejo receptor heterodimérico localizado superficialmente de mutante T695 30 stop *neu*/EGFR tiene afinidad disminuida para el ligando EGF, cinética de internalización alterada, contenido de fosfotirosina reducido, y actividad reducida de cinasa encimática con respecto a complejos homodiméricos de longitud completa de EGFR y EGFR.

Las rutas específicas que median la transformación oncogénica en células humanas transformadas en EGFR positivo no se han caracterizado por completo. Las oncoproteínas Δ EGFR naturales pueden incrementar la actividad 35 constitutiva de la ruta *Grb2/Shc/Ras* y señalizar por medio de fosfatidil inositol-3 (PI-3) cinasas, presumiblemente por unión a proteínas adaptadoras definidas. Cinasas específicas derivadas por mitógeno de proteínas (MAP), tales como las de la familia c-jun amino terminal cinasa (JNK), pueden ser activadas constitutivamente por receptores Δ EGF oncogénicos independientes de ligando. Si bien se ha observado que los holo-EGFR son débilmente transformantes, 40 solamente de forma dependiente de ligando a elevados niveles de expresión de receptor en fibroblastos, muchos tumores humanos muestran niveles elevados de EGFR, y esto puede contribuir a actividad de cinasa no regulada en células transformadas.

Se diseñaron experimentos dirigidos a determinar si la inhibición específica de señalización con intermedio de EGFR sobreexpresado en células de glioma humano radiorresistentes, alteraría la respuesta fisiológica de estas células con respecto a la inducción de daños genómicos. La irradiación de rayos gamma combinada con la inhibición del receptor *erbB* resultó en un mayor grado de interrupción de crecimiento inducido por la radiación y apoptosis en células 45 normalmente resistentes a la radiación ionizante. La apoptosis incrementada tuvo lugar en células de glioma humano transformadas conteniendo una proteína p53 de tipo salvaje o mutada, y sugirió que mediaban en dicho resultado fisiológico tanto mecanismos dependientes de p53 como mecanismos independientes de p53. Rutas distales con respecto a la interacción inhibitoria específica entre la proteína T691 stop mutante *neu* y el receptor EGF determinan la capacidad 50 de respuesta del tumor a daños genómicos, y estas rutas podrán ser moduladas por asociaciones de receptores próximos. Las rutas inhibitorias específicas iniciadas a nivel de la membrana celular y asociadas con interrupción de crecimiento y/o apoptosis pueden modular los resultados subsiguientes de punto crítico como respuesta a daños en DNA. Estos resultados tienen implicación para el diseño de agentes específicos de receptor capaces de sensibilizar 55 células a terapias citotóxicas y sugieren que la inhibición específica de receptor de *erbB* combinada con tratamientos citotóxicos pueden mejorar la respuesta a los agentes anticáncer.

Material y Métodos

Construcción del Vector

60

La derivación del constructo receptor mutante T691 stop *neu* se ha indicado anteriormente en detalle.

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

65

La línea de células de glioblastoma humano U87MG fue obtenida de Dr. Webster Cavenee (Ludwig Cancer Institute, San Diego, California). Las células de glioma humano U373MG, originalmente aisladas de un astrocitoma anaplástico humano, fueron obtenidas del American Type Tissue Collection (ATCC) (Rockville, MD).

ES 2 270 586 T3

Análisis citométrico de flujo de distribución del ciclo de células

Se realizó tinción de células para citometría de flujo por tratamiento secuencial con una solución de tripsina a 0,003%, seguido de inhibidor de tripsina a 0,05%, solución a 0,01% RNase A, y a continuación ioduro de propidio al 5 0,0416% (PI) y 5 mM de solución tretracloruro de espermina. Cada uno de los tratamientos fue llevado a cabo durante 10 minutos con agitación continuada a temperatura ambiente. Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma. Se llevó a cabo análisis de ciclo de células dentro de dos horas de tinción en un citómetro de flujo Becton-Dickinson FACScan. Se recogieron diez mil eventos para cada muestra y se analizaron los datos utilizando el programa de análisis de ciclo de células ModFIT (Becton-Dickinson, versión 2.0).

Tinción de núcleos y análisis morfológico de apoptosis

Las células fueron aplicadas sobre placas durante un mínimo de 12 horas antes de la irradiación. La irradiación fue llevada a cabo en condiciones idénticas a los ensayos de formación de colonias. Las placas fueron lavadas dos 15 veces con PBS en los tiempos indicados, y fijadas en una mezcla 50:50 de metanol enfriado con hielo/acetona durante diez minutos. Las placas fueron sometidas a tinción subsiguientemente con dihidrocloruro hidratado 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma, St. Louis, MO) en una concentración de 0,1 μ g/ml en PBS. Se confirmó la consistencia entre observaciones en contajes de apoptosis con marcado de extremo de muesca dUTP (TUNEL)-tinción mediado 20 por deoxinucleotidil transferasa de terminal y tres observadores independientes.

Se llevaron a cabo contajes de células dentro de 30 minutos de la tinción y se tomaron fotografías en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioplan. Se contaron para cada muestra, como mínimo, tres campos independientes de 100 células.

Ensayo de Formación de Colonias

Se evaluó la supervivencia de células después de la irradiación por ensayo de formación de colonias. El número de células a aplicar se calculó para formar de 20 a 200 colonias por platillo en cada dosis de radiación y se aplicaron en platillos de cultivo de 10 cm (Fisher Scientific, Pittsburg, PA). Las células se irradiaron utilizando un irradiador 30 J.L. Shepherd model 30 Mark I de Cesio-137 suministrando 12,8 Gy/min con las células sobre una plataforma rotativa para asegurar irradiación uniforme. Las células fueron incubadas después de irradiación a 37°C con 5% CO₂ durante 7-10 días y a continuación se sometieron a tinción con cristal violeta. Las colonias conteniendo más de 50 células fueron contadas con un microscopio de disección. La fracción superviviente es la relación del número de colonias formadas con respecto al número de células aplicadas, y se corrigió en cuanto a eficacia de aplicación. Como mínimo, 35 tres concentraciones de células distintas se utilizaron para cada dosis de radiación.

Transferencia Western

Para cada punto de tiempo se recogieron 10⁵ células por cada placa de 6 cm por lisis en 400 μ l de tampón de muestra (10% glicerol, 2% SDS, 100 mM DTT, 50 mM Tris, pH 6,8). Se cargaron 30 μ l de cada lisado por vía y se separaron por electroforesis sobre un gel de 15% SDS-poliacrilamida antes de transferencia en una noche a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA). Las membranas fueron sometidas a prueba con anticuerpo monoclonal p53 antihumano de ratón (NeoMarkers, Fremont, CA.), seguido de anticuerpo secundario de antirratón de cabra acoplado a peroxidasa de rábano (Amersham, Arlington Heights, IL). A efectos de reducir la unión de anticuerpo de fondo se llevó a cabo incubación con anticuerpo secundario en leche en polvo a 2,5% en PBS. La detección fue llevada a cabo por quimioluminiscencia (ECL, Amersham, Arlington Heights, IL). Se determinaron los niveles relativos de expresión p53 por escaneado de las transferencias utilizando un densímetro de exploración (Molecular Dynamics).

Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal 7.16.4 reactivo contra el ectodomio p185neu se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos anti-ERK y anti-JNK fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anticuerpos policlonales reactivos con p53 y p21 fueron obtenidos de NeoMarkers (Fremont, CA.). Anticuerpos reactivos con bcl-2, bax, 55 y bcl-x_L fueron obtenidos de Oncogene Science (Uniondale, N.Y.).

Resultados

Distribución del ciclo de células de células de glioblastoma humano en ciclos con irradiación gamma: efectos de desactivación de señalización de erbB en la interrupción del crecimiento

Para ambas células U87MG y U87/T691, el tratamiento prolongado con suero solo (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. Las células U87/T691 mostraron una fracción G0/G1 mayor que las células parentales U87MG en presencia 65 de suero o después de carencia prolongada de suero, indicando que la interrupción de crecimiento incrementada relativamente inducida por la expresión del receptor mutante T691 stop *neu* no podía superar por crecimiento en suero completo.

La inducción de interrupción de crecimiento por exposición de poblaciones de células gliales humanas transformadas con ciclo asíncrono a irradicación gamma fue superior que la inducida por supresión de suero de forma prolongada solamente. En ambas células U87MG y U87GM/T691 la irradiación de células cultivadas bajo condiciones de crecimiento de suero completo provocaron fuertes incrementos de G0/G1 y G2/M, y la disminución en el porcentaje de células en fase S, determinado por tinción de flujo citométrico para contenido de DNA (figura 1B y 1D). La reducción de la fase S y la acumulación de células en G2 son características de células con daños en el DNA. Los datos de las figuras 1A, 1B, 1C y 1D muestran un experimento representativo de células analizadas 72h después de irradiación por rayos gamma. Los puntos de tiempo anteriores indicaron tendencias similares, pero se escogió el análisis 72h después de la irradiación para ser consistente con los experimentos subsiguientes. Un análisis de tres experimentos independientes reveló los siguientes cambios en la distribución de ciclo de las células (porcentaje medio de células \pm SEM; \pm tratamiento de radiación [RT]):

1.) células parentales U87MG:

15 G0/G1:26 \pm 2,8, +RT 51,5 \pm 2,1;

S:66 \pm 4,2, +RT 21 \pm 2,8;

20 G2/M:8 \pm 1,4, +RT 28,5 \pm 0,7

2.) células U87/ T691:

25 G0/G1:34,5 \pm 4,9, +RT 71 \pm 7,1;

S:57,5 \pm 4,9, +RT 16 \pm 4,2;

G2/M:7,5 \pm 0,7, +RT 12,5 \pm 3,5

30 Las células U87/T691 mostraron una fracción G0/G1 más elevada y poblaciones reducidas S y G2/M en comparación con células de glioblastoma parental cuando se cultivan de manera asíncrona en cultivos con o sin tratamiento de radiación y la diferencia mayor tuvo lugar en la población G0-G1. Los incrementos inducidos por radiación en la fracción G2/M se apreciaron en ambas células U87MG y U87/T691, si bien en mayor grado, en células parentales U87MG. La combinación de supresión de suero y tratamiento de radiación en estas poblaciones de células no era aditivo y no alteró apreciablemente las distribuciones de ciclo de células en ninguna línea celular con respecto a la 35 observada con tratamiento de radiación con suero completo. Por lo tanto, se observa que la desactivación de la señalización mediada por EGFR induce una interrupción de crecimiento por un mecanismo distinto al observado con supresión prolongada de suero.

40 La inhibición transreceptor sensibiliza las células de glioblastoma humano con respecto a apoptosis inducida por radiación.

45 Las células de glioblastoma humano han demostrado ser especialmente resistentes al tratamiento por radiación experimental y clínicamente. La sobreexpresión de EGFR y/o mutación se ha correlacionado con tumores gliales humanos especialmente agresivos y se ha sugerido que la oncogenicidad era debida a apoptosis reducida *in vitro* e *in vivo*. Se examinó si la inhibición de señalización mediada por EGFR en células de glioblastoma humano por el receptor mutante T691 stop neu podía sensibilizar células a muerte apoptótica de las células.

50 Con supresión prolongada de suero se observó solamente 0-1% de apoptosis en células parentales U87MG por tinción con 4'-6-diamidino-2-fenilindol(DAPI) o tinción TUNEL, lo cual fue menos de lo observado en otros estudios. Las células derivadas de U87MG se observó que no mostraban un pico sub-G0 por análisis citrométrico de flujo después de tinción PI en condiciones que provocan apoptosis, lo que está de acuerdo con otros investigadores. La expresión del inhibidor T691 stop neu en células U87MG resultó solamente en 0-2% de apoptosis con supresión prolongada de suero, con determinación por identificación inmunohistoquímica de núcleos apoptóticos con DAPI.

55 La apoptosis era máxima en estudios repetidos a 72h y este tiempo fue seleccionado para todos los experimentos adicionales. La expresión de la proteína T691 stop neu en el fondo de células U87MG aumentó el nivel de apoptosis inducida por radiación a 23 \pm 7,9% (media \pm SEM) a las 72h en cuatro experimentos independientes en medio de crecimiento completo (figura 2A). La supresión prolongada de suero combinada con radiación resultó en 33 \pm 10,6% apoptosis en células U87/T691 y en 11 \pm 1,5% apoptosis en células parentales U87MG, un incremento comparable en ambas poblaciones por encima del observado con radiación de células en medio de crecimiento completo. Se realizaron experimentos incluyendo evaluación morfológica de apoptosis en células de glioma humano después de irradiación con rayos gamma. Todas las células fueron objeto de tinción con DAPI a las 72h después de haber sido expuestas a radiación gamma. Se observaron los núcleos que mostraban morfología apoptótica. Los cambios morfológicos de exudados ("blebbing") nucleares y fragmentación, que son características de apoptosis, se muestran por análisis inmunohistoquímico de células de cultivo derivadas de U87MG con tinción con DAPI. Los índices apoptóticos representan una subrepresentación de la muerte celular total después de radiación en células U87MG/T691 dado que los inventores fueron incapaces de examinar células flotantes inmunohistoquímicamente.

ES 2 270 586 T3

Supervivencia clonogénica de células de glioblastoma humano sometidas a radiación. Los inventores midieron el número de células que escapan la interrupción de crecimiento o muerte y que son capaces de continuar formando una colonia, ensayo habitualmente utilizado para determinar radiosensibilidad. En ciertos casos, los ensayos de crecimiento clonogénico no se han correlacionado con la sensibilidad a la radiación de quimioterapia, presumiblemente dado que el destino de las células muertas o interrumpidas de forma estable no se determina en este ensayo. Tal como se muestra en la figura 3, las células U87/T691 mostraron sensibilidad incrementada a la radiación en una gama de concentraciones de radiación (2-10Gy). Las células U87/T691 eran aproximadamente medio log más sensibles a la radiación que sus correspondientes parentales no trasfectadas para todas las dosis de radiación objeto de comprobación. Estos resultados fueron confirmados con subclones adicionales expresando T691 stop neu. Las células U87MG y sus derivados contienen proteína p53 y p21 de tipo salvaje.

Relación de la sensibilidad de radiación de células de glioblastoma humano con el estado p53

El estado p53 se ha demostrado que influye la respuesta a radiación ionizante en una serie de tipos de células transformados y no transformados. Se llevó a cabo un análisis de inducción de p53 en células de glioblastoma humano después de irradiación gamma. Se aplicaron 10^5 células U87MG y U87/T691 conteniendo un producto de gen de p53 de tipo salvaje y se irradiaron con rayos gamma (10Gy) después de acoplamiento durante una noche. Los lisados fueron recogidos a los tiempos indicados después de la radiación, sometidos a SDS-PAGE y fueron sometidos a inmunotransferencia con un anticuerpo reactivo con p53. Las células de control eran células de cáncer de mama MCF-7 conteniendo proteína p53 inmunorreactiva. Se observó, de manera continuada, una inducción más energética de la proteína p53 a las 12h después de radiación con rayos gamma en subclones U87/T691. El análisis Western de lisados de células obtenidos en distintos momentos de tiempo después de tratamiento de radiación indicaron persistentes incrementos en niveles de proteína p53 detectados en todo momento entre 6-72h después de radiación, en células U87MG y en sus correspondientes derivados transfectados T691 stop neu. El punto de tiempo cero indica células que fueron sometidas a radiación gamma e inmediatamente sometidas a lisis para análisis. Las densidades de p53 eran comparables, en este momento, a las células de ciclo falsamente irradiadas. Se observó un incremento de 10 veces la densidad de p53 en células U87/T691 12h después de la radiación, en comparación con aumentos solamente de 1,5 a 3 veces en ambas células U87MG y U87/T691 en cualesquier otros puntos de tiempo examinados. Esta tendencia se observó de manera continuada (cuatro experimentos) y fue observada en células U87/T691 de forma temprana, incluso a las 6h después de la radiación en algunos experimentos, y sugiere que las rutas de señalización dependientes de p53 pueden ser más eficazmente activadas por desactivación de EGFR en presencia de daños genómicos. Se han observado alteraciones en proteínas de punto crítico regulado por p53 12h después de la inducción de daños genómicos por radiación gamma. La inhibición de crecimiento y la diferenciación de células de cáncer de mama humano, después del ligado de receptores erbB, se han asociado con activación de una ruta dependiente de p53.

Se indujo p21 en ambas células U87MG y U87/T691 después de tratamiento de radiación, observándose los niveles más elevados 24h después de exposición a la radiación en ambas líneas de células. En ambas células U87MG y U87/T691 la densidad de la proteína p21 6-24h después de radiación era comparable. Si bien otros investigadores han sugerido que la regulación ascendente de bcl-x_L está asociada con apoptosis reducida en células de glioma humano, los inventores no detectaron cambios en la expresión de la proteína bcl-x_L después de radiación en células U87MG y U87/T691. Ambos niveles constitutivo e inducido por radiación de bcl-x_L fueron equivalentes en células U87MG y U87/T691. El examen de 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 con mutación p53

Células de glioma humano U373MG contienen un producto de gen p53 mutado, son deficientes en expresión de p21 y muestran una elevación comparable de células superficiales EGFR a U87MG por análisis citométrico de flujo. Estas células fueron utilizadas para determinar si la apoptosis observada después de inhibición de señalización mediada por EGFR y la radiación gamma era dependiente de una proteína p53 de tipo salvaje. Las células U373MG mostraron incrementos en los niveles de una proteína p53 mutada siguiendo irradiación de rayos gamma, pero no expresan p21 constitutivamente o después del tratamiento de radiación.

El receptor mutante T691 stop neu fue expresado en células de glioma U373MG y confirmó una expresión comparable a células U87/T691 en cuatro subclones U373/T691 por marcado metabólico y análisis citométrico de flujo. La citometría de flujo indicó que los niveles de superficie del receptor T691 stop neu mutante eran equivalentes en subclones U87/T691, U373/T691 cl 1 y U373/T691 cl 12, y dos derivados de U373MG expresando T691 stop neu. Los derivados de U373MG expresando el receptor mutante T691 stop neu eran capaces de interrupción de crecimiento en bajo contenido de suero y mostraron una pradera interrumpida de células confluientes sin el desarrollo de focos transformados morfológicamente *in vitro*, indicando que las proteínas de tipo salvaje p53 y p21 no eran necesarias para interrumpir el crecimiento ni para inhibir la transformación de células de glioma en las que se había desactivado la señalización erbB. Los subclones U373/T691 cl 1 y U373/T691 cl 12 fueron irradiados a continuación junto con células U373MG y mostraron niveles incrementados de apoptosis con respecto a sus equivalentes parentales (figura 2B). En el experimento representativo que se ha mostrado, dos subclones U373/T691 mostraron respectivamente 32% y 59% de apoptosis 72h después de la radiación con rayos gamma, en comparación con 2% de apoptosis en células parentales U373MG y 20% de índice apoptótico en células U87/T691. La desactivación de la señalización de EGFR por expresión de T691 stop neu en dos líneas de células de glioma humano distintas, conteniendo diferencias en los estados p53 y p21, resultó en apoptosis incrementada inducida por radiación. La sensibilización de células de glioma

blastoma humano a daños genómicos puede ocurrir, por lo tanto, en ausencia de proteínas p53 y p21 de tipo salvaje. Considerados en conjunto, estos datos sugieren que ambas rutas, dependiente de p53 e independiente de p53, pueden mediar la sensibilización a muerte celular inducida por una combinación de inhibición transreceptor y daños genómicos. Se debe observar que las células de glioblastoma humano en las que la señalización de EGFR es desactivada, no parecen ser más sensibles a supresión prolongada de suero o a muerte celular mediada por factor α de necrosis tumoral que las células parentales.

Comentario

La inhibición específica de señalización de EGFR que inhibe el crecimiento de células y su transformación sensibilizó también las células de glioma humano radiorresistente frente a daños genómicos inducidos por la radiación. Las células de glioblastoma expresando un receptor mutante transdominante, derivado de p185 neu, mostraron una mayor interrupción de fase G1 y mayores niveles de apoptosis después de la radiación que sus equivalentes parentales. En fibroblastos de mamíferos y en células neuronales especializadas la supresión de suero o de factor de crecimiento puede llevar a la apoptosis en condiciones determinadas. La supresión prolongada de suero sola no indujo apoptosis en células de glioblastoma humano en estos estudios. Para inducir apoptosis se requirió daños en DNA combinados con la desactivación de la señalización de receptor de *erbB* o supresión de suero. Se indujo apoptosis por radiación en 23% de derivados de U87MG y en 32-59% de subclones derivados de U373MG en los que se había desactivado EGFR (en comparación solamente a 1-2% en células parentales) en medio de crecimiento completo, indicando que la inhibición de señalización de EGFR por inhibición de transreceptor no pudo ser superada por el crecimiento en el suero. La supresión de suero combinada con daños por radiación incrementaron los niveles observados de apoptosis en células U87MG y en derivados de glioblastoma humano expresando T691stop neu en el mismo grado. De manera notable, después de daños en DNA la apoptosis observada por desactivación de señalización de receptor *erbB* en la superficie celular era superior a la observada con la supresión de suero.

Se han desarrollado sistemas de supervisión o puntos de comprobación para interrumpir el ciclo de las células cuando han tenido lugar daños en el genoma o en el huso mitótico. El punto de comprobación de daños de DNA funciona de modo diferencial en etapas distintas del ciclo de la célula y requiere la acción coordinada de múltiples productos de gen pleiotrópico involucrados en la interrupción del crecimiento, reparación de DNA, activación de la transcripción y apoptosis. Los puntos de comprobación de daños en el DNA constituyen rutas de transducción de señal que comunican información desde el DNA dañado a componentes del ciclo celular. Los datos presentados en estos estudios muestran que los eventos de señalización mediados por receptor de tirosina cinasa (RTK) pueden influir en las rutas de señalización del punto de comprobación de daños de DNA. En particular, la inhibición del EGFR en células de glioma humano malignas puede incrementar el grado de interrupción de crecimiento y apoptosis observados después de daños de DNA provocados por rayos X.

La resistencia de las células irradiadas por rayos gamma está afectada por el estado funcional de oncógenos distintos. La expresión de *Ras* o *Raf* oncogénico disminuye la radiosensibilidad en células NIH3T3 y la expresión del *Ras^H* más cualquiera de los oncogenes c- o v-*myc* confirió resistencia a fibroblastos de embrión de rata expuestos a radiación de rayos gamma. También es cierto que la expresión de diferentes oncogenes puede sensibilizar células a apoptosis en la exposición a suero bajo o agentes anticancerosos. El retraso de división que tiene lugar en ambas fases G1 y G2 del ciclo celular está influido por la expresión de oncoproteínas dominantes, tales como *H-ras*. La expresión de la proteína de tipo salvaje p53 ha sido asociada con una menor supervivencia después de irradiación con rayos gamma debido a la inducción de una fracción más elevada de apoptosis sobre células que contienen una proteína p53 mutada. No obstante, las células tumorales conteniendo una proteína p53 mutada y células linfoides proliferantes derivadas de ratones p53-/ se ha demostrado que sufren una apoptosis después de radiación, sugiriendo mecanismos independientes de p53 de muerte celular después de daños genómicos.

Los factores que median el grado de interrupción de crecimiento con respecto a apoptosis observados después de daños en DNA en un tipo de células específicas no se han definido, y los factores específicos de células que influyen en la detección de daños de DNA, recuperación de células y la decisión de apoptosis no se comprenden de manera completa. Los mecanismos dependientes de p53 pueden influir en la respuesta de células de glioma inhibidas en sufrir interrupción relativa de crecimiento y/o apoptosis. Los resultados en células derivadas de U373MG indican también que la muerte de células apoptóticas que tiene lugar después de daños genómicos en células humanas transformadas en las que la señalización de EGFR está inhibida, comporta mecanismos que son distintos de las proteínas p53 y p21. Los ratones p21-/ se desarrollan normalmente y no parecen tener defectos en muerte celular programada requerida para desarrollo normal de órganos, indicando que p21 no es probable que sea necesaria para apoptosis. Los ratones p53-/ muestran inestabilidad genética y contienen niveles elevados de c-*myc*. Estos ratones sufren elevados niveles de apoptosis *in vivo*, indicando que mecanismos de apoptosis independientes de p53 son funcionales tanto en tejidos normales como en células transformadas.

De modo interesante, trabajos recientes demuestran que la ausencia de p21 en células de carcinoma colorrectal equilibradas isogénicamente, tuvieron como resultado una interrupción reducida del crecimiento en comparación con derivados positivos de p21 de la misma línea de células, y esto se ha correlacionado a crecimiento de tumor más inhibido *in vivo*. Estas observaciones fueron atribuidas a apoptosis incrementada debido a defectos en la interrupción de crecimiento del punto de comprobación mediado por p21, si bien la tendencia incrementada a apoptosis por las células p21-/ no se demostró directamente en este trabajo. Se sugirió que la inducción de apoptosis era preferible a la interrupción de crecimiento en terapia anticáncer *in vivo*. En los estudios de los inventores, a diferencia de los de

ES 2 270 586 T3

Waldmann y otros (1997), existía correlación entre apoptosis, interrupción incrementada del crecimiento y reducción de supervivencia clonogénica después de la radiación.

En ciertas circunstancias, particularmente en células de cáncer, se puede favorecer la apoptosis después de daños genómicos si existen defectos en rutas que median en la interrupción del crecimiento. De manera adicional, incluso en el caso en que las células son capaces de sufrir interrupción de crecimiento y apoptosis, tal como en las células humanas U373MG deficientes en p21 en las que se ha desactivado la señalización EGFR, las células pueden ser inducidas a apoptosis después de ciertas señales, tales como radiación, presumiblemente por activación de rutas específicas. Los datos de los inventores indican que la proporción relativa de la interrupción de crecimiento o de apoptosis inducidas por daños genómicos está influida tanto por la integridad de los puntos de comprobación específicos como por alteraciones en las rutas de señalización de *erbB*. De modo notable, la modulación de las rutas de señalización RTK puede influir en los resultados de los puntos de comprobación después de daños en DNA en células transformadas. Otros investigadores han demostrado que la activación de rutas de señalización de *erbB* en células de cáncer de mama contribuye a la radiorresistencia, sugiriendo que las rutas de señalización de la familia de *erbB* influyen en la respuesta a los daños en DNA en muchos tipos de tumor. Combinando la inhibición biológica de señalización con agentes capaces de inhibir específicamente oncoproteínas receptoras de la familia de tirosina cinasa, se puede ser capaz de influir en la cinética de la respuesta de las células tumorales a los agentes citotóxicos estándar. La temporización de la administración de terapias citotóxicas se puede optimizar en dichas terapias de combinación y estos datos requieren que se podrían mejorar los efectos antitumorales selectivos de los tratamientos anticáncer actualmente existentes, incluso en el tratamiento de enfermedades malignas humanas avanzadas, conteniendo alteraciones en múltiples rutas de transducción de señal de punto de comprobación.

Ejemplo 6

25 *Adenovirus recombinante*

Los adenovirus recombinantes según algunas realizaciones de la presente invención son desactivados por eliminación de Ela y Elb, que se requieren normalmente para activar la expresión de otros genes víricos. Estos adenovirus recombinantes, que se basan en Ad5 humano, son capaces de efectuar la eficaz transducción de genes en hepatocitos humanos sin efectos citopáticos aparentes ni expresión de proteínas adenovíricas. La construcción de adenovirus recombinantes que se puede adaptar para utilización en la presente invención se describe en Kozarsky y otros, 1993 Somatic Cell and Molecular Genetics 19(5):449-458, que se incorpora a la presente descripción a título de referencia. Dicha referencia muestra adenovirus recombinantes con un inserto o postizo IacZ. El inserto o postizo IacZ puede ser sustituido por secuencias que codifican proteínas que dimerizan *erbB*, deficientes en tirosina cinasa, de acuerdo con la invención. El constructo de gen de la invención es insertado en una secuencia de enlace en el lugar del inserto o postizo IacZ.

Materiales y Métodos

40 Adenovirus Recombinantes. Los plásmidos utilizados para generar el recombinante, adenovirus Ad.CBlacZ y Ad.CBhLDLR con eliminación de E1 fueron construidos del modo siguiente. El plásmido CMV β AIacZ(10) fue sometido a digestión con SnaB1 y NheI, y gag β AhLDLR(16) se sometió a digestión con NheI y, a continuación, a digestión parcial con XhoI para aislar un fragmento contenido el promotor β -actina y el gen IacZ, o bien el cDNA receptor de LDL humano. Estos fragmentos se hicieron romos en sus extremos por Klenow. El plásmido pAdCMV-lacZ (17) fue sometido a digestión con SnaBI y NotI para eliminar el promotor CMV y gen IacZ (reteniendo el promotor CMV), transformado en extremo romo por Klenow, y ligado con insertos que contenían el promotor de β -actina fusionado a cualquiera de los genes IacZ o LDLR. Los vectores resultantes fueron designados respectivamente a pAdCBlacZ y pAd-CBhLDLR.

50 Los plásmidos fueron linealizados con NheI y cotransfectados en células 293 con DNA adenovírico de tipo salvaje (cepa sub 360(18) que contiene una eliminación parcial E3) que habían sido sometidas a digestión con XbaI y GlaI para eliminar el 5'ITR. Se aislaron adenovirus recombinantes después de la transfección (19), se sometieron a dos rondas de purificación de placa, y se purificaron los lisados por centrifugación con cloruro de cesio (20). Los materiales víricos fueron evaluados para concentraciones con ensayo de placa con limitación de dilución en células 293 y almacenados a 20°C después de dilución cuatro veces con 10 mM Tris Cl, pH 8.1, 100 mM NaCl, albúmina de suero bovino al 0.1%, y glicerol al 50%. Las concentraciones de los materiales de glicerol fueron: Ad.CBlacZ, 2,4 x 10⁹ unidades formadoras de placas (PFU)/ml; Ad, CvhLDLR, 4x10⁹ PFU/ml; tipo salvaje Ad, 8x10⁹ PFU/ml.

60 Los constructos de genes de acuerdo con la invención son insertados en lugar de las secuencias IacZ en una secuencia de enlace en el plásmido.

Ejemplo 7

65 *Adenovirus recombinante*

Los adenovirus recombinantes según algunas realizaciones de la presente invención son desactivados por eliminación de los genes E1 y E4, que son normalmente requeridos para activar la expresión de otros genes víricos. Estos adenovirus recombinantes, que se basan en Ad5 humano, son capaces de la transducción muy eficaz de genes en

hepatocitos humanos sin aparentes efectos citopáticos o expresión de proteínas adenovíricas. La construcción de adenovirus recombinantes que se pueden adaptar para la utilización en la presente invención se describe en WO96/3953. Esta referencia indica adenovirus recombinantes con un inserto IacZ. El inserto IacZ puede ser sustituido por secuencias que codifican proteínas dimerizantes de *erbB* deficientes en tirosina cinasa, de acuerdo con la presente invención.

5 El constructo de genes de la invención es insertado en una secuencia de enlace en el lugar del inserto IacZ.

La figura 4 es un mapa esquemático de los adenovirus recombinantes H5.001CBLacZ, con lugares indicados de restricción de la enzima endonucleasa. Las barras estriadas representan el minigen CBLacZ; la barra negra representa el núcleo vírico Ad5, la barra con rayado representa eliminación Ad E4.

10 Las nuevas líneas celulares envolventes posibilitan la producción de adenovirus recombinantes con eliminación funcional en los genes E1 y E4.

15 La región primitiva 4 (E4) del serotipo de adenovirus 5 consiste en 7 marcos de lectura abierta (ORF) que se cree que están involucrados en la replicación de DNA vírico, anulación de las células huésped ("shut-off"), y acumulación tardía de mRNA. Para generar adenovirus recombinantes (Ad) eliminados en E4, se debe suministrar la función de la

región E4 al virus recombinante por un virus "helper" o una línea celular envolvente.

20 Para evitar este problema, la línea de células envolvente contiene el gen Ad5 E1 que solamente el ORF6 del gen Ad5 E4. El ORF6 de E4, solo, puede satisfacer las exigencias para E4 en el ciclo de vida vírico. El ORF6 es preferible, además, en el control transcripcional de un promotor inducible, tal como el promotor de metalotionina de oveja, inducible por zinc, o el promotor de virus de tumor mamario de ratón (MMTV), inducible por un glucocorticoide, particularmente, dexametasona.

25 Despues de haber transfecido el vector de traslación deseado "shuttle" conteniendo las secuencias adenovíricas a la línea celular, se puede inducir la expresión de la E4 ORF 6 por el inductor apropiado.

30 En una forma preferente, la línea celular envolvente es un riñón embrionario humano (HEK) 293 E1 que expresa la línea celular en la que se introduce la secuencia E4 ORF6 bajo el control de un promotor inducible. El promotor MMTV con inductor glucocorticoide es preferible en la actualidad porque el inductor de sulfato de zinc o el promotor MT pueden ser tóxicos con respecto a las células.

35 La indicación específica de la construcción de las líneas celulares envolventes que contienen solamente la región ORF6 de Ad5 E4 o, a efectos de comparaciones funcionales, la totalidad de la región E4 se explica más adelante. Descrito de modo breve, se obtiene la totalidad de la región E4 y una secuencia ORF6 del gen Ad E4 por técnicas conocidas (ver, por ejemplo, Sambrook y otros, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual.", 2d edit., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989) y referencias que se citan en dicho trabajo). Para aislar la región ORF6, se utilizó la técnica de reacción de la cadena de polimerasa anclada para amplificar la secuencia ORF6 de su codón inicial hasta el codón terminal. Se utilizan cebadores seleccionados de la secuencia publicada de ORF6 para amplificar la secuencia 40 ORF e insertar lugares de restricción en el final de la secuencia. La totalidad de la secuencia de gen E4 incluyendo la secuencia E4 ORF6 está publicada en la secuencia Genbank de Ad5 (Genbank Accession Nº M73260).

45 Se ha construido un minigen que ha colocado la secuencia ORF6 bajo el control de un promotor seleccionado. El gen de secuencia ORF6 está enlazado operativamente a componentes reguladores de manera que permite su transcripción. Estos componentes incluyen elementos reguladores convencionales, tales como un promotor para activar la expresión ORF6. Un promotor inducible era un promotor de metalotionina de oveja (MT) inducible Zn^{+2} (M.G. Peterson y otros, *Eur. J. Biochem.*, 174: 417-424 (1988)). El segundo promotor es el promotor de virus de tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona.

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

55 El minigen que contiene ORF6 es subclonado en un plásmido de desplazamiento basado en pBR322 que contenía un gen de resistencia a la neomicina, con el resultado de un vector de desplazamiento ("shuttle").

Los E1/E4 ORF6 que expresan líneas de células envolventes son útiles en la generación de adenovirus con eliminación E1/E4 recombinantes.

Adenovirus recombinantes

60 La nueva línea de células de expresión E1/E4 es útil en la construcción adicional de los adenovirus recombinantes con eliminación E1/E4 conteniendo cualquier transgen seleccionado. Los adenovirus recombinantes son capaces de facilitar un gen adecuado a células de mamíferos y tejidos. Estos adenovirus recombinantes son eliminados funcionalmente como mínimo en las regiones de genes E1a, E1b y E4 Ad. Por el término "eliminado funcionalmente" se indica que una cantidad suficiente de la región del gen es eliminada o dañada de otro modo, por ejemplo, por mutación o modificación, de manera que la región de gen ya no es capaz de producir los productos de expresión de gen. En caso deseado, se puede eliminar la totalidad de la región de gen.

De manera similar, los métodos utilizados para la selección de secuencias víricas útiles en un vector, el clonado y construcción del “minigen” y su inserción en un vector de desplazamiento vírico deseado y la producción de un virus infeccioso recombinante, se encuentran dentro de la capacidad técnica proporcionada por la materia que se da a conocer en esta descripción.

5

Construcción del “minigen” que contiene el transgen

Un minigen en este contexto se define tal como se ha indicado anteriormente, excepto que los componentes de este minigen están diseñados para expresar el gen producto *in vivo*. Estos componentes incluyen elementos reguladores convencionales necesarios para activar la expresión del transgen en una célula transfectada con el virus recombinante. Para este minigen, un promotor seleccionado es enlazado operativamente al transgen y localizado, con otros elementos reguladores, dentro de las secuencias víricas seleccionadas del vector recombinante. La selección del promotor es una materia de rutina y no es limitación de la presente invención. Los promotores útiles pueden ser promotores constitutivos o promotores regulados (inducibles) que posibilitarán el control de la cantidad de transgen a expresar. Por ejemplo, un promotor deseable es el del promotor/amplificador previo inmediato de citomegalovirus (CMV) (ver, por ejemplo, Boshart y otros, *Cell*, 41:521-530 (1985)).

Otro promotor deseable incluye el promotor/amplificador del virus de sarcoma de Rous LTR. Otra secuencia de promotor/amplificador es el promotor citoplásmico de β -actina (CB) de pollo (T.A. Kost y otros, *Nucl. Acids Res.*, 11 (23):8287 (1983)). Otros promotores adecuados pueden ser seleccionados por un experto en la materia.

Producción de adenovirus recombinante

Las secuencias de adenovirus útiles en esta invención pueden incluir secuencias de DNA de una serie de tipos de adenovirus que se pueden conseguir de Genbank, incluyendo el tipo Ad5 (Genbank Accession Nº M73260). Las secuencias de adenovirus pueden ser obtenidas por cualquier serotipo de adenovirus conocido, tal como los serotipos 2, 3, 4, 7, 12 y 40, e incluyendo cualquiera de los 41 tipos humanos actualmente identificados.

De manera similar, se pueden utilizar también en los constructos de vector de la presente invención adenovirus conocidos para infectar otros animales. La selección del tipo de adenovirus no se anticipa que limite la siguiente invención. Una serie de cepas de adenovirus se encuentran a disposición de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, o se encuentran a disposición solicitándolos a una serie de fuentes de tipo comercial e institucional. En la siguientes realización a título de ejemplo se utilizó, a efectos de mayor comodidad, un adenovirus de tipo 5 (Ad5).

Un adenovirus según la presente invención contiene la eliminación funcional del gen previo E1a (que abarca mu 1,3 a 4,5) inmediatamente previo adenovírico y el gen previo retrasado E1b (que abarca mu 4,6 a 11,2). De manera similar, el adenovirus tiene una eliminación funcional de la región E4 (que abarca mu 92 a 97,2), o como mínimo de ORF6 de la región E4.

Se pueden obtener adenovirus recombinantes a título de ejemplo a utilizar en esta invención, por ejemplo, por recombinación homóloga de fragmentos deseados de varios adenovirus recombinantes, técnica que ha sido utilizada habitualmente para generar otros adenovirus recombinantes para utilización en terapia de genes. El adenovirus recombinante, H5.001 CBLacZ, está construido por recombinación homóloga entre el núcleo vírico de adenovirus d11004 (también H5d11004) y el DNA del minigen pAdCBLacZ. El H5d11004 es un virus Ad5 eliminado desde aproximadamente la unidad de mapa 92,1 a la unidad de mapa 98, es decir, sustancialmente la totalidad del gen E4. El virus d11004 se describe en Bridge and Ketner, *J. Virol.*, 63(2):631-638 (febrero 1989).

El vector pAdCBLacZ es un plásmido cDNA que contiene Ad m.u. 0-1, una eliminación E1 en la que se inserta un gen de β -galactosidasa bacteriana bajo el control de un promotor de β -actina de pollo, con otros elementos reguladores tal como se describe más adelante, y flanqueado por Ad m.u. 9-16 y una secuencia de plásmido.

Nuevos E1a/E1b y E4 que expresan líneas de células envolventes

Construcción de plásmidos pMTE4ORF6 que expresan E4 ORF6

Un ejemplo de plásmido útil para la construcción de una línea de células envolvente de la presente invención es pMTE4ORF6, que contiene un promotor de metalotionina de oveja (promotor MT) en control de la transcripción de una secuencia de gen E4 ORF6 humana, un terminador de hormona de crecimiento (GH), un origen de replicación SV40, secuencias de plásmidos procedentes de plásmidos basados en pBR322 incluyendo el gen de resistencia a la neomicina, un lugar de poliadenilación SV40 y un gen de resistencia a la ampicilina.

Los diferentes fragmentos funcionales de este plásmido pueden ser sustituidos fácilmente con otras secuencias convencionalmente utilizadas y no son críticas para el diseño del plásmido pMMTVE4ORF6.

Otro ejemplo de plásmido útil para la construcción de una línea de células envolvente de la presente invención es pMMTVE4ORF6, que contiene un promotor de virus de tumor mamario de ratón (MMTV) en control transcripcional de una secuencia de gen humano E4 ORF6, un terminador de hormona de crecimiento (GH), un origen de replicación SV40, secuencias de plásmidos procedentes del plásmido pBR322, incluyendo un gen de resistencia a la neomicina y

ES 2 270 586 T3

un gen de resistencia a la ampicilina. Los diferentes fragmentos funcionales de este plásmido pueden ser sustituidos fácilmente por otras secuencias utilizadas convencionalmente y no son críticos para el diseño del plásmido.

Promotor E4 endógeno pLTR.E4(-)

5 Un plásmido utilizado como control para la construcción de una línea de células envolvente de la presente invención es pLTR.E4(-). Este plásmido contiene el MLV LTR retrovírico constitutivo y la mayor parte de región de gen Ad E4 excepto que faltan el promotor E4 endógeno y una parte de E4 ORF1. Las otras secuencias de plásmidos siguen siendo las mismas que se han descrito.

Promotor E4 endógeno pLTR.E4(+)

10 Otro plásmido adicional es pLTR.E4, que contiene el MLV LTR y el promotor E4 endógeno y un gen E4 intacto. Las otras secuencias de plásmidos siguen siendo las mismas que se han descrito anteriormente.

Transfecciones y selecciones de clones

15 Cada uno de los plásmidos anteriormente descritos fue transfectado por la técnica de precipitación de fosfato cálcico en una línea celular embrionaria de riñón humano 293 (ATCC CRL 1573) que expresa el producto de los genes E1 de adenovirus, sembrados en placas de 100 mm (10 µg de plásmido/placa). 24 Horas después de la transfección las células fueron recogidas y sembradas con diluciones variables (1:10 - 1:100) en platos de 100 mm durante unos 10 días. Los medios de sembradura contienen G418 (Geneticin, BRL) a una concentración de 1 mg/ml. Las colonias resistentes que se desarrollaron fueron seleccionadas utilizando los siguientes ensayos y se expandieron. Los análisis preliminares de clones se basaron en la eficacia de transducción mejorada de un virus adeno-asociado recombinante, 20 AV.CMV-LacZ, y localización por inmunofluorescencia de la proteína Ad Er tal como se indica a continuación. Ensayo de ampliación de la transducción de AV.CMVLacZ.

25 Se necesitan los productos de genes E1 y E4 Ad para la función del virus adeno-asociado recombinante (AAV). Este ensayo primario comporta el sembrado de las líneas de células envolventes del Ejemplo 1 en placas de cultivo de 35 mm de 96 pocillos (2x10⁶ células/pocillo) e infectando las células con AV.CMVLacZ, tratado térmicamente y purificado con un MOI de 1000 partículas de virus/célula.

Preparación de AV.CMVLacZ

30 35 Se preparó un virus recombinante AAV por técnicas de ingeniería genética convencional para el objetivo de este experimento. El AAV recombinante es generado por transfecciones de plásmido en presencia de adenovirus helper (Samulski y otros, J. Virol., 63:3822-3828 (1989)). Un plásmido con actuación cis pAV.CMVLacZ se deriva de psub201 (Samulski y otros, J. Virol. 61:3096-3101 (1987)) y contiene minigen *E. coli* β galactosidasa en lugar de genes AAV Rep y Cap. La organización 5' a 3' del genoma recombinante AV.CMVLacZ (4,9 kb) incluye

- 40 (a) el 5'AAV ITR (bp 1-173) fue obtenido por PCR utilizando pAV2 (C.A. Laughlin y otros, Gene, 23:65-73 (1983)) como plantilla;
- 45 (b) un amplificador/promotor de CMB inmediato previo (Boshart y otros, Cell, 41:521-530 (1985));
- (c) un intron SV40;
- (d) cDNA de *E. coli* beta-galactosidasa;
- 50 (e) una señal de poliadenilación SV40 (un fragmento de restricción 237 Bam Hi-BcII que contiene señales de desdoblamiento/poli-A de ambas unidades de transcripción previa y posterior; y
- (f) 3'AAV ITR, obtenido de pAV2 como fragmento SnaBI-Bg1II. Se disponen genes Rep y Cap por el plásmido de acción trans pAAV/Ad.

55 55 Se infectan monocapas de células 293 cultivadas hasta confluencia 90% en platos de cultivo de 150 mm (5x10⁷ células/plato) con H5.CBALP a un MOI de 10. El H5.CBALP (también llamado H5.010ALP) es un adenovirus recombinante que contiene un minigen de fosfotasa alcalina en lugar de secuencias de gen de adenovirus E1A y E1b (unidades de mapa 1-9,2 de la secuencia Ad5 de GenBank (Accession No.M73260)). El cDNA de fosfotasa alcalina se encuentra bajo control de transcripción del promotor β-actina amplificado por CMV en este virus. Este virus helper se describe en Goldman y otros, Hum. Gene Ther., 6:839-851 (Julio, 1995); Engelhardt y otros, Hum. Gene Ther., 5:1217-1229 (Octubre, 1994); y referencias que se citan en esta descripción.

60 65 Las infecciones son realizadas en medio de Eagles Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 2% de suero fetal bovino (FBS) a 20 ml de medio/plato 150 mm. Dos horas después de la infección, se añaden 50 µg de DNA plásmido (37,5 µg transaccional y 12,5 µg de acción cis) en 2,5 ml de cocktail de transfección a cada plato y se distribuyen de manera uniforme. Las transfecciones están basadas en fosfato cálcico, tal como se describe (B. Cullen, Meth. Enzymol., 152:684-704 (1987)). Las células se dejan en este estado durante 10-14 horas, después de lo cual

ES 2 270 586 T3

el medio de infección/transfección es sustituido con 20 ml de DMEM/2%FBS reciente. Cuarenta a cincuenta horas después de la transfección, se recogen las células suspendidas en tampón 10 mM Tris-Cl (pH 8,0) (0,5 ml/plato 150 mm) y se prepara un lisado por sonicación. El lisado es llevado a 10 mM de cloruro de manganeso, después de lo cual se añaden de Dnase I pancreático bovino (20.000 unidades) y Rnase (concentración final 0,2 mg/ml), y la reacción se 5 incuba a 37°C durante 30 minutos. Se añade deoxicolato sódico hasta una concentración final de 1% y se incuba 37°C durante otros 10 minutos adicionales.

El lisado tratado es enfriado sobre hielo durante 10 minutos y se añade CsCl sólido hasta una densidad final de 1,3 g/mL. El lisado es llevado a un volumen final de 60 ml con una solución de 1,3 g/ml CsCl en 10 mM Tris-Cl (pH 8,0) 10 y se divide en tres partes alícuotas iguales. Cada una de las muestras de 20 ml es aplicada en capas sobre un gradiente escalonado de CsCl compuesto de dos fracciones de 9,0 ml con densidades de 1,45 g/ml y 1,60 g/ml.

La centrifugación se lleva a cabo a 25.000 rpm en un aparato Beckman SW-28 de rotor durante 24 horas a 4°C.

15 Las fracciones que contienen concentraciones máximas de virus AV.CMVLacZ funcional se combinan y se someten a tres rondas secuenciales de sedimentación de equilibrio en CsCl. La selección de rotor incluye un aparato Beckman NVT-90 (80.000 rpm durante 4 horas) y SW-41 (35.000 rpm durante 20 horas). En el equilibrio, aparece el AV.CMVLacZ como banda opalescente a 1,40-1,41 g/ml CsCl. Las densidades se calculan a partir de mediciones del índice de refracción. El vector purificado es intercambiado a tampón HEPES 20 mM (pH 7,8) conteniendo 150 mM 20 NaCl (HBS) por diálisis y se almacena congelado a -80°C en presencia de 10% de glicerol o como material líquido a -20°C en HBS/glicerol 40%.

25 Se comprueba virus purificado para la contaminación de concentraciones de virus H5.CBALP helper y AV.CMVLacZ. El virus helper es controlado por tinción histoquímica para la actividad de fosfatasa alcalina informante. Una muestra de virus purificado representando 1,0% del producto final se añade a una capa en crecimiento de 30 células 293 sembradas en una placa de 60 mm. Cuarenta y ocho horas más tarde, se fijan las células en una solución salina tamponada (PBS) de 0,5% glutaraldehído/fosfato durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavan en PBS (3x10 minutos) y se incuban a 65°C durante 40 minutos para inactivar la actividad endógena de la fosfatasa alcalina. La monocapa se deja enfriar a temperatura ambiente, se lava una vez brevemente en 100 mM Tris-Cl (pH 9,5)/100 mM NaCl/5 mM MgCl, y se incuba a 37°C durante 30 minutos en el mismo tampón contenido 0,33 mg/ml de cloruro de 35 tetrazolio nitroazul (NBT) y 0,165 mg/ml de sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolifosfato p-toluidina (BCIP). La formación de color es interrumpida por lavado de la monocapa en 10 mM Tris-Cl (pH 8,0)/5 mM EDTA. De manera rutinaria, el esquema de purificación descrito anteriormente elimina todo el virus H5.CBALP helper detectable en la tercera ronda de ultracentrifugación de densidad creciente.

35 Se miden las concentraciones de AV.CMVLacZ de acuerdo con el número de copia de genoma (partículas de virus/ml), absorbancia a 260 nm (A_{260} partículas/ml) y Formación de Unidades LacZ (LFU/ml). Las concentraciones de partículas de virus se basan en transferencia Southern. De forma breve, se trata una muestra de AV.CMVLacZ purificada con tampón de digestión de cápsida (50 mM Tris-Cl, pH 8,0/1,0 mM EDTA, pH 8,0/0,5% SDS/Proteinas 40 K 1,0 mg/ml) a 50°C durante una hora para liberar DNA del virus. Las reacciones se dejan enfriar a temperatura ambiente, se añadió colorante de carga y se sometió a electroforesis con intermedio de gel de agarosa 1,2%. Se resolvieron sobre el gel cantidades estándar del genoma AV.CMVLacZ.

45 Los DNAs son electrotransferidos a una membrana de nilón, hibridados con fragmento de restricción marcado por cebador al azar 32 P, y la transferencia resultante escaneada en un PhosphorImager 445 SI (Molecular Dynamics). Se genera una curva estándar de las formas dúplex y se utiliza para extrapolar el número de genomas de virus en la muestra. Se generan concentraciones de LFU por células indicadoras infectantes con diluciones limitadoras de muestras de virus. Las células indicadoras incluyen HeLa y 293. Veinticuatro horas más tarde, las células son fijadas en glutaraldehído y las células son objeto de tinción histoquímica para actividad *E. coli* β -galactosidasa (LacZ), tal 50 como se describe en la publicación J.M. Wilson y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:3014-3018 (1988). Se describe una LFU como la cantidad de virus suficiente para provocar expresión detectable visualmente de β -galactosidasa en una célula 24 horas después de la infección.

Inducción de Expresión de ORF6

55 La inducción de expresión de ORF6 con 10 μ M de dexametasona o 150 μ M de sulfato de zinc (para control negativo, sin utilizar inductor) se inicia 2 horas antes de la adición de virus y se continúa a lo largo del experimento. Veinticuatro horas después de la adición de virus, se recogen las células, se generan lisados por sonicación y se analizan en cuanto a expresión de β -galactosidasa (es decir, actividad de β -galactosidasa) y DNA del virus, tal como 60 se ha descrito anteriormente. Se preparan extractos Hirt para DNA de bajo peso molecular de extractos de células. La preparación de los extractos Hirt y subsiguiente análisis por hibridación Southern se llevan a cabo recurriendo a procedimientos convencionales conocidos por los técnicos en la materia.

65 En ausencia de inductores, las líneas celulares envolventes generan niveles bajos de β -galactosidasa en células infectadas por rAAV. La inducción de la expresión de ORF6 con la dexametasona inductora tiene como resultado un aumento concomitante de la transducción de células AV.CMVLacZ a un nivel muy superior al de la línea parental 293. La expresión de E1 solamente es insuficiente para tener efecto en el aumento de transducción de rAAV, mediado por adenovirus. Localización de inmunofluorescencia de Proteína Posterior Ad5.

ES 2 270 586 T3

Clones positivos de los ensayos son infectados con el adenovirus H5DI1004 recombinante con eliminación de E4 y se rastrea para complementación de E4 utilizando un ensayo de inmunofluorescencia para expresión de gen posterior. El virus H511004 fue obtenido del Dr. Ketner de la Universidad John Hopkins y se describe en la publicación de Bridge y Ketner, J. Virol., 632(2):631-638 (Feb.1989), que se incorpora a esta descripción como referencia. Dado que 5 ORF6 de E4 complementa la expresión del gen posterior Ad, específicamente la formación del hexón y fibras penton del adenovirus, las líneas celulares que contienen ORF6 son capaces de unión con anticuerpo contra estas proteínas.

Cada una de las líneas celulares es infectada con virus H5d11004 con eliminación de E4 a un MOI de 0,1. Las 10 células son tratadas con anticuerpo monoclonal marcado FITC del anti-adenovirus de ratón a hexón o fibras penton en una dilución 1:10 (Chemicon International Inc., Temecula, CA). Los clones positivos son identificados por reacción con el anticuerpo.

Eficiencia Relativa de Formación de Placas

15 Las líneas celulares demostrando fuerte capacidad de complementación son rastreadas en cuanto a la eficacia relativa de formación de placas de HSd11004 en comparación con células W 162 (línea celular Vero complementando E4 que no expresa E1) (nuevamente Weinberg y Ketner, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80(17):5383-5386 (1983)). Se determina RPE%, es decir, la eficacia relativa de formación de placas, representando la concentración de H5d11004 en las líneas celulares/concentración de H5d11004 sobre células W 162. Por ejemplo, el RPE de las células 293 es 0.

20 Las líneas celulares positivas seleccionadas por todos los criterios se identifican en la siguiente Tabla I, con los resultados de los ensayos.

25

TABLA I

Líneas Celulares Dblemente Complementarias E1/E4						
	Línea Celular	Transgen	Promotor	IF/LP	AV.CMV LacZ	RPE%
30	293-10-3	ORF6	MT	++++	++++	246
35	293-39-11	ORF6	LTR	++++	+++	52
40	293-84-31	E4-	LTR	++++	++++	179
45	293-12-31	E4 completo	LTR + E4	++++	++++	174
	293-27-6	ORF6	MMTV		+++++	327
	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

50 El plásmido pAd.CBLa6Z es construido tal como se ha descrito en detalle en K. Kozarsky y otros, Som. Cell Mol. Genet., 19(5):449-458 (1993), que se incorpora a esta descripción como referencia. Este plásmido contiene un minigen que comprende un lugar de restricción NheI de flanco 5', seguido de secuencia Ad5 m.u. 0-1, seguido de eliminación de E1 en la que se inserta la secuencia amplificadora CMV/promotora de β -actina de pollo (T.A. Kost y otros, Nucl. 55 Acids Res., 11 (23):8287 (1983)), que controla la transcripción de la siguiente β -galactosidasa bacteriana, seguido por una secuencia poli A y con flanco 3' Ad m.u. 9-16 y otro lugar NheI. En el plásmido, el minigen está flanqueado en ambos lados por secuencia de plásmido que contiene marcadores de resistencia al medicamento.

60 El plásmido pAd.CBLa6Z es linealizado con NheI y co-transfectado por el método de co-transfección de fosfato cálcico en la nueva línea celular envolvente con H5d11004 digerida por Clal (secuencia Ad5 eliminada desde unidad de mapa 92.1 hasta unidad de mapa 98, correspondiendo sustancialmente a la totalidad del gen E4).

65 La recombinación homóloga tiene lugar en la línea celular entre estos dos constructos virales entre las unidades de mapa Ad 9-16, resultando en adenovirus recombinante, con designación H5.001 CBLacZ. Este adenovirus recombinante contiene la secuencia aproximadamente desde el nucleotido 1 hasta 4628 de pAd.CBLa6Z y unidades de mapa Ad5 9-92,1 y 97,3 a 100 de H5d11004. Este adenovirus recombinante es sometido, por lo tanto, a eliminación funcional y a sustancial eliminación estructural de los genes Ad E1 y E4.

ES 2 270 586 T3

Se seleccionan y rastrean placas virales por el ensayo de β -galactosidasa, y se aisló H5.001CBLacZ después de tres rondas de purificación de placas. El virus purificado es sometido también a centrifugación de densidad de cloruro de cesio y a producción en gran escala. Para los siguientes experimentos con ratones, el virus es utilizado después de purificación de columna, y se añade glicerol a una concentración final de 10% (v/v). El virus es almacenado a -70°C hasta utilización. Cinética de crecimiento de H5.001 CBLacZ en líneas celulares envolventes.

Las líneas celulares descritas en lo anterior son infectadas con H5.001CBLacZ recombinante a un MOI de 0,5. Se indica en la siguiente tabla II el rendimiento vírico máximo en forma de LFU/ml.

10

TABLA II

15

20

25

30

Línea celular	Rendimiento vírico máximo
293-10-3	2,8 x 10 ¹⁰
293-39-11	9,5 x 10 ⁸
293-84-31	1,1 x 10 ⁹
293-12-31	4,5 x 10 ⁸
293-27-6	2,8 x 10 ¹⁰
293-27-17	2,5 x 10 ¹⁰
293-27-18	2,9 x 10 ¹⁰
293-27-28	1,2 x 10 ¹⁰

Cuando se cultiva en células 293-27-18 (línea celular E4 ORF6 con promotor MMTV inducible por dexametasona), el rendimiento máximo de este virus es de 2,9 x 10¹⁰ LFU/ml. Varias de las líneas celulares se hacen pasar entre 5 y 20 veces, y la producción vírica de los pasos permaneció estable. No obstante, el RPE disminuyó después de pasos repetidos de células.

Los constructos de gen, de acuerdo con la invención, son insertados en lugar de las secuencias lacZ en una secuencia de enlace en el plásmido.

40 Ejemplo 8

Antecedentes

45 Se ha observado que los anticuerpos monoclonales anti-p185^{neu} (mAbs) inhiben el crecimiento de tumores que expresan p185^{neu} de forma dependiente de la dosis *in vitro* e *in vivo*. Combinaciones de anti-p185^{neu} mAbs reactivo con dominios de epítopo distintivos revelaron un efecto inhibitorio sinérgico en la sobreexpresión neu de tumores *in vivo*. Estos estudios han demostrado el potencial de las terapias específicas de oncoproteínas basadas en mAb.

50 La estructura tridimensional de los complejos antígenos-anticuerpo revela que el lugar de unión está definido por 6 regiones hipervariables determinantes de complementariedad (CDR) con estructura de bucle (Peterson y Greene, 1994), pero la especificidad de las interacciones viene conferida por los bucles CDR3. El prer-requisito de conformación y estructura de bucles CDR puede ser imitado por pequeños péptidos cuando la secuencia y estructura de anticuerpos anti-receptores son conocidas.

55 La inhibición de crecimiento celular y la transformación se puede conseguir en células gliales transformadas modulando la señalización de receptor erbB. Estudios recientes de los inventores indican que la inducción de apoptosis puede ser la base de una terapia satisfactoria para cáncer humano. Las células de glioblastoma humano, resistentes a la radiación, en las que la señalización del receptor erbB quedó inhibida por transfección de neu T691 truncado, mostraron una mayor interrupción de crecimiento y apoptosis como respuesta a daños en DNA. La inhibición de señalización de erbB es un potente estímulo para la inducción de apoptosis. Las interacciones del receptor próximo entre miembros receptores erbB influyen, por lo tanto, las rutas de punto de comprobación de ciclo de células activada como respuesta a daños en DNA. Por lo tanto, la desactivación de receptores de erbB puede mejorar la respuesta a radiación gamma y otras terapias citotóxicas.

65 Los datos sugieren que las células de tumor humano radioresistentes, que necesitan una ruta de señalización completa de erbB, pueden ser transformadas en sensibles a la radiación y pueden ser una ruta apoptótica a cualesquiera daños en DNA por inhibición de la ruta de señalización erbB.

ES 2 270 586 T3

Se diseñó CDR4D5 mimético anti-p185^{c-erbB-2}, y se desarrolló y utilizó para investigar si CDR4D5 mimético derivado de anti-p185^{c-erbB-2} Ab puede inhibir la proliferación de células de tumor humano y aumentar la apoptosis después de la irradiación por rayos gamma. Los experimentos llevados a cabo se describen a continuación.

5 Material y método

1. Diseño peptidomimético

Un anticuerpo anti-erbB2, 4D5 se ha demostrado que es eficaz para desmodular el receptor erbB2. Se analiza la estructura cristalina del anticuerpo humanizado (1FVD). Se utilizó como matriz el CDR3 de 4D5. Se generaron varios análogos de péptidos cílicos. Entre los péptidos que se pueden utilizar se incluyen:

15 SEC ID NO: 1 FCGDGFYACYMDV-CONH2
SEC ID NO: 2 FCDGFYACYMDV-CONH2
SEC ID NO: 3 FCDPFYACYMDV-CONH2
SEC ID NO: 4 FCPDGFYACYMDV-CONH2
SEC ID NO: 5 FCDPPFYACYMDV-CONH2
SEC ID NO: 6 FCDGFYACYMDV-CONH2
20 SEC ID NO: 7 FCDPFYACYMDV-CONH2
SEC ID NO: 8 FCDPPFYACYMDV-CONH2
SEC ID NO: 9 FCGDGFYACYMDV-COOH
SEC ID NO: 10 FCDGFYACYMDV-COOH
SEC ID NO: 11 FCDPFYACYMDV-COOH
25 SEC ID NO: 12 FCPDGFYACYMDV-COOH
SEC ID NO: 13 FCDPPFYACYMDV-COOH
SEC ID NO: 14 FCDGFYACYMDV-COOH
SEC ID NO: 15 FCDPFYACYMDV-COOH
30 SEC ID NO: 16 FCDPPFYACYMDV-COOH

2. Líneas celulares

35 Se utilizaron las siguientes líneas de tumor humano que expresan niveles variables de receptor p185^{c-erbB-2}: a) U87MG (p185^{c-erbB-2} no detectable) b) U373MG parental y U373/T691 transfectados T691 expresando p185^{c-erbB-2} bajo-moderado, c) MCF7 expresando p185^{c-erbB-2} moderado, y SKBR3 (alto nivel de p185^{c-erbB-2}).

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

40 Se recogieron células subconfluentes por tratamiento rápido con tripsina (<3 min), y se mantuvieron sobre hielo. Las células fueron lavadas y resuspendidas en tampón FACS (PBS con 0,5% BSA y 0,1% NaAzida) a una concentración aproximada de 2 x 10⁶ células/ml, incubándose luego con los reactivos primarios (anti-p185^{c-erbB-2} Ab) y secundarios (anti-IgG-FITC) durante 30 min, cada uno de ellos a 4°C, con dos lavados entre cada etapa. Despues de 45 tinción, las células fueron resuspendidas en tampón FACS y analizadas inmediatamente. El análisis citométrico de flujo fue llevado a cabo en un aparato Becton-Dickinson FACScan. Las líneas celulares p185^{c-erbB-2} positivas fueron determinadas por la diferencia en la fluorescencia de canal media entre las líneas celulares con tinción con anticuerpo antireceptor y las correspondientes líneas celulares con tinción con los reactivos secundarios solos (anti-IgG-FITC). La homogeneidad de los clones p185^{c-erbB-2} positivos se determinó por el pico de la población de células con tinción 50 positiva alrededor de su eje. Sobre histogramas FACS, la fluorescencia incrementada es indicada por un desplazamiento hacia la derecha del pico positivo, alejándose del pico de fondo. La mayor expresión del receptor en la superficie se correlacionó con el grado de desplazamiento. Se estiman los números de receptor relativos en cada tipo de célula por comparación de la intensidad de fluorescencia media con la de las células con números de copia de receptor conocidos.

55 4. Ensayo de proliferación de células

El ensayo de proliferación fue medido por incorporación de MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol o bromuro]. Se aplicaron las líneas celulares en placas de 96 pocillos (5.000 células/pocillo) en 10% de DMEM con cantidad indicada de CDR4D5 mimético y se incubaron durante 48 horas. El MTT fue suministrado a las células 60 durante 4 horas. Las células fueron sometidas a lisis en 50% SDS/20% dimetil sulfóxido y se mantuvieron durante una noche a 37°C. La proliferación fue evaluada tomando lecturas de densidad óptica a 570 nm, utilizando un lector ELISA. El número de células utilizadas en este ensayo se determinó que se encontraba dentro de la gama lineal para este tipo de célula. 5. Efecto de radio-sensibilización del CDR4D5 anti-p185^{c-erbB-2} mimético, determinado por análisis morfológico de apoptosis.

65 Se permitió la unión de 30.000 células a placas de cubrición durante una noche en placas de 6 pocillos. Las células fueron incubadas con 50 µg/ml de CDR4D5 mimético durante 48 horas antes de la irradiación. Se suministraron 10 Gy de irradiación y las células fueron incubadas a 37°C. Se evaluó la morfología nuclear en los siguientes puntos de

ES 2 270 586 T3

tiempo: 12, 24, 48 y 72 horas después de la irradiación. Las placas de cubrición fueron lavadas dos veces con PBS en los tiempos indicados y se fijaron en una mezcla 50:50 de metanol/acetona enfriado con hielo durante 1 minuto. A continuación se sometieron a tinción las células fijadas con dihidrocloruro de 4',6'-Diamidino-2-fenilindol hidratado (DAPI) (Sigma, ST. Louis, MO) con una concentración de 0,25 ng/ml en PBS y se determinó la evaluación morfológica de núcleos apoptóticos utilizando conteo directo. La correspondencia entre observadores en los conteos de apoptosis se confirmó con marcado (TUNEL)-tinción del extremo de la muesca de dUTP, mediado por desoxinucleotidil transferasa y por análisis de tres observadores independientes.

5 Los conteos de células fueron llevados a cabo dentro de 30 minutos de tinción y se tomaron fotografías en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioplan. Se contaron como mínimo tres campos independientes de 100 células para cada muestra.

Resultados

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

Se utilizó análisis citométrico de flujo para determinar la expresión del receptor p185^{c-erbB-2} de superficie en células de tumor humano. La expresión de receptor de c-erbB-2 de superficie era más alta en SkBR3, moderada en MCF7, de baja a moderada en U373MG, y no detectable en U87MG. La fluorescencia media de SKBR3 era 50 veces la del 20 control y la de MCF7, U373MG, y U87MG eran de 6,5, 2, y 1 veces el control, respectivamente.

2. Inhibición de la proliferación

25 El tratamiento con CDR4D5 inhibió la proliferación de células del tumor en forma dependiente de la dosis y de forma inversamente proporcional a la densidad del receptor p185^{c-erbB-2} de superficie. El CDR4D5 no inhibió la proliferación de células parentales U373MG que no expresan c-erbB-2 y las células U373/T691 fueron inhibidas al 62% con 1 μ g de CDR4D5 mimético. La proliferación de las células MCF7 y SKBR3 fue inhibida al 43%-53%, y 39%-49%, respectivamente, de forma dependiente de la dosis (Figura 5).

30 3. Efecto radiosensibilizante del CDR4D5 mimético anti-p185^{c-erbB-2}

La apoptosis fue máxima a las 72 horas después de radiación en todas las células. El tratamiento con CDR4D5 mimético en células U373MG resultó en un incremento de apoptosis de 20-28% que para células U373MG no tratadas a las 48h y 72h después de la radiación. El efecto del tratamiento de CDR4D5 sobre la apoptosis en células U373MG era comparable con el resultado con neu truncado, un receptor inhibitorio mutante que desactiva la señalización de erbB e induce apoptosis incrementada como respuesta a la radiación (figura 6A). Se observó un efecto radiosensibilizante significativo de CDR4D5 a las 72 horas después de radiación en líneas celulares MCF7 y SKBR3 (figura 6B). Dado que la sensibilidad a la muerte apoptótica de células se correlacionó de forma inversa con los niveles de receptor de superficie p185^{c-erbB-2}, incrementando la cantidad de CDR4D5, de acuerdo con la cantidad de expresión de receptor c-erbB-2 de superficie, se debía mejorar el efecto.

45 Este 4D5 mimético tiene un tamaño reducido, aproximadamente de 1,5KD, péptido resistente a la proteasa específico para receptor humano p185^{c-erbB-2} y es menos inmunogénico que los anticuerpos de longitud completa. El 4D5 mimético muestra la utilización de miméticos anti-receptores en el diagnóstico del cáncer y tratamiento, dando lugar a efectos sinérgicos que se combinan con productos terapéuticos citotóxicos, tales como irradiación por rayos gamma.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de una molécula de ácido nucléico, péptido o anticuerpo en la fabricación de un medicamento para el
tratamiento combinado de un individuo con un tumor mediado por la proteína erbB, comprendiendo dicho tratamiento
combinado la administración de dicho medicamento al individuo en combinación con irradiación anti-cáncer y/o un
5 agente quimioterapéutico anti-cáncer, en la que
- 10 i) dicha molécula de ácido nucleico codifica un péptido que inhibe la formación de dímeros de la proteína
erbB que producen elevada actividad de tirosina cinasa en una célula de tumor,
- 15 ii) dicho péptido inhibe la formación de dímeros de la proteína erbB que producen elevada actividad de tirosina
cinasa en una célula de tumor, y
- 15 iii) dicho anticuerpo inhibe la formación de dímeros de la proteína erbB que porducen elevada actividad de
tirosina cinasa en una célula de tumor.
- 20 2. Utilización, según la reivindicación 1, en la que el individuo tiene un tumor cerebral mediado por la proteína
erbB.
- 20 3. Utilización, según la reivindicación 1, en la que los dímeros de la proteína erbB comprenden como mínimo una
molécula p185.
- 25 4. Utilización, según la reivindicación 1, en la que los dímeros de la proteína erbB comprenden como mínimo una
molécula EGFR.
- 25 5. Utilización, según la reivindicación 1, en la que el tumor es un tumor mediado por p185.
- 30 6. Utilización, según la reivindicación 1, en la que el tumor es un tumor mediado por EGFR.
- 30 7. Utilización, según la reivindicación 6, en la que el tumor en un tumor mediado por EGFR mutante.
- 35 8. Utilización, según la reivindicación 1, en la que el péptido es seleccionado del grupo que consiste en las SEC
ID NOS:1-5 y SEC ID NO:10-13.
- 35 9. Utilización, según la reivindicación 1, en la que el péptido es SEC ID NO:1.
- 40 10. Utilización, según la reivindicación 1, en la que el péptido es SEC ID NO:2.
- 40 11. Utilización, según la reivindicación 1, en la que el péptido es SEC ID NO:3.
- 45 12. Utilización, según la reivindicación 1, en la que el péptido es SEC ID NO:4.
- 45 13. Utilización, según la reivindicación 1, en la que el péptido es SEC ID NO:5.
- 45 14. Utilización, según la reivindicación 1, en la que el péptido es SEC ID NO:10.
- 50 15. Utilización, según la reivindicación 1, en la que el péptido es SEC ID NO:11.
- 50 16. Utilización, según la reivindicación 1, en la que el péptido es SEC ID NO:13.
- 55 17. Utilización de un anticuerpo o un péptido que interrumpe la actividad de cinasa asociada con conjuntos re-
ceptores multiméricos que comprende una proteína erbB en la fabricación de un medicamento a ser administrado en
combinación con radiación anti-cáncer o un agente quimioterapéutico anti-cáncer para el tratamiento de un individuo
que tiene un tumor, de manera que dicho tumor se **caracteriza** por células tumorales que tienen conjuntos receptores
multiméricos que comprenden una proteína erbB que proporciona actividad de tirosina cinasa asociada con un fenotipo
transformado.
- 60 18. Utilización, según la reivindicación 17, en la que dicho tumor se **caracteriza** por células tumorales que tienen:
- 60 a) homodímeros de erbB que son homodímeros EGFR mutantes o homodímeros p185; y/o
- 60 b) heterodímeros erbB que son heterodímeros p185/EGFR, heterodímeros p185/EGFR mutante, heterodíme-
ros p185/erbB3, heterodímeros p185/erb4, o heterodímeros EGFR/EGFR mutante.
- 65 19. Utilización, según la reivindicación 17, en la que el péptido o anticuerpo inhibe la formación de un homodímero
p185.

ES 2 270 586 T3

20. Utilización, según la reivindicación 17, en la que el péptido o anticuerpo inhibe la formación de un homodímero EGFR.

5 21. Utilización, según la reivindicación 17, en la que el péptido o anticuerpo inhibe la formación de un heterodímero de p185 y EGFR.

22. Utilización, según la reivindicación 17, en la que la célula tumoral es una célula tumoral p53(+).

10 23. Utilización, según la reivindicación 17, en la que la célula tumoral es una célula tumoral p53(-).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 270 586 T3

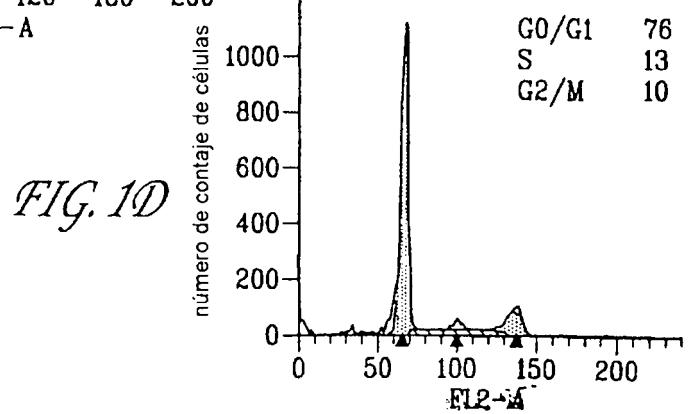
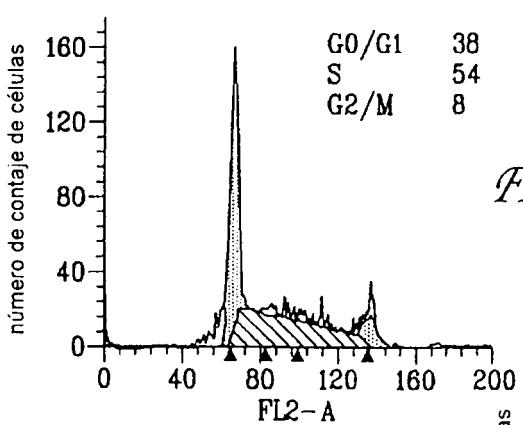
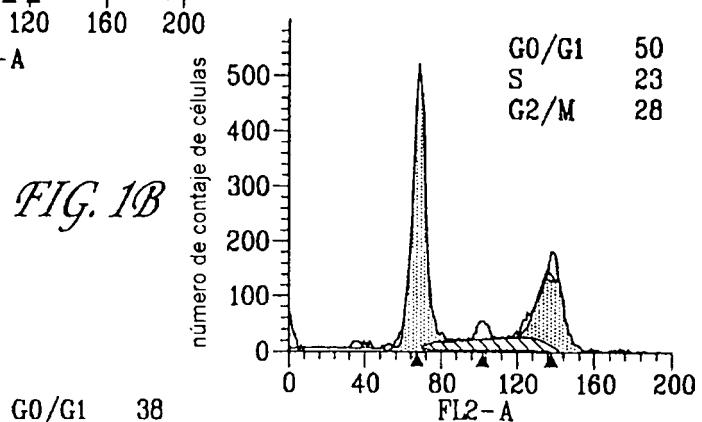
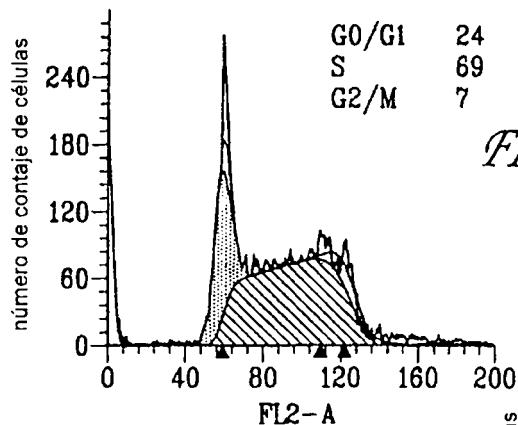


FIG. 2A

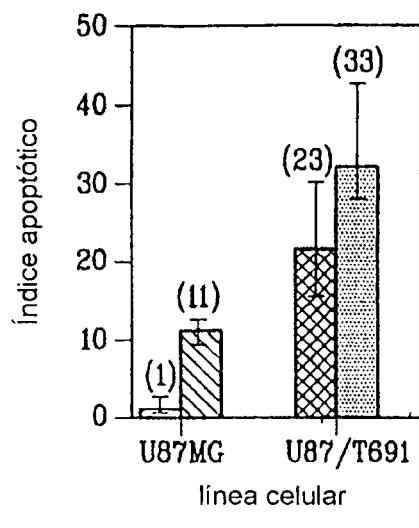


FIG. 2B

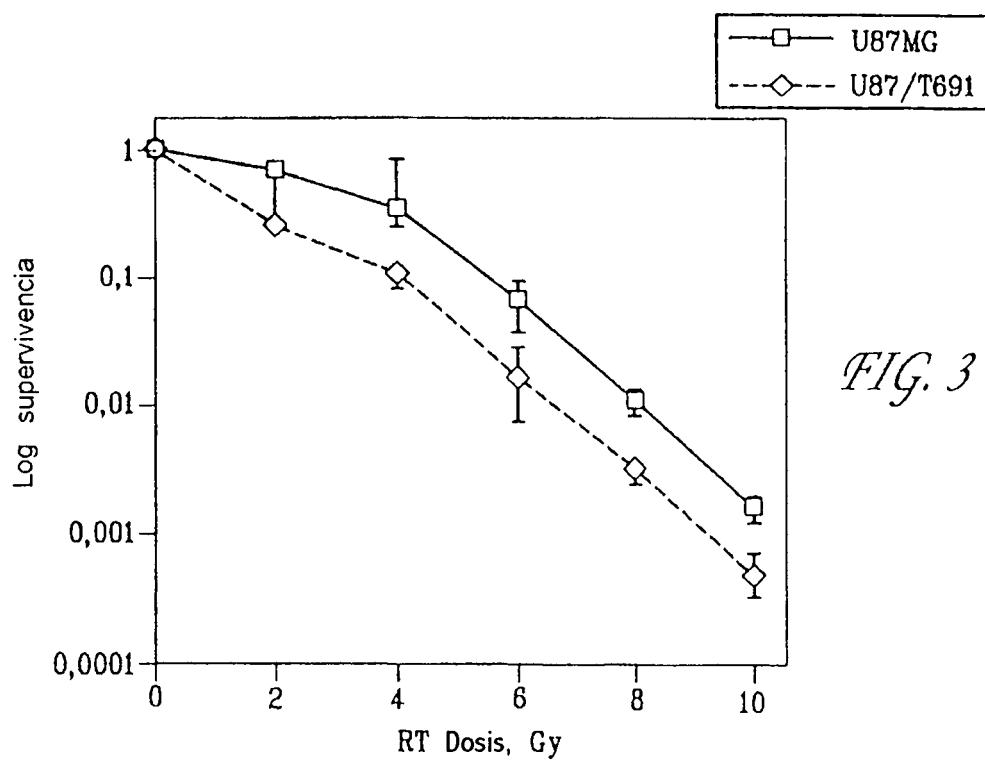
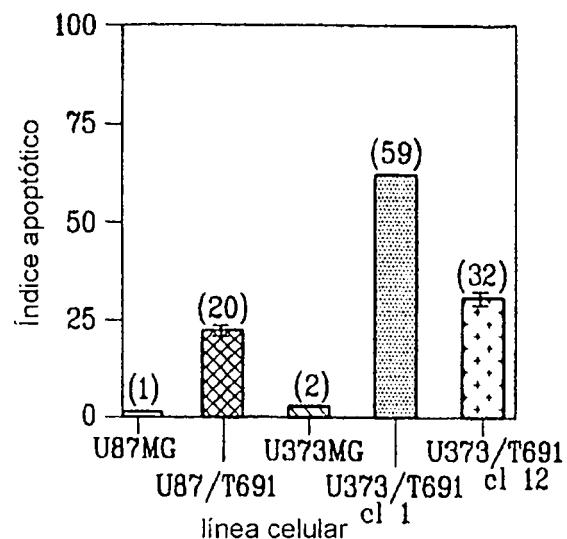


FIG. 3

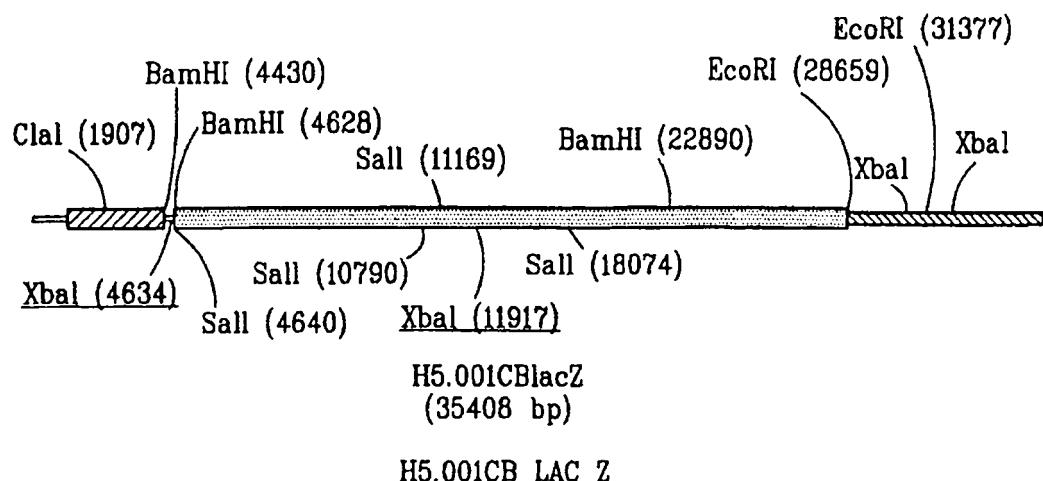


FIG. 4

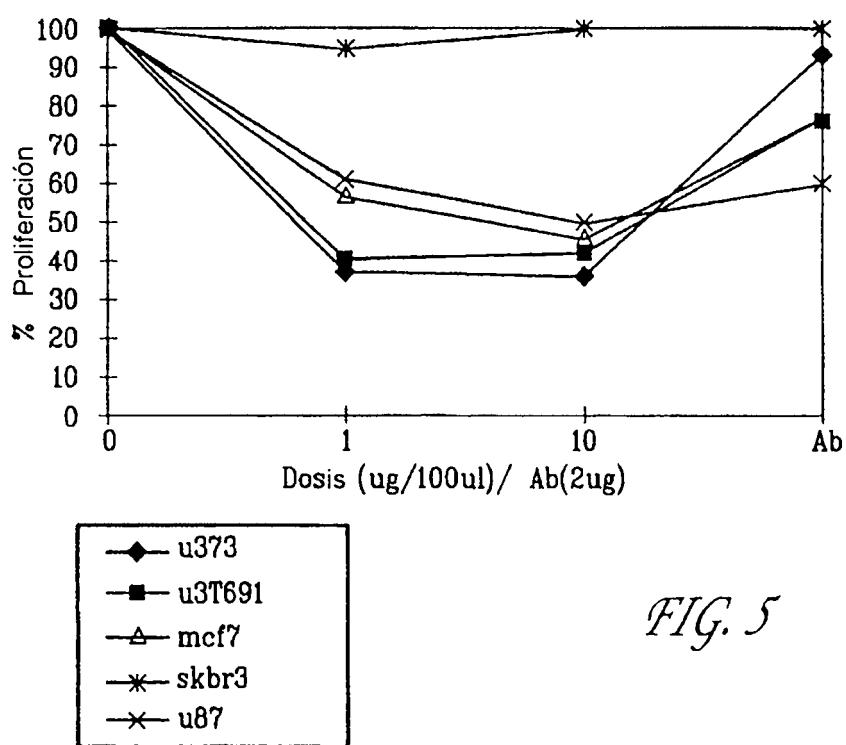


FIG. 5

ES 2 270 586 T3

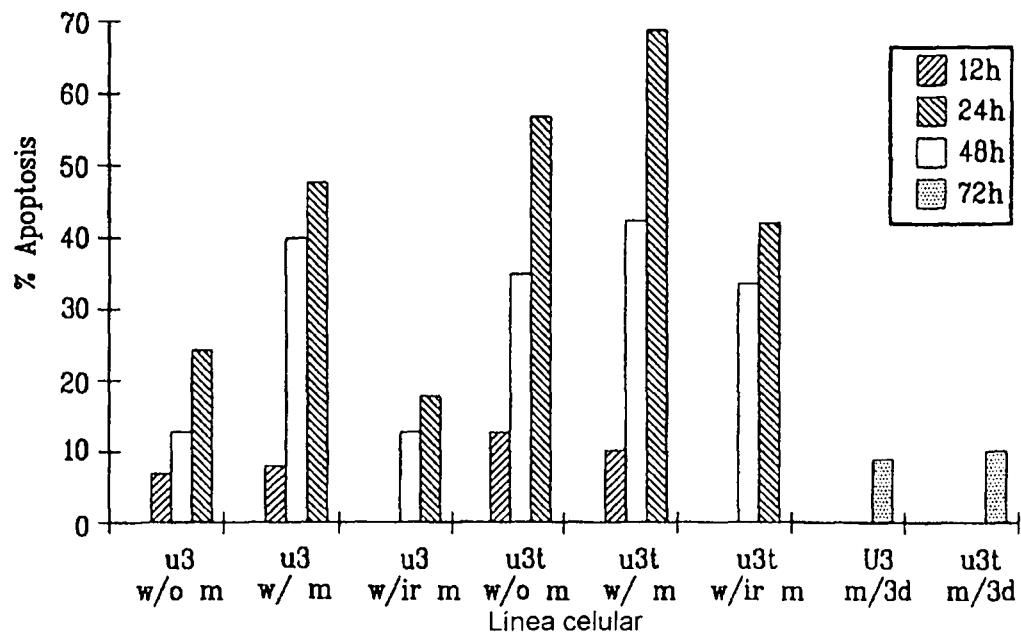


FIG. 6A

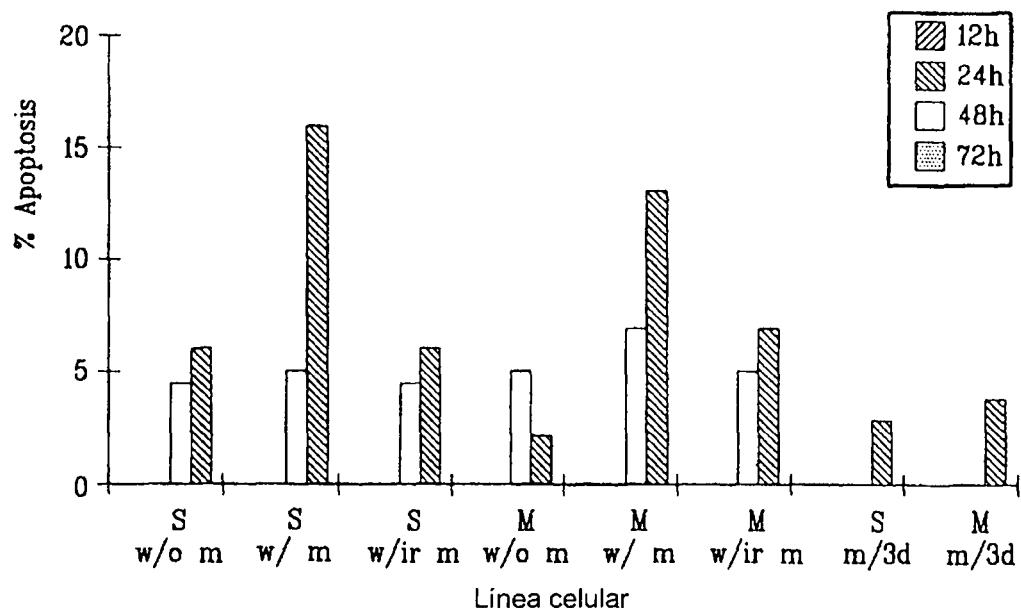


FIG. 6B

ES 2 270 586 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

5 <120> Composición y métodos de tratamiento de tumores

<130> upn3570

10 <140>

<141>

<150> 60/076,788

15 <151> 1998-03-04

<150> 09/111,681

<151> 1998-07-08

20 <160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.0

25 <210> 1

<211> 13

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

35 <221> MOD_RES

<222> (13)

<223> AMIDATION

40 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: nueva secuencia

<400> 1

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

<210> 2

50 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<221> MOD_RES

<222> (12)

60 <223> AMIDATION

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: nueva secuencia

65

ES 2 270 586 T3

<400> 2

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

10 <210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (12)
<223> AMIDATION

20 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: nueva secuencia

<400> 3

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

30 <210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (13)
40 <223> AMIDATION

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: nueva secuencia

45 <400> 4

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

55 <210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<221> MOD RES
<222> (13)
<223> AMIDATION

65 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: nueva secuencia

ES 2 270 586 T3

<400> 5

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

5

<210> 6

<211> 12

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> MOD_RES

<222> (12)

<223> AMIDATION

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: nueva secuencia

<400> 6

25

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

30 <210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)

40 <223> AMIDATION

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: nueva secuencia

45

<400> 7

50

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

<210> 8

<211> 13

55 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <221> MOD_RES

<222> (13)

<223> AMIDATION

65 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: nueva secuencia

ES 2 270 586 T3

<400> 8

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

5

<210> 9

<211> 13

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: nueva secuencia

<400> 9

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

<210> 10

<211> 12

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: nueva secuencia

<400> 10

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

<210> 11

40 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: nueva secuencia

<400> 11

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

55 <210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: nueva secuencia

65

ES 2 270 586 T3

<400> 12

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

5

<210> 13

<211> 13

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: nueva secuencia

<400> 13

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

<210> 14

<211> 12

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: nueva secuencia

<400> 14

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

<210> 15

40 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: nueva secuencia

<400> 15

50

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

55 <210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: nueva secuencia

65

ES 2 270 586 T3

<400> 16

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

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65