



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 32 600 T2 2007.08.09

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 058 562 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 32 600.1

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/04777

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 908 641.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1999/044645

(86) PCT-Anmeldetag: 04.03.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 10.09.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 13.12.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 02.08.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 09.08.2007

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

76788 P 04.03.1998 US  
111681 08.07.1998 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

The Trustees of the University of Pennsylvania,  
Philadelphia, Pa., US

(72) Erfinder:

GREENE, I., Mark, Penn Valley, PA 19072, US;  
O'ROURKE, M., Donald, Wynnewood, PA 19096,  
US; MURALI, Ramachandran, Drexel Hill, PA  
19026, US; PARK, Byeong-Woo, Wayne, PA 19087,  
US

(74) Vertreter:

Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &  
Schwanhäusser, 80538 München

(54) Bezeichnung: ZUSAMMENSETZUNGEN UND VERFAHREN ZUR BEHANDLUNG VON TUMOREN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****Gebiet der Erfindung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Proteine, denen die Tyrosinkinase-Aktivität fehlt und die mit Mitgliedern der erbB Rezeptor-Familie dimerisieren; auf Nukleinsäuremoleküle, die für solche Proteine kodieren; auf pharmazeutische Zusammensetzungen, die solche Nukleinsäuremoleküle in Kombination mit Trägerstoffen umfassen, die den Transfer des Nukleinsäuremoleküls in eine Zelle erleichtern; und auf die Verwendung einer solchen pharmazeutischen Zusammensetzung bei der Herstellung eines Medikamentes zur Verhinderung von Tumoren und zur Behandlung von Individuen, die Tumore aufweisen. Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Zusammensetzungen, die nützlich sind, um Tumorzellen, die gegen einen durch Bestrahlung und/oder chemische Mittel induzierten Zelltod resistent sind, in Zellen umzuwandeln, die sensitiv gegenüber Bestrahlung sind. Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung solcher Zusammensetzungen bei der Herstellung eines Medikamentes, das in Kombination mit Bestrahlung und/oder Chemotherapie zur Behandlung von Individuen, die Tumore aufweisen, verabreicht wird.

**Hintergrund der Erfindung**

**[0002]** Die erbB Rezeptor-Familie schließt erbB1 (EGFR), erbB2 (p185), erbB3 und erbB4 ein. Ullrich, et al. (1984) Nature 309, 418–425, der hierdurch per Referenz eingeschlossen ist, beschreibt EGFR. Schechter, A. L., et (1984) Nature 312, 513–516 und Yamamoto, T., et al. (1986) Nature 319, 230–234, beschreiben p185neu/erbB2. Kraus, M.H., et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9193–9197 beschreibt erbB3. Plowman, G.D., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1746–1750, beschreibt erbB4.

**[0003]** Das zelluläre Protoonkogen c-neu der Ratte und dessen humanes Gegenstück c-erbB2 kodieren für 185 kDa Transmembranglycoproteine, die als p185 bezeichnet werden. Die Tyrosinkinase (tk)-Aktivität wurde mit der Expression des transformierenden Phänotyps des onkogenen p185 in Zusammenhang gebracht (Bargmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 5394; und Stern et al., Mol. Cell. Biol., 1988, 8, 3969). Das onkogene neu wurde ursprünglich in Neurogliblastomen der Ratte identifiziert (Schlechter et al., Nature, 1984, 312, 513) und es wurde festgestellt, dass es durch eine Karzinogeninduzierte Punktmutation, welche die Substitution einer einzelnen Aminosäure in der Transmembran-Region des transformierenden Proteins erzeugt, eine Val zu Glu Substitution an Position 664, aktiviert wird (Bargmann et al., Cell, 1986, 45, 649). Diese Veränderung führt zu einer konstitutiven Aktivität seiner intrinsischen Kinase und zu der malignen Transformation von Zellen (Bargmann et al., EMBO J., 1988, 7, 2043). Die Aktivierung der onkogenen p185 Protein-Tyrosinkinase scheint mit einer Verschiebung des molekularen Equilibriums von monomeren zu dimeren Formen in Zusammenhang zu stehen (Weiner et al., Nature, 1989, 339, 230).

**[0004]** Die Überexpression von c-neu oder c-erbB2 in Konzentrationen, die 100× höher als normal sind (d.h., > 10<sup>6</sup> Rezeptoren/Zelle) führt außerdem zu der Transformation von NIH3T3 Zellen (Chazin et al., Oncogene, 1992, 7, 1859; DiFiore et al., Science, 1987, 237, 178; und DiMarco et al., Mol. Cell. Biol., 1990, 10, 324). Jedoch werden NIH3T3 Zellen oder NR6 Zellen, die zelluläres p185 in Konzentrationen von 10<sup>5</sup> Rezeptoren/Zelle exprimieren, nicht transformiert (Hung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 2545; und Kokai et al., Cell, 1989, 58, 287), es sei denn, sie werden mit dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR) exprimiert, einer homologen Tyrosinkinase (Kokai et al., Cell, 1989, 58, 287). Folglich kann sowohl zelluläres p185 und als auch onkogenes p185 zu der Transformation von Zellen führen.

**[0005]** Zelluläres p185 ist stark homolog zu EGFR (Schlechter et al., Nature, 1984, 312, 513; und Yamamoto et al., Nature, 1986, 319, 230), aber dennoch unterschiedlich. Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass EGFR und zelluläres p185 fähig sind zu interagieren (Stern et al., Mol. Cell. Biol., 1988, 8, 3969; King et al., EMBOJ., 1988, 7, 1647; Kokai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 5389; und Dougall et al., J. Cell. Biochem., 1993, 53, 61). Die intermolekulare Assoziation von EGFR und zellulärem p185 scheint die EGFR-Funktion hoch zu regulieren (Wada et al., Cell, 1990, 61, 1339). Darüber hinaus können Heterodimere, die aktive Kinasekomplexe bilden, sowohl in vivo als auch in vitro nachgewiesen werden (Qian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 1330).

**[0006]** In ähnlicher Weise wurden von p185 Interaktionen mit anderen erbB Familienmitgliedern berichtet (Carraway et al., Cell 1994, 78, 5–8; Alroy et al., FEBS Lett. 1997, 410, 83–86, Riese et al., Mol. Cell. Biol. 1995, 15, 5770–5776; Tzahar et al., EMBOJ. 1997, 16, 4938–4950; Surden et al., Neuron 1997, 18, 847–855; Pinkas-Kramarski et al., Oncogene 1997, 15, 2803–2815). Humanes p185 bildet unter physiologischen Bedingungen Heterodimere mit erbB3 oder erbB4, in erster Linie im Herzmuskel und im Nervensystem, insbeson-

dere während der Entwicklung.

**[0007]** Zelluläre p185 Proteine treten in adulten sekretorischen Epithelzellen der Lunge, in der Speicheldrüse, der Brust, im Pankreas, in den Ovarien, im Gastrointestinaltrakt und in der Haut auf (Kokai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 8498; Mori et al., Lab. Invest., 1989, 61, 93; und Press et al., Oncogene, 1990, 5, 953). In neueren Studien wurde festgestellt, dass die Amplifikation von c-erbB2 in hohen Dichten in einer Reihe von humanen Adenokarzinomen wie z.B. Adenokarzinomen des Magens (Akiyama et al., Science, 1986, 232, 1644), der Lungen (Kern et al., Cancer Res., 1990, 50, 5184) und des Pankreas (Williams et al., Pathobiol., 1991, 59, 46) auftritt. Es wurde außerdem berichtet, dass eine erhöhte c-erbB2 Expression in einer Untergruppe von Brust- und Ovarial-Karzinomen mit einer weniger optimistischen klinischen Prognose verbunden ist (Slamon et al., Science, 1987, 235, 177; und Slamon et al., Science, 1989, 244, 707). Die heterodimere Assoziation von EGFR und p185 wurde außerdem in humanen Brustkrebszelllinien, wie z.B. SK-Br-3 (Goldman et al., Biochemistry, 1990, 29, 11024) und in transfizierten Zellen (Spivak-Kroizman et al., J. Biol. Chem., 1992, 267, 8056) nachgewiesen. Darüber hinaus wurde von Fällen einer erbB2 und EGFR Koexpression in Brust-Krebsarten und Prostata-Krebsarten berichtet. Ferner wurden außerdem heterodimere Assoziationen von p185 und erbB3 ebenso wie heterodimere Assoziationen von p185 und erbB4 in humanen Krebsarten nachgewiesen. Die Koexpression von erbB2 und erbB3 wurde in humanen Brust-Krebsarten beobachtet. Die Koexpression von EGFR, erbB2 und erbB3 wurde in Prostatakarzinomen beobachtet.

**[0008]** Die Amplifikation und/oder Veränderung des EGFr-Gens wird häufig beim Progress von Gliatumoren beobachtet (Sugawa, et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87:8602–8606; Ekstrand, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89:4309–4313), insbesondere in Glioblastomen, dem bösartigsten Gliatumor (Liebermann, et al., s.o.; Wong, et al. s.o.; James, et al. (1988) Cancer Res. 48: 5546–5551; Cavenee, W.K. (1992) Cancer 70: 1788–93, Nishikawa, et al., (1994) proc. Natl. Acad. Sci. 91: 7727–7731; Schlegel, et al. (1994) Int J. Cancer 56: 72–77). Ein signifikanter Teil dieser Tumore zeigt eine EGFr Amplifikation mit oder ohne Genveränderung (Ekstrand, et al. s.o.; Liebermann, et al. s.o.; Wong, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 6899–6903), und dies wurde mit einem kürzeren Intervall bis zum Wiederauftreten der Erkrankung und einer geringeren Überlebensrate korreliert (Schlegel, et al. s.o.).

**[0009]** Die EGFr Amplifikation kann mit anomalen EGFr Transkripten, zusammen mit normalen EGFr Transkripten verbunden sein (Sugawa, et al. s.o.). Die häufig auftretende Amplifikation und als Folge auftretende strukturelle Veränderung legt nahe, dass EGFr für die Aufrechterhaltung des Phänotyps des malignen Glioms wichtig sein könnte. Ein häufig beobachteter EGFr Mutant wurde in einer Untergruppe von humanen Glioblastomen identifiziert und resultiert aus einer Trunkierung von 801 bp im Leseraster (entsprechend den Exons 2–7) in der extrazellulären Domäne des Rezeptors (Sugawa, et al. s.o.; Ekstrand, et al. s.o.; Malden, et al. (1988) Cancer Res. 48: 2711–2714; Humphrey, et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 4207–4211; Wong, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 2965–2969), von der angenommen wird, dass sie zu einer konstitutiven Kinase-Aktivierung führt und außerdem die Liganden-bindenden Eigenschaften des Moleküls beeinträchtigen kann (Nishikawa, et al. s.o.; Callaghan, et al. (1993) Oncogene 8: 2939–2948).

**[0010]** Die beobachteten Mutationen von EGFr in humanen epithelialen Malignomen bestehen aus der Überexpression mit oder ohne Amplifikation und, weniger häufig, aus Veränderungen der kodierenden Sequenz. Die oncogene Transformation, die durch Mutanten von EGFr verursacht wird, scheint gewebespezifisch zu sein und wurde bei der erythroiden Leukämie, dem Fibrosarkom, dem Angiosarkom, dem Melanom, ebenso wie beim Glioblastom beobachtet (Carter, et al. (1994) Crit Rev Oncogenesis 5: 389–428). Die Überexpression von dem normalen EGFr kann in bestimmten Fällen die onkogene Transformation verursachen, vermutlich in einer EGF-abhängigen Weise (Carter, et al. s.o.; Haley, et al. (1989) Oncogene 4: 273–283). Die Transfektion großer Mengen des Wildtyp EGFr in NIH3T3 Zellen führt zu einer Liganden-abhängigen, jedoch unvollständigen Transformation (Yamazaki, et al. (1990) Jpn. J. Cancer Res. 81: 773–779). Die Überexpression kann eine veränderte Zellzyklus-Regulation der EGFr Kinase verursachen und zu dem transformierten Stadium beitragen, wie für onkogenes p185neu beobachtet wurde (Kiyokawa, et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92:1092–1096).

**[0011]** Es gibt einen Bedarf an therapeutischen Zusammensetzungen, die nützlich sind für die Behandlung von Individuen, von denen festgestellt wurde, dass sie erbB-vermittelte Tumoren aufweisen. Es gibt einen Bedarf, prophylaktische Zusammensetzungen für Individuen zu entwickeln, die dafür anfällig sind, erbB-vermittelte Tumoren zu entwickeln. Es gibt einen Bedarf an Verfahren zur Behandlung von Individuen, von denen festgestellt wurde, dass sie erbB vermittelte Tumoren aufweisen. Es gibt einen Bedarf an Verfahren, um zu verhindern, dass Individuen, die empfänglich sind, erbB-vermittelte Tumoren zu entwickeln, solche Tumoren entwickeln.

## Zusammenfassung der Erfindung

**[0012]** Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Zusammensetzungen, welche die erbB-assozierte Kinase-Aktivität in Tumorzellen zerstört oder inhibiert, zur Herstellung eines Medikamentes, das in Kombination mit Bestrahlung oder einem zytotoxischen Agens zur Behandlung eines Individuums mit einem Tumor verabreicht werden soll; wie in den Ansprüchen 1–23 dargelegt.

**[0013]** Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung einer Zusammensetzung, welche die Bildung von erbB Protein-Dimeren inhibiert, welche eine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität in einer Tumorzelle produzieren, bei der Herstellung eines Medikamentes, das in Kombination mit einer therapeutisch wirksamen Menge einer Antikrebsbestrahlung an ein Individuum verabreicht werden soll, das einen erbB Protein-vermittelten Tumor hat. In einigen Ausführungsformen ist der erbB Protein vermittelte Tumor ein p185-vermittelter Tumor. In einigen Ausführungsformen ist der erbB Protein-vermittelte Tumor ein EGFR-vermittelter Tumor. In einigen Ausführungsformen ist der erbB-vermittelte Tumor ein Gliatumor. In einigen Ausführungsformen ist der erbB Protein vermittelte Tumor ein Glioblastom. In einigen Ausführungsformen erfolgt die Verabreichung der Zusammensetzung durch intratumorale Verabreichung. In einigen Ausführungsformen wird das Individuum vor Verabreichung der Zusammensetzung operiert. In einigen Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung, die dem Patienten verabreicht wird, einen Wirkstoff, der mit einem erbB Protein in einer Tumorzelle interagiert, um das erbB Protein ausreichend zu verändern, um zu einer verringerten Neigung des erbB Proteins zur Dimerisierung mit einem anderen erbB Protein zu führen. In einigen Ausführungsformen ist der Wirkstoff, der mit dem erbB Protein in der Tumorzelle interagiert, um das erbB Protein so ausreichend zu verändern, dass es zu einer verringerten Neigung des erbB Proteins zur Dimerisierung mit einem anderen erbB Protein führt, ein Antikörper. In einigen Ausführungsformen ist der Antikörper ein monoklonaler Antikörper. In einigen Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung, die einem Patient verabreicht wird, einen Wirkstoff, der kompetitiv mit einem erbB Protein in einer Tumorzelle Interagiert, um die Dimer-Bildung mit einem anderen erbB Protein kompetitiv zu inhibieren und verhindert eine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität. In einigen Ausführungsformen ist der Wirkstoff, der kompetitiv mit einem erbB Protein in einer Tumorzelle interagiert, um die Dimer-Bildung mit einem anderen erbB Protein kompetitiv zu inhibieren, ein Peptid. In einigen Ausführungsformen ist der Wirkstoff, der kompetitiv mit einem erbB Protein in einer Tumorzelle interagiert, um die Dimer-Bildung mit einem anderen erbB Protein kompetitiv zu inhibieren, ein Antikörper. In einigen Ausführungsformen ist die Zusammensetzung, die der Tumorzelle verabreicht wird, ein Nukleinsäuremolekül, das für ein Protein kodiert, das kompetitiv mit einem erbB Protein in einer Tumorzelle interagiert, um die Dimer-Bildung mit einem anderen erbB Protein kompetitiv zu inhibieren. In einigen Ausführungsformen ist das Protein ein mutiertes oder trunkiertes Kinase-defizientes erbB Protein. In einigen Ausführungsformen ist das Protein ein mutiertes oder trunkiertes Kinase-defizientes p185 Protein. In einigen Ausführungsformen interagiert das Protein mit der Transmembran-Region des einen erbB Proteins. In einigen Ausführungsformen umfasst das Protein eine neu Transmembran-Region der Ratte mit einer Val zu Glu Mutation bei Aminosäure 664. In einigen Ausführungsformen interagiert das Protein mit der Ektodomänen-Region des einen erbB Proteins. In einigen Ausführungsformen umfasst das Protein eine p185 Ektodomäne. In einigen Ausführungsformen wird das Nukleinsäuremolekül durch intratumorale Verabreichung verabreicht. In einigen Ausführungsformen wird das Individuum vor Verabreichung des Nukleinsäuremoleküls operiert. In einigen Ausführungsformen ist das Nukleinsäuremolekül das virale Genom eines rekombinanten Adenovirus. In einigen Ausführungsformen umfasst das Nukleinsäuremolekül eine kodierende Sequenz, die funktionell an regulatorische Elemente für die Translation in Zellen des Individuums verbunden sind, und die kodierende Sequenz umfasst: ein trunkiertes neu Gen der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691; ein trunkiertes neu Gen der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 und einer Val → Glu Mutation bei Aminosäure 664; ein chimäres p185 Gen, das die humane p185c-erbB2 Ektodomäne umfasst, die mit der neu Transmembran-Domäne der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 verbunden ist; ein chimäres p185 Gen, das die humane p185c-erbB2 Ektodomäne umfasst, die mit der neu Transmembran-Domäne der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 und einer Val → Glu Mutation bei Aminosäure 664 verbunden ist; ein chimäres p185 Gen, das die humane EGFR Ektodomäne umfasst, die mit der neu Transmembran-Domäne der Ratte mit einem Stopkodon der Aminosäure 691 verbunden ist; ein chimäres p185 Gen, das die humane EGFR Ektodomäne umfasst, die mit der neu Transmembran-Domäne der Ratte mit einem Stopkodon der Aminosäure 691 und einer Val → Glu Mutation bei Aminosäure 664 verbunden ist; ein chimäres p185 Gen, das die humane erbB3 Ektodomäne umfasst, die mit der neu Transmembran-Domäne der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 verbunden ist; ein chimäres p185 Gen, das die humane erbB3 Ektodomäne umfasst, die mit der neu Transmembran-Domäne der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 und einer Val → Glu Mutation bei Aminosäure 664 verbunden ist; ein chimäres p185 Gen, das die humane erbB4 Ektodomäne umfasst, die mit der neu Transmembran-Domäne der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 verbunden ist; oder ein chimäres p185 Gen, das die humane erbB4 Ektodomäne umfasst, die mit der neu Transmembran-Domäne der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 und einer Val →

Glu Mutation bei Aminosäure 664 verbunden ist.

**[0014]** Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung einer Zusammensetzung, welche die Kinase-Aktivität eines multimeren Ensembles zerstört, beider Herstellung eines Medikamentes zur Verabreichung in Kombination mit einer therapeutischen Menge Gammastrahlung an ein Individuum, das einen Tumor hat, wobei der Tumor dadurch gekennzeichnet ist, dass die Tumorzellen multimere Rezeptor-Anordnungen aufweisen, die eine Kinase-Aktivität bereit stellen, die mit einem transformierten Phänotyp assoziiert ist. In einigen Ausführungsformen ist der Tumor gekennzeichnet durch Tumorzellen, die multimere Rezeptor-Anordnungen aufweisen, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus: erbB Homodimeren, erbB Heterodimeren und Multimeren der Blutplättchen-Wachstumsfaktor (platelet derived growth factor)-Rezeptoren. In einigen Ausführungsformen ist der Tumor durch Tumorzellen charakterisiert, welche erbB Homodimere aufweisen, die mutierte EGFR Homodimere oder p185 Homodimere sind. In einigen Ausführungsformen ist der Tumor durch Tumorzellen gekennzeichnet, welche erbB Heterodimere aufweisen, die p185/EGFR Heterodimere, p185/mutierte EGFR Heterodimere, p185/erbB3 Heterodimere, p185/erbB4 Heterodimere oder EGFR/mutierte EGFR Heterodimere sind. In einigen Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung, welche die Kinase-Aktivität zerstört, die mit der multimeren Rezeptor-Anordnung assoziiert ist, einen aktiven Wirkstoff, der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Antikörpern, Peptiden und nicht-proteinischen Kinase-Inhibitoren. In einigen Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung, welche die mit dem multimeren Rezeptor-Ensemble assoziierte Kinase-Aktivität zerstört, einen aktiven Wirkstoff, der ein Nukleinsäuremolekül ist, welches für ein Protein oder ein Peptid kodiert, das mit einer monomeren Komponente des Ensembles interagiert, um die monomere Komponente daran zu hindern, mit einer zweiten monomeren Komponente des Ensembles zu interagieren.

**[0015]** Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines kleinen Peptids, einer nicht-proteinartigen Verbindung oder eines Nukleinsäuremoleküls, das für ein Nicht-Antikörper-Protein oder -Peptid kodiert, das die mit der multimeren Rezeptor-Anordnung assoziierte Kinase Aktivität zerstört, bei der Herstellung eines Medikamentes zur Verabreichung in Kombination mit einer therapeutischen Menge Gammastrahlung und/oder einer therapeutischen Menge eines zytotoxischen chemotherapeutischen Mittels zur Behandlung eines Individuums, das einen Tumor aufweist, wobei der Tumor gekennzeichnet ist durch Tumorzellen, die multimere Rezeptor-Anordnungen aufweisen, die eine mit einem transformierten Phänotyp assoziierte Kinase-Aktivität bereit stellen. In einigen Ausführungsformen ist der Tumor gekennzeichnet durch Tumozellen, die multimere Rezeptor-Anordnungen aufweisen, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus: erbB Homodimeren, erbB Heterodimeren und Multimeren von Blutplättchen-Wachstumsfaktor-Rezeptoren. In einigen Ausführungsformen ist der Tumor gekennzeichnet durch Tumorzellen, die erbB Homodimere aufweisen, die mutierte EGFR Homodimere oder p185 Homodimere sind. In einigen Ausführungsformen ist der Tumor gekennzeichnet durch Tumorzellen, die erbB Heterodimere aufweisen, die p185/EGFR Heterodimere, p185/mutiere EGFR Heterodimere, p185/erbB3 Heterodimere; p185/erbB4 Heterodimere oder EGFR/mutierte EGFR Heterodimere sind. In einigen Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung, welche die mit der multimeren Rezeptor-Anordnung assoziierten Kinase-Aktivität zerstört, einen Wirkstoff, der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Peptiden und nicht-proteinartigen Kinase-Inhibitoren. In einigen Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung, welche die mit der multimeren Rezeptor-Anordnung assoziierte Kinase-Aktivität zerstört, einen Wirkstoff, der ein Nukleinsäuremolekül ist, das für ein Protein oder Peptid kodiert, das mit einer monomeren Komponente des Ensembles/der Anordnung interagiert, um die monomere Komponente daran zu hindern, einer zweiten monomeren Komponente der Anordnung zu interagieren.

#### Kurze Beschreibung der Figuren

**[0016]** Die [Fig. 1A](#), [Fig. 1B](#), [Fig. 1C](#) und [Fig. 1D](#) zeigen Daten bezüglich der Zellzyklus-Verteilung von humanen Glioblastomzellen mit oder ohne Bestrahlungsbehandlung. Die Zellen wurden in 60 mm Platten ausplattiert und anheften gelassen, bevor sie entweder mit Gammastrahlen bestrahlt (10 Gy) ([Fig. 1B](#) und [Fig. 1D](#)) oder scheinbestrahlt ([Fig. 1A](#) und [Fig. 1C](#)) wurden. Nach 72 h wurden die Zellen anschließend mittels Durchflusszytometrie nach der Färbung mit PI analysiert. Die Verteilungen der Zellen gemäß ihrem DNA-Gehalt werden in jeder Abbildung angegeben. Repräsentative Experimente wurden viermal unabhängig voneinander durchgeführt.

**[0017]** Die [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) zeigen Daten, die sich auf die Bestimmung der Apoptose und des klonogenen Überlebens im Anschluss an die Gamma-Bestrahlung von humanen Glioblastom-Zellen beziehen. In [Fig. 2A](#) wurden die Zellen ausplattiert und anheften gelassen, bevor sie der Gammastrahlung (10 Gy) in 10% Serum oder Serum-freien Medium ausgesetzt wurden. Nach 72 h wurde eine Quantifizierung der Apoptose von zwei unabhängigen Beobachtern durchgeführt. Der apoptotische Index ist der prozentuale Anteil an apoptotischen

Zellen mit morphologischen Anzeichen der Apoptose, wie durch Färben der Nuklein mit DAPI bestimmt wurde. Die dargestellten Ergebnisse sind Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von vier unabhängigen Experimenten, und der Durchschnitt ist in Klammern angegeben. U87MG Zellen wurden in 10% Serum oder Serum-freiem Medium wachsen gelassen, und U87/T691-Zellen wurden in 10% Serum oder Serum-freiem Medium wachsen gelassen. In [Fig. 2B](#) wurden U87MG und U373MG humane Gliomzellen und Derrivate mit DAPI gefärbt und 72 h nach der Gamma-Bestrahlung auf eine apoptotische Morphologie untersucht. Der Durchschnitt ist in Klammern angegeben, und der gezeigte Index in diesem repräsentativen Experiment ist der Durchschnittswert  $\pm$  Standardabweichung (standard deviation, SD). Diese Ergebnisse wurden in zwei zusätzlichen Experimenten bestätigt. Die apoptotischen Indizes wurden als Unterschätzung empfunden, da treibende Zellen mit Hilfe dieser Methode nicht untersucht werden konnten.

**[0018]** [Fig. 3](#) zeigt das klonogene Überleben nach der Bestrahlung. Die Zellen wurden ausplattiert und mit verschiedenen Bestrahlungsdosen gammabestrahlt, gefolgt von einer Inkubation für 7–10 Tage bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub>. Die Kolonien wurden anschließend gefärbt und solche mit mehr als 50 Zellen wurden unter einem Präparationsmikroskop gezählt. Das Log-Überleben wurde anschließend durch Berechnen des Verhältnisses der Anzahl gebildeter Kolonien zur Anzahl der ausplattierten Zellen bestimmt, nachdem aufgrund der Plättigungseffizienz korrigiert wurde. Ähnliche Experimente wurden dreimal durchgeführt.

**[0019]** [Fig. 4](#) ist eine schematische Karte des rekombinanten Adenovirus H5.001 CBLacZ.

**[0020]** [Fig. 5](#) zeigt die Inhibition der Zellproliferation von p185<sup>c-erbB-2</sup>-exprimierenden humanen Tumorzellen. 5000 Zellen/Vertiefung wurden mit der angegebenen Menge an mimetischem CDR4D5 oder anti-p185<sup>c-erbB-2</sup> Ab (Neomarkers Inc., CA) ausplattiert und bei 37 Grad 24 Stunden inkubiert. 100 µg MTT (in 200 µl) wurden für 4 Stunden zu jeder Vertiefung gegeben, gefolgt von der Zugabe von 100 µl Lysebuffer zu jeder Vertiefung. Nach 12–24 Stunden wurde die O.D. bei 570 nm in einem ELISA-Lesegerät bestimmt. Die %-Proliferation gibt den Grad der Proliferation relativ zu den Kontrollzellen an (ohne Behandlung mit mimetischem CDR4D5 oder anti-p185<sup>c-erbB-2</sup> Ab).

**[0021]** Die [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) zeigen, dass anti-p185<sup>c-erbB-2</sup> mimetisches CDR4D5 humane Tumorzellen gegenüber der durch Gamma-Bestrahlung induzierten Apoptose sensibilisieren. U3, u3t, S und M zeigen die U373MG und U373/T691; SKBR3 bzw. MCF7 Zelllinie. M und ir m geben mimetisches 4D5 und irrelevantes mimetisches CD4-Serin an.

#### Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

**[0022]** Wie hierin verwendet, beziehen sich die Begriffe „erbB-assoziierter Krebs“ und „erbB-assoziierte Tumore“ auf Tumorzellen und Neoplasien, die ein Mitglied der erbB Genfamilie exprimieren, wobei die Expression zu einer erbB-vermittelten Transformation führt. Neu-assoziierte Tumoren und EGFR-assoziierte Tumoren sind Beispiele für erbB-assoziierte Tumoren.

**[0023]** Wie hierin verwendet, bezeichnen die Begriffe „neu-assozierter Krebs“ „neu-assoziierte Tumoren“ und „p185-assoziierte Tumoren“ Tumorzellen und Neoplasien, die das neu Gen exprimieren, um p185 zu produzieren. Neu-assozierter Krebs ist ein erbB-assozierter Krebs, in dem die zelluläre Transformation durch die mit p185 im Zusammenhang stehende Tyrosinkinase-Aktivität vermittelt wird.

**[0024]** Wie hierin verwendet, bezeichnen die Begriffe „EGFR-assozierter Krebs“ und „EGFR-assoziierte Tumoren“ Tumorzellen und Neoplasien, die EGFR exprimieren. EGFR-assozierter Krebs ist ein erbB-assozierter Krebs, in dem die zelluläre Transformation durch die mit EGFR in Verbindung stehende Tyrosinkinase-Aktivität vermittelt wird.

**[0025]** Wie hierin verwendet, bedeuten die Begriffe „mutierter EGFR-assozierter Krebs“ und „mutierter EGFR-assoziierte Tumoren“ Tumorzellen und Neoplasien, die mutierte Formen von EGFR exprimieren. Mutierter EGFR-assozierter Krebs ist ein EGFR-assozierter Krebs, in dem die zelluläre Transformation durch eine mit dem mutierten EGFR in Zusammenhang stehende Tyrosinkinase-Aktivität vermittelt wird. Veränderungen der Rezeptor-Untereinheiten als Ergebnis struktureller Änderungen können mit einer Rezeptor-Oligomerisierung verbunden sein, die zur Amplifikation der Signalübermittlung führt. Ein mutierter EGFR kann eine konstitutiv aktivierte extrazellulär-deletierte mutierte EGFR-Form ( $\Delta$ EGFR) sein, die häufig in humanen Gliatumoren beobachtet wird. Ein  $\Delta$ EGFR-Onkoprotein, das häufig in humanen Glianeoplasien und anderen humanen epithelialen Malignomen beobachtet wird ( $\Delta$ EGFR oder EGFRVIII), resultiert aus einer Trunkierung im Leserahmen, welche die Exons 2 bis 7 (Aminosäuren 6 bis 273) in dem Gen beinhaltet, das für die extrazelluläre Region des

Moleküls kodiert, was zur Expression transkribierter, konstitutiv phosphorylierter ΔEGFRs von 140–155 kDa führt. Es wurde beobachtet, dass ΔEGFR Rezeptoren spontan in einer dimeren Form existieren und eine konstitutive Signalübermittlung und onkogene Transformation von Fibroblasten von Nagetieren in einer Liganden-unabhängigen Weise vermitteln, während überexprimierte p170 holo-EGFRs in der Gegenwart von EGF nur schwach transformierend wirken. ΔEGFR-Onkoproteine verleihen in humanen Glioblastomzellen und in murinen Fibroblasten einen dramatischen Wachstumsvorteil in vivo. Kürzliche Berichte deuten an, dass ΔEGF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche vorhanden sind und langsamer als Ligandenstimulierte Holo-EGFRs internalisieren, was die Transformierungseffizienz von ΔEGFR-Onkoproteinen erhöhen könnte. Von anderen Mutationen, welche die extrazelluläre Domäne der Transmembran-Region und der zytoplasmatischen Region von RTK-Polypeptiden funktionell separieren, wurden ebenfalls beobachtet, dass sie zu spontaner Dimerisierung und zum Erwerb eines Transformierungspotentials führen, was nahe legt, dass ein Teil der extrazellulären Domäne der Dimerbildung eine strukturelle Beschränkung auferlegt, die vermutlich durch Ligandenbindung oder Massenwirkung beseitigt wird. Extrazelluläre Deletionen, die in ΔEGFRs oder v-erbB Onkogenen von Vögeln beobachtet werden, erleichtern vermutlich die Dimerbildung durch Nachahmen der konformationellen Änderungen, die aus der Ligandenbindung resultieren. Von den löslichen extrazellulären Domänen von EGFR wurde beobachtet, dass sie oligomerisieren, und die strukturelle Änderung in der Ektodomäne kann die spontane Oligomerisierung der extrazellulären Domänen, der zytoplasmatischen Domänen oder beider Domänen induzieren.

**[0026]** Die extrazelluläre Deletion in EGFR entfernt die Mehrzahl der Aminosäuren, welche die Subdomänen I und II von EGFR umfassen, was einen großen Teil der ersten (eher aminoterminalen) Sequenz der beiden Cystein-reichen Sequenzen in der extrazellulären Region des Rezeptors einschließt. Die Subdomäne III, von der berichtet wurde, dass sie dem EGFR Liganden-bindende Eigenschaften verleiht, ist in dem EGFR Onkoprotein erhalten, obwohl EGFRs in NIH3T3-Zellen Liganden nicht zu binden scheinen. Die Koexpression von Holo-EGFRs und ΔEGFRs wurde in humanen Glioblastomen und anderen Tumorproben beobachtet, was nahe legt, dass ΔEGFR/EGFR ko-exprimierende Zellen mit humanen Erkrankungen in enger Beziehung stehen.

**[0027]** Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „EGFR-Spezies“ auf Wildtyp und mutierte Formen von EGFR.

**[0028]** Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff „erbB-vermittelte zelluläre Transformation“ die zelluläre Transformation, denen erbB-assoziierte Tumorzellen und Neoplasien unterliegen. Zellen unterliegen einer erbB-vermittelten Transformation in Zusammenhang mit einem erhöhten Grad an Tyrosinkinase-Aktivität durch Mitglieder der erbB Rezeptor-Familie. Der transformierte Phänotyp der durch erbB vermittelten transformierten Zellen kann durch Expression von Tyrosinkinase-defizienten Proteinen, die mit Mitgliedern der erbB Rezeptor-Familie dimerisieren, gehalten und/oder rückgängig gemacht werden.

**[0029]** Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „p185-vermittelte zelluläre Transformation“ auf die zelluläre Transformation, denen p185-assoziierte Tumorzellen und Neoplasien unterliegen und deren transformierter Phänotyp gehalten und/oder rückgängig gemacht werden kann durch Expression von Tyrosinkinase-defizienten Proteinen, die mit p185 dimerisieren. P185-vermittelte zelluläre Transformation ist eine erb-vermittelte zelluläre Transformation.

**[0030]** Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „EGFR-vermittelte zelluläre Transformation“ auf die zelluläre Transformation, denen EGFR-vermittelte Tumorzellen und Neoplasien unterliegen und deren transformierter Phänotyp gehalten und/oder rückgängig gemacht werden kann durch Expression von Tyrosinkinase-defizienten Proteinen, die mit EGFR dimerisieren. EGFR-vermittelte zelluläre Transformation ist eine erb-vermittelte zelluläre Transformation.

**[0031]** Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „mutierter EGFR-vermittelte zelluläre Transformation“ auf die zelluläre Transformation, denen mutierter EGFR-vermittelte Tumorzellen und Neoplasien unterliegen und deren transformierter Phänotyp durch Expression von Tyrosinkinase-defizienten Proteinen, die mit mutiertem EGFR dimerisieren, gehalten und/oder rückgängig gemacht werden kann. Mutierte EGFR-vermittelte zelluläre Transformation ist eine erbB-vermittelte zelluläre Transformation.

**[0032]** Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „Liefer-Komponente“ auf Träger/Vehikel, durch welche Nukleinsäuremoleküle an Zellen eines Individuums verabreicht/geliefert werden können. Liefer-Komponenten sollen virale Partikel, wie z.B. virale Partikel von Gen-Therapie-Vektoren ebenso wie andere Vehikel, Träger, Komplexe, Einheiten und Strukturen einschließen, welche zur Verabreichung/Lieferung eines Nukleinsäure-

moleküls an eine Zelle nützlich sind.

**[0033]** Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „Individuum mit hohem Risiko“ auf ein Individuum, das einen erbB-assoziierten Tumor hatte, wie z.B. einen neu-assoziierten Tumor, der entweder entfernt wurde oder eine Besserung eingetreten ist, und welcher daher anfällig für ein Rezidiv oder ein Wiederauftreten ist. Als Teil einer Behandlungsprozedur für ein Individuum mit einem hohen Risiko kann das Individuum prophylaktisch gegen Tumore behandelt werden, die als dagewesenen diagnostiziert wurden, um ein Wiederauftreten zu bekämpfen. Folglich kann das Individuum, sobald bekannt ist, dass ein Individuum einen erbB-assoziierten Krebs gehabt hat, gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt werden, um zu verhindern, dass normale Zellen zu Tumorzellen transformieren.

**[0034]** Die vorliegende Erfindung ist nützlich, um ein Individuum, von dem festgestellt wurde, dass es an erbB-assoziierten Tumoren leidet, wie z.B. an neu-assoziierten Tumoren, therapeutisch zu behandeln, um den transformierten Phänotyp der Tumorzellen umzukehren. Die vorliegende Erfindung ist nützlich, um ein Individuum, welches eine Prädisposition zur Entwicklung von erbB-assoziierten Tumoren aufweist oder welches erbB-assoziierte Tumoren gehabt hat und daher anfällig für ein Rezidiv oder ein Wiederauftreten ist, prophylaktisch zu behandeln.

**[0035]** Das Translationsprodukt des neu Onkogens ist p185, ein Transmembranglykoprotein, das eine Tyrosinkinase-Aktivität aufweist und ein Molekulargewicht von etwa 185.000 Dalton hat, wie mittels Durchführen einer Elektrophorese für das Glykoprotein und Vergleich von dessen Bewegung mit Markerproteinen mit bekanntem Molekulargewicht bestimmt wurde. Experimente haben gezeigt, dass p185 Dimere mit anderen p185 Molekülen oder mit dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) bildet, und dass diese Dimere eine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität zeigen, welche zu dem transformierten Phänotyp in Zellen führt, welche diese Dimere aufweisen.

**[0036]** P185neu Mutanten interferieren mit aktivierten p185neu Homodimeren (Qian, O'Rourke, Zhao, Greene: Onkogene 13:2149–2157, 1996). P185neu Mutanten interferieren außerdem mit normalen EGFR-Homodimeren, mutierten EGFR, ebenso wie mit aktivierten EGFR-Homodimeren in Fibroblasten und in primären humanen Krebszellen. Die Verabreichung von Nukleinsäuremolekülen, welche für Proteine kodieren, die fähig zur Bildung von Dimeren mit anderen p185-Molekülen oder mit EGFR sind, deren Dimere jedoch keine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität zeigen, beseitigen den transformierten Phänotyp von neu-assoziierten Tumoren in einer Population, die an p185-vermittelten Tumoren leidet. Darüber hinaus inhibiert die Verabreichung solcher Nukleinsäuremoleküle die neoplastische Entwicklung in Tieren, die anfällig für die Entwicklung von neu transformierten Tumoren sind.

**[0037]** Wie oben dargestellt, wurde von p185-erbB2 Interaktionen mit anderen erbB Familien-Mitgliedern berichtet (Carraway et al., s.o.; Alroy et al., s.o.; Riese et al., s.o.; Tzahar et al., s.o.; und Surden et al., s.o.; Pinikas-Kramarski et al., s.o.). Entsprechend können Kinase-defiziente Mutanten von p185neu/erbB2 (humanes Homolog), welche die Fähigkeit zur Bildung von Heterodimeren mit EGFR, erbB3 und erbB4 beibehalten, verwendet werden, um Dimere mit erbB3 und erbB4, ebenso wie mit EGFR, zu bilden und die Signalübertragung in humanen Tumorzellen modulieren. Folglich bezieht sich die vorliegende Erfindung darüber hinaus auf die Verabreichung von Nukleinsäuremolekülen, die für Proteine kodieren, die fähig zur Bildung von Dimeren mit erbB3 und erbB4 sind, deren Dimere jedoch keine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität zeigen und die den transformierten Phänotyp von Tumoren in einer Population, die an solchen Tumoren leidet, eliminiert. Darüber hinaus inhibiert die Verabreichung solcher Nukleinsäuremoleküle die neoplastische Entwicklung in Tieren, die anfällig für die Entwicklung solcher Tumoren sind.

**[0038]** Zusätzlich zu p185 Mutanten zur Störung der erbB-vermittelten zellulären Transformation, können andere mutierte erbB Mitglieder nützlich sein, um mit Wildtyp erbB Proteinen zu dimerisieren und die mit den Wildtyp Homodimeren und Heterodimeren assoziierte erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität zu inhibieren.

**[0039]** Die vorliegende Erfindung stellt Nukleinsäuremoleküle zur Verfügung, die eine Nukleinsäuresequenz haben, die für ein Protein kodiert, dem die Tyrosinkinase-Aktivität fehlt und das mit einem Mitglied der erbB Rezeptor-Familie dimerisiert. Das Protein dimerisiert mit einem erbB Protein, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus EGFR, p185, erbB3 und erbB4, vorzugsweise wenigstens zwei Mitglieder der erbB Familie, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus EGFR, p185, erbB3 und erbB4, am bevorzugtesten mit wenigstens drei Mitgliedern der erbB Familie, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus EGFR, p185, erbB3 und erbB4, und am bevorzugtesten dimerisiert das Protein sowohl mit EGFR, p185, erbB3 als auch mit erbB4. Es wird bevorzugt, dass das Protein eine mutierte oder trunkierte Form eines Proteins ist, das ein Mit-

glied der erbB Familie ist oder ein chimäres Protein, das Sequenzen von Mitgliedern der erbB Familie einschließt, die von verschiedenen Spezies stammen. In einigen bevorzugten Ausführungsformen stellt die Erfindung Nukleinsäuremoleküle zur Verfügung, die eine Nukleotidsequenz haben, die für ein Protein kodiert, dem die Tyrosinkinase-Aktivität fehlt und das mit humanem EGFR oder humanem p185 dimerisiert. Die Nukleinsäuremoleküle werden in Kombination mit Liefer-Komponenten zur Verfügung gestellt, so dass bei der Verabreichung der Kombination das Nukleinsäuremolekül an die Zellen des Individuums geliefert werden. Wenn sie als pharmazeutische Zusammensetzung zur Verfügung gestellt wird, ist die Kombination nützlich für die Behandlung von Individuen, die an erbB-vermittelten zellulärer Transformationen leiden, wie z.B. der p185-vermittelten zellulären Transformation und der EGFR-vermittelten zellulären Transformation. Solch eine pharmazeutische Zusammensetzung kann nützlich sein für die Verhinderung einer erbB-vermittelten zellulären Transformation, insbesondere in Individuen, die anfällig für eine solche Transformation sind. Die Nukleinsäuremoleküle gemäß der Erfindung können außerdem nützlich sein, um spezifische erbB Protein-Spezies in kompetenten Zellen zu produzieren, die anschließend isoliert und in verschiedenen Immunassays verwendet werden können, um das Vorhandensein von Antikörpern nachzuweisen, die spezifisch für solche erbB Proteine sind und in verschiedenen Körperflüssigkeiten vorhanden sind.

**[0040]** Zelluläres p185 der Ratte, dem die Kinase-Aktivität entweder aufgrund einer einzigen Aminosäure-Substitution in der Konsensus-Sequenz für die ATP-Bindung, N757, oder aufgrund einer Deletion der zytoplasmatischen Domäne, N691stop fehlte, war zur EGFR-induzierten Heterodimerisierung mit EGFR in lebenden Zellen in der Lage. EGF war außerdem im Stande, die Trans-Phosphorylierung von N757 via EGFR zu stimulieren. Jedoch waren Heterodimere, die aus EGFR und bestimmten trunkierten p185 Proteinen zusammengesetzt waren, Kinase-inaktiv (siehe: Qian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 1500). Ähnliche Ergebnisse wurden beobachtet, wenn ein anderes modifiziertes Konstrukt verwendet wurde, in welchem die Transmembran-Region des trunkierten p185 Proteins einen einzigen Austausch in der Aminosäuresequenz, T691stop, enthielt. Von strukturellen Änderungen in den Rezeptoren wurde gezeigt, dass sie als dominant negative Mutationen wirken, welche die Funktion der Wildtyp (wt)-Rezeptoren unterdrücken, wie z.B. den Insulin-Rezeptor (Chou et al., J. Biol. Chem., 1987, 262, 1842, oder EGFR (Honegger et al., J. Cell Biol., 1990, 110, 1541 und Kashles et al., Mol. Cell. Biol., 1991, 11, 1454).

**[0041]** Die vorliegende Erfindung stellt eine Rezeptor-basierte Strategie zur Wachstumsinhibition zur Verfügung, welche die aktivierte Onkoprotein-Rezeptoren der erbB-Tyrosinkinase-Familie targetet. Viele systemische epitheliale Krebsarten exprimieren onkogene Formen der erbB Rezeptoren, welche entweder durch Überexpression, Mutation oder Koexpression mit anderen erbB Familienmitgliedern ein tumorigenes Potential verleihen. Da die enzymatische Kinase-Funktion von erbB Rezeptoren bei der Dimerisierung oder Oligomerisierung aktiviert wird, inhibiert die vorliegende Erfindung die katalytische Aktivität von Oberflächen-basierten Rezeptoren während der Bildung von Kinase-defizienten Rezeptor-Komplexen, wodurch die tumorigen Wirkungen des erbB-Translationsprodukts reduziert werden.

**[0042]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Nukleinsäuremoleküle, die eine Nukleotid-Sequenz umfassen, die für ein Protein kodiert, dem die Tyrosinkinase-Aktivität fehlt und das mit Mitgliedern der erbB Rezeptor-Familie, wie z.B. erbB1 (EGFR), erbB2 (p185), erbB3 und/oder erbB4 dimerisiert. Die Nukleinsäuresequenz kann entweder eine DNA oder eine RNA sein. Die Nukleinsäuresequenz kann für jedes Protein kodieren, das mit einem erbB Protein dimerisiert und dem die Tyrosinkinase-Aktivität fehlt. Die Nukleinsäuresequenz kodiert vorzugsweise für ein erbB Protein der Ratte oder für ein humanes erbB Protein, das mit erbB Proteinen dimerisieren kann und dem außerdem die Tyrosinkinase-Aktivität fehlt. Gemäß einem Aspekt der Erfindung umfasst das Nukleinsäuremolekül eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein kodiert, dem die Tyrosinkinase-Aktivität fehlt und das mit humanem EGFR oder humanem p185 dimerisiert. Die Nukleinsäuresequenz kann entweder eine DNA oder eine RNA sein. Die Nukleinsäuresequenz kann für jedes Protein kodieren, das mit humanen EGFR und/oder p185 dimerisiert und dem die Tyrosinkinase-Aktivität fehlt. Die Nukleinsäuresequenz kodiert vorzugsweise für p185 Spezies der Ratte oder humane p185-Spezies, die mit humanem p185 oder humanem EGFR dimerisieren können und denen ebenfalls die Tyrosinkinase-Aktivität fehlt.

**[0043]** Die Verabreichung von Nukleinsäuremolekülen, die für Proteine kodieren, die fähig zur Bildung von Dimeren mit erbB-Translationsprodukten sind, wobei die Dimere jedoch keine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität aufweisen, beseitigt den transformierten Phänotyp von erbB-vermittelten Tumoren in einer Population, die an erbB-vermittelten Tumoren leidet. Darüber hinaus inhibiert die Verabreichung solcher Nukleinsäuremoleküle die neoplastische Entwicklung in Tieren, die anfällig für die Entwicklung von erbB-assoziierten Tumoren sind. Zum Beispiel haben Experimente gezeigt, dass p185 Dimere mit erbB-Translationsprodukten, wie z.B. anderen p185-Molekülen oder mit dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) bildet, und dass diese Dimeren eine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität aufweisen, welche für den transformierten Phänotyp in Zellen, die

solche Dimere aufweisen, verantwortlich ist. Die Verabreichung von Nukleinsäuremolekülen, welche für Proteine kodieren, die fähig zur Bildung von Dimeren mit erbB-Translationsprodukten, wie z.B. anderen p185-Molekülen oder mit EGFR sind, wobei die Dimere jedoch keine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität aufweisen, eliminiert den transformierten Phänotyp von neu-assoziierten Tumoren in einer Population, die an p185 vermittelten Tumoren leidet. Darüber hinaus inhibiert die Verabreichung solche Nukleinsäuremoleküle die neoplastische Entwicklung in Tieren, die anfällig für die Entwicklung von neu-transformierten Tumoren sind.

**[0044]** Das Auftreten von Säuger-Tumorzellen, die ein Translationsprodukt eines Mitglieds der erbB Genfamilie auf ihren Oberflächen exprimieren und dadurch einer erbB-vermittelten zellulären Transformation unterliegen, kann durch Verabreichung von Nukleinsäuremolekülen, die Sequenzen umfassen, die für Proteine kodieren, die Dimere mit den Translationsprodukten von erbB Genen bilden, jedoch keine Tyrosinkinase-Aktivität aufweisen, rückgängig gemacht oder verhindert werden. In Übereinstimmung mit der Erfindung werden solche Nukleinsäuremoleküle in Kombination mit Liefer-Komponenten, d.h. Liefer-Vehikeln, zur Verfügung gestellt, um das Einführen solcher Nukleinsäuremoleküle in die Zellen eines Tieres zu erleichtern. Eine wirksame Menge solcher Kombinationen wird einem Individuum verabreicht, von dem festgestellt wurde, dass es an erbB-vermittelten Tumoren leidet oder anfällig für erbB-vermittelte Tumoren ist.

**[0045]** Die vorliegende Erfindung stellt Nukleinsäuremoleküle zur Verfügung, die eine Nukleotidsequenz haben, die für ein Protein kodiert, dem die Tyrosinkinase-Aktivität fehlt und das mit dem Translationsprodukt eines Mitglieds der erbB Genfamilie dimerisiert. Die Nukleinsäuremoleküle werden in Kombination mit Liefer-Komponenten zur Verfügung gestellt, so dass bei der Verabreichung der Kombination das Nukleinsäuremolekül an die Zellen des Individuums geliefert werden. Wenn sie als pharmazeutische Zusammensetzung zur Verfügung gestellt wird, ist die Kombination nützlich für die Behandlung von Individuen, die an erbB-vermittelten zellulären Transformationen leiden. Solch eine pharmazeutische Zusammensetzung kann nützlich sein zur Verhinderung der erbB-vermittelten zellulären Transformation, insbesondere in Individuen, die für eine solche Transformation anfällig sind. Die Nukleinsäuremoleküle gemäß der Erfindung können außerdem nützlich sein, um spezifische Translationsprodukte eines Mitglieds der erbB Genfamilie in kompetenten Zellen herzustellen, die anschließend isoliert und in verschiedenen Immunassays verwendet werden können, um das Vorhandensein von Antikörpern nachzuweisen, die spezifisch für das Translationsprodukt sind, das in verschiedenen Körperflüssigkeiten vorhanden ist.

**[0046]** Die Nukleinsäuremoleküle gemäß der Erfindung werden in Kombination mit einer Vielzahl von Liefer-Komponenten verwendet, wie z.B. rekombinanten viralen Expressionsvektoren oder anderen geeigneten Liefer-Mitteln, um ihre Einführung und Expression in kompatiblen Wirtszellen zu bewirken. Im Allgemeinen können virale Vektoren DNA-Viren, wie z.B. rekombinante Adenoviren und rekombinante Vaccinia-Viren, oder RNA-Viren, wie z.B. rekombinante Retroviren sein. Andere rekombinante Vektoren schließen rekombinante Prokaryoten ein, die Zellen infizieren können und rekombinante Gene exprimieren. Zusätzlich zu rekombinanten Vektoren sind ferner andere Liefer-Komponenten vorgesehen, wie z.B. die Verkapselung in Liposomen, die Lipofektin-vermittelte Transfektion, die Transferrin-vermittelte Transfektion und andere Rezeptor-vermittelte Mittel. Die Erfindung soll solche anderen Formen von Expressionsvektoren und andere geeignete Liefermittel, die äquivalenten Funktionen dienen und die zukünftig auf dem Gebiet bekannt werden, einschließen.

**[0047]** In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird DNA mit Hilfe eines Adenovirus an kompetente Wirtszellen geliefert. Der Fachmann auf dem Gebiet würde diese Methode zum Einbringen von DNA in eine Wirtszelle mit Hilfe solcher Mittel sofort verstehen. Obwohl die Erfindung vorzugsweise Adenoviren einschließt, soll die Erfindung jeden Virus einschließen, der äquivalente Funktionen erfüllt. Beispiele für rekombinante adenovirale Vektoren schließen solche ein, bei denen die E1a-Region deletiert ist und die eine Temperatur-sensitive Mutation in E2a tragen (Engelhardt et al., Hum Gene Ther 5:1217–1229). Weitere Beispiele für rekombinante adenovirale Vektoren, die geeignet sind, um Nukleinsäuresequenzen gemäß der vorliegenden Erfindung zu liefern, sind in dem US-Patent Nr. 5 756 283 und US-Patent Nr. 5 707 628 beschrieben.

**[0048]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird RNA mit Hilfe eines Retrovirus an kompetente Wirtszellen geliefert. Der Fachmann auf dem Gebiet würde diese Methode zum Einbringen von RNA in eine Wirtszelle mit Hilfe solcher Mittel sofort verstehen. Jeder Retrovirus, der dazu dient, das durch die RNA kodierte Protein zu exprimieren, soll in der vorliegenden Erfindung eingeschlossen sein.

**[0049]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Nukleinsäure mit Hilfe eines Folat-Rezeptors geliefert. Die Nukleinsäuresequenz, die an die Wirtszelle geliefert werden soll, wird an Polylysin gekoppelt, und der Komplex wird mit Hilfe des Folat-Rezeptors in die Tumorzelle eingebracht.

US-Patent 5 108 921, erteilt am 28. April 1992 an Low et al. beschreibt solche Liefer-Komponenten.

**[0050]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform gemäß der vorliegenden Erfindung wird die Nukleinsäure durch die Verwendung des Lipofektin-vermittelten DNA-Transfers geliefert. LipofectAMIN™ Liposomenreagenz (Life Technologies, Gaithersburg MD) ist ein kommerziell erhältliches Liposomen-Verkapselungsreagenz, das zur Verkapselung der Zellen in Übereinstimmung mit den Angaben des Herstellers verwendet werden kann.

**[0051]** Mit LipofectAMIN™-Liposomenreagenz verkapselte Nukleinsäuremoleküle können unter Verwendung der Verabreichungsverfahren für Liposomen-Formulierungen an eine Wirtszelle geliefert werden.

**[0052]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Nukleinsäure durch die Verwendung des kationischen Lipid-vermittelten DNA-Transfers, wie z.B. dem in US-Patent Nr. 5 703 055 beschriebenen, geliefert.

**[0053]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Nukleinsäure durch die Verwendung des Liposomen-vermittelten DNA-Transfers, wie z.B. dem in US-Patent Nr. 4 235 871, US-Patent Nr. 4 241 046 und US-Patent Nr. 4 394 448 beschriebenen, geliefert.

**[0054]** Pharmazeutische Zusammensetzungen gemäß der Erfindung schließen Liefer-Komponenten in Kombination mit Nukleinsäuremolekülen ein, die weiterhin einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Vehikel umfassen, wie z.B. Salzlösung. Jedes Medium kann verwendet werden, das eine erfolgreiche Lieferung der Nukleinsäure erlaubt. Der Fachmann auf dem Gebiet würde die Vielzahl von pharmazeutisch annehmbaren Medien, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sofort begreifen.

**[0055]** Pharmazeutische Zusammensetzungen können von einem durchschnittlichen Fachmann auf dem Gebiet mit Zusammensetzungen formuliert werden, die abhängig von der gewählten Art der Verabreichung ausgewählt werden. Geeignete pharmazeutische Träger werden in Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, einem Standard-Referenztext auf diesem Gebiet, der hiermit durch Referenz eingeschlossen wird, beschrieben.

**[0056]** Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können durch jegliche Mittel verabreicht werden, welche dem Wirkstoff ermöglichen, die Wirkstätte des Stoffes in dem Körper eines Säugetieres zu erreichen. Pharmazeutische Zusammensetzungen können parenteral, d.h. intratumoral, intravenös, subkutan und intramuskulär verabreicht werden. Die intravenöse und die intratumorale Verabreichung sind die bevorzugten Wege.

**[0057]** Die Dosierung ist abhängig von bekannten Faktoren wie z.B. den pharmakodynamischen Eigenschaften des jeweiligen Agens und dessen Art und Weg der Verabreichung; dem Alter, dem Gesundheitszustand und dem Gewicht des Empfängers; der Art und der Ausprägung der Symptome, der Art der Simultanbehandlung, der Frequenz der Behandlung und dem gewünschten Effekt.

**[0058]** In einigen Ausführungsformen betrifft die Erfindung die Verwendung der Zusammensetzungen bei der Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von Patienten, die an humanen Adenokarzinomen leiden, die erbB-assoziierte Krebsarten sind, wie z.B. Adenokarzinome des Magens, der Lungen und des Pankreas und humane Brust- und Ovarial-Karzinome, ebenso wie humaner Brust- und Prostata-Krebs, die erbB-assoziierte Krebsarten sind. In einigen Ausführungsformen betrifft die Erfindung die Verwendung der Zusammensetzungen bei der Herstellung eines Medikamentes zur Vorbeugung dieser erbB-assoziierten Krebsarten in Individuen mit hohem Risiko. In einigen Ausführungsformen bezieht sich die Erfindung auf die Verwendung der Zusammensetzungen bei der Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von Patienten, die an einem progredienten glialen Tumor leiden, insbesondere beim Glioblastom, dem bösartigsten Gliatumor. In einigen Ausführungsformen bezieht sich die Erfindung auf Verfahren zur Verhinderung dieser erbB-assoziierten Krebsarten in Individuen mit hohem Risiko.

**[0059]** In einigen Ausführungsformen bezieht sich die Erfindung auf Verfahren zur Behandlung von Patienten, die an humanen epithelialen Malignomen, erythroider Leukämie, Fibrosarkom, Angiosarkom und Melanom leiden. In einigen Ausführungsformen bezieht sich die Erfindung auf Verfahren zur Verhinderung dieser erbB-assoziierten Krebsarten in Individuen mit hohem Risiko.

**[0060]** Gemäß einigen Ausführungsformen der Erfindung werden die pharmazeutischen Zusammensetzun-

gen lokal an der Stelle des Tumors verabreicht. In einigen Ausführungsformen werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen direkt in die Tumorzellen und das Gewebe, welches den Tumor unmittelbar umgibt, verabreicht. In einigen Ausführungsformen werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen in Hirntumore verabreicht, wie z.B. Glioblastome. In einigen Ausführungsformen werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen in Hirntumore als Teil der chirurgischen Resektion des Tumors eingebracht. In einigen Ausführungsformen werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen in die Hirntumore unter Verwendung stereotaxischer chirurgischer Methoden eingebracht.

**[0061]** Der Patient wird im Zusammenhang mit der Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß der Erfindung mit Bestrahlung oder anderer Chemotherapie behandelt. Chemotherapie-Ansätze schließen die Verabreichung von zytotoxischen und zytostatischen Agenzien ein. Es wurde beobachtet, dass die Expression von Nukleotidmolekülen gemäß der Erfindung in erbB-assozierten Tumoren den Tumor radiosensitiv machen. Das heißt, der Tumor wird verwundbarer gegenüber der Zerstörung durch Strahlung während der Strahlentherapie, wenn der Patient mit pharmazeutischen Zusammensetzungen gemäß der Erfindung behandelt wird. Die Verwendung verschiedener therapeutischer Ansätze stellt den Patienten eine Intervention auf breiterer Basis zur Verfügung. In einigen bevorzugten Ausführungsformen geht der Behandlung mit den pharmazeutischen Zusammensetzungen gemäß der Erfindung ein chirurgischer Eingriff voraus. In bevorzugten Ausführungsformen folgt der Strahlentherapie die Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzungen gemäß der Erfindung. In bevorzugten Ausführungsformen wird die Strahlentherapie unter Verwendung von Gammastrahlung bereit gestellt, gefolgt von der Verabreichung der Zusammensetzungen, die strahlenresistente Tumore strahlensensitiv machen. Die Fachleute auf dem Gebiet können ein geeignetes radiotherapeutisches Behandlungsschema einfach entwerfen. Carlos A Perez & Luther W Brady: Principles and Practice of Radiation Oncology, 2nd Ed. JB Lippincott Co., Phila., 1992 beschreibt Strahlentherapie-Protokolle und Parameter, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können. Für GBMs (Glioblastom, der maligneste gliale Hirntumor), Simpson W.J. et al.: Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforms: Results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. Int J Radiat Oncol Biol Phys 26:239–244, 1993 beschreibt klinische Protokolle, die für die vorliegenden Erfindung nützlich sind. In ähnlicherweise beschreibt Borgelt et al., The palliation of brain metastases: Final results of the first two studies of the Radiation Therapy Oncology Group. Int J Radiat Oncol Biol Phys 6:1–9, 1980 klinische Protokolle, die in dem Verfahren gemäß davorliegenden Erfindung verwendbar sind.

**[0062]** In Übereinstimmung mit einigen Ausführungsformen werden Varianten des p185 neulerbB2 Rezeptors verwendet, da von diesem Rezeptor gezeigt wurde, dass er der bevorzugte Partner zur Heterodimerbildung für alle Kinasen der erbB Familie ist, einschließlich erbB1/epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), erbB3 und erbB4. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine bevorzugte Form des Kinase-defizienten p185neu zur Verwendung bei der Behandlung von erbB-exprimierenden humanen Tumoren mit Hilfe rekombinanter Adenovirus-Partikel als Gen-Therapie zur Behandlung residueller, lokaler Erkrankung eher als fortgeschritten, ausgedehnter Erkrankung verabreicht. Die Anwendung chirurgischer Methoden findet sowohl für die lokale Verabreichung als auch zur Reduzierung bei ausgedehnten Erkrankungen (bulk disease), die charakteristisch für solide Tumoren sind, Anwendung. Multiple humane Krebsarten, die Kombinationen von erbB Rezeptoren exprimieren, können das Ziel für diese Rezeptor-basierte Strategie der Wachstumsinhibition sein.

**[0063]** Die Inhibition, die durch das Einführen mutierten p185neu Rezeptoren vermittelt wird, verursacht eine synergistische Wachstumsinhibition, wenn sie mit konventionellen zytotoxischen Mitteln wie z.B. der Gamma-Bestrahlung kombiniert wird. Die vorliegende Erfindung kann verwendet werden, um viele epitheliale solide Tumoren zu behandeln, da die Erfindung die Verwendung von bereits etablierten Behandlungsmodalitäten komplementiert.

**[0064]** In humanen Hirntumorzellen, die erhöhte Mengen des EGFR exprimieren, ist die Kinasedefiziente T691stop Form von p185neu zum Erreichen einer Inhibition des Zellwachstums und der Transformation effektiver als die N691stop Form von p185neu. T691stop neu inhibiert außerdem die konstitutive Signalübertragung eines mutierten EGFR, der spezifisch in vielen epithelialen Tumoren exprimiert wird, einschließlich der malignen humanen Gliome, und von ihm wurde gezeigt, dass er die Kinase-Aktivität von onkogenen, vollständig langem p185neu in primären Krebszellen von Säugern reduziert. T691stop neu enthält die Punktmutation in der Transmembran-Domäne des neu der Ratte, welche die Aminosäure an Position 664 von Valin zu Glutamin ändert, was zu einer Veränderung in der Tendenz dieses Rezeptors zur Bildung dimerer und oligomerer Komplexe führt.

**[0065]** T691stop neu mutierte cDNA wurde in rekombinante adenovirale Konstrukte subkloniert. Ein Vek-

tor-Rückgrat weist eine deletierte E1a-Region auf und trägt eine temperatursensitive Mutation in E2a (Engelhardt et al., Hum. Gene Ther. 5:1217–1229, 1994). Die rekombinante Derivatisierung wurde in zwei Schritten erreicht. Zunächst subklonierten wir T691stop neu in ein Expressionsplasmid (pAd.CMV.link wie in Beispiel 6), das adenovirale Sequenzen enthält, die notwendig für die virale rekombinante Produktion sind, wodurch pAd.CMV.T691stop erzeugt wurde. Plaque-gereinigte rekombinante adenovirale Partikel, die T691stop neu exprimieren, wurden erzeugt. Unser Labor bestätigte die funktionelle Expression von T691stop mutierten neu Proteinen nach der Infektion von humanen Krebszellen mit adenoviralen rekombinanten Partikeln mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse. Folglich wurde eine rekombinante reine adenovirale Rekombinante isoliert, die hohe Konzentrationen an T691stop neu in humanen Krebszellen exprimiert, und kann als Antikrebsreagenz verwendet werden. T691stop neu-exprimierende adenovirale Rekombinante mit Veränderungen in dem viralen Rückgrat, welche die virale rekombinante Verabreichung für die humane Anwendung geeigneter machen, wurden entworfen. Spezifisch wurden adenovirale Rekombinante hergestellt, welche die E1a Deletion mit einer zusätzlichen Deletion in der E4 Region enthalten (siehe Beispiel 7).

**[0066]** Gemäß einigen bevorzugten Ausführungsformen stellt die vorliegende Erfindung eine Antikrebs-Gen-therapie-Behandlung zur Behandlung von residueller, lokaler Erkrankung als therapeutisches Adjuvans in Kombination mit bereits existierenden Behandlungsformen zur Verfügung. Die Lieferung/Verabreichung erfolgt lokal zum Zeitpunkt der Operation, am wahrscheinlichsten nach der groben Resektion des erkrankten Gewebes. Bei primären malignen Hirntumoren wird die Gen-Therapie zum Zeitpunkt der Tumorresektion oder, in bestimmten Fällen, durch stereotaktische Implantation, einem präzisen Standardverfahren zur lokalen Verabreichung oder Resektion, verabreicht. Die Expression von T691stop neu ist nicht zytoidal oder toxisch für sich nicht-teilende Zellen. Jedoch macht die Inhibition der Signalgebung über den erbB Rezeptor durch die T691stop neu mutierten Rezeptoren eine sich teilende Tumorzellen-Population sensitiver gegenüber dem apoptotischen Zelltod, der durch Bestrahlung induziert wird. Die T691stop neu Form induziert außerdem einen höheren Anteil an Wachstumsarrest in Tumorzellen, die mit Gammastrahlung behandelt wurden. Die Inhibition der Wachstumsfaktor-vermittelten Signalgebung wurde in zahlreichen Systemen mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber Standard-Antikrebs-Reagenzien in Zusammenhang gebracht.

**[0067]** Residuelle lokale Erkrankung kann gemäß der vorliegenden Erfindung mit einer Rezeptor-basierten Strategie der Wachstumsinhibition behandelt werden, welche die Signalgebung durch Onkoproteine der erbB Familie behindert. Diese Gen-Therapie-Strategie ist Teil einer kombinierten Behandlungsprozedur, um eine Synergie der Wachstumsinhibition durch direkte (Inhibition der Rezeptor-Signalgebung) und indirekte Mechanismen (d.h. durch Sensibilisieren der Krebszellen gegenüber gleichzeitiger Behandlung mit bereits existierenden Mitteln) zu erreichen.

**[0068]** Viele Tumore sind bemerkenswert, entweder aufgrund der Überexpression und/oder der Mutation von erbB Rezeptoren, einschließlich des EGFR (erbB1), p185neu/erbB2, erbB3 und/oder erbB4. In vielen Fällen führt die Koexpression von erbB Familienmitgliedern zu einer synergistischen Signalübertragung und trägt zu der Zell-Transformation bei. Tumoren, die aufgrund einer p185neu/erbB2 Überexpressionen bemerkenswert sind, schließen Brust-, Ovarial-, Lungen- und Pankreaskrebs ein. Tumore, die aufgrund einer EGFR-Überexpression bemerkenswert sind, schließen primäre gliale Hirntumore und Prostata-Krebsarten ein. Gen-Lieferung von trunkierten p185neu Formen, d.h. von T691stop neu cDNAs oder Proteinen, stellt eine rationale Strategie für die Behandlung von residuellen, lokalen Erkrankungen in diesen humanen Krebsarten dar.

**[0069]** Die vorliegende Erfindung ist besonders nützlich zur Behandlung von Patienten, die gliale Hirntumoren haben, d.h. Tumore, die durch Glioblastome gekennzeichnet sind. Solche Zellen exprimieren eine mutierte Form von EGFR, die typischerweise mit Tumorigenität assoziiert ist. Es wurde entdeckt, dass die vorliegende Erfindung insbesondere nützlich zur Behandlung solcher Patienten ist.

**[0070]** In einigen Ausführungsformen werden die Nukleinsäuresequenzen, welche für die verschiedenen p185-Spezies der Ratte kodieren, aus c-neu cDNA gemäß den in den Beispielen dargelegten Verfahren konstruiert. Nukleinsäuresequenzen, die für wt, trunkierte und mutierte p185-Spezies der Ratte kodieren, werden auf diese Weise hergestellt. Die Nukleotidsequenzen der hergestellten p185-Konstrukte werden mit Hilfe der DNA-Sequenzierung überprüft. Der Fachmann auf dem Gebiet würde Verfahren zur Konstruktion solcher Nukleinsäure-Konstrukte einfach verstehen.

**[0071]** Nach der Herstellung solcher Konstrukte werden sie in geeignete Wirtszellen transfiziert, in denen sie exprimiert werden. Der Fachmann auf dem Gebiet würde die große Vielzahl an geeigneten Wirtszellen, die verwendet werden können, einfach erfassen. Innerhalb dieser geeigneten Wirtszellen wird die Fähigkeit der p185-Spezies, die von dem hergestellten Nukleotidkonstrukt produziert werden, entweder mit p185 oder mit

EGFR zu dimerisieren, untersucht. Eine solche Untersuchung kann Immunblotting, Durchflusszytometrie, SDS-Page-Analyse, ebenso wie andere Methoden, die den Fachleuten auf dem Gebiet wohlbekannt sind, umfassen. Darüber hinaus kann außerdem die Tyrosinkinase-Aktivität der p185-Spezies überprüft werden. Es liegt außerdem im Wissensbereich des Fachmanns auf dem Gebiet, die Tyrosinkinase-Aktivität durch eine Vielzahl von Methoden auszuwerten.

**[0072]** Sobald das Fehlen des tk<sup>-</sup>-Phänotyps der p185-Spezies und die Fähigkeit zur Dimerisierung mit EGFR oder p185 festgestellt wurde, kann die Nukleinsäuresequenz, die für die p185-Spezies kodiert, in einen geeigneten Expressionsvektor zur Transfektion in humane Zellen subkloniert werden. Alternativ kann die Nukleinsäuresequenz in Kombination mit weiteren Liefermitteln wie oben dargelegt verwendet werden.

**[0073]** Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung umfasst das Nukleinsäuremolekül eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein kodiert, dem die Tyrosinkinase-Aktivität fehlt und das mit humanem EGFR oder humanem p185 dimerisiert. Die Nukleinsäuresequenz kann eine DANN oder eine RNA sein. Die Nukleinsäuresequenz kann für ein beliebiges Protein kodieren, das mit humanem EGFR und/oder dem humanen p185 dimerisiert und dem die Tyrosinkinase-Aktivität fehlt. In einigen bevorzugten Ausführungsformen kodiert die Nukleinsäuresequenz für ein Protein, welches die Region für die Ektodomäne der p185-Spezies der Ratte oder der humanen p185-Spezies umfasst. Solche Proteine dimerisieren mit erbB Proteinen wie z.B. dem humanen p185 oder humanen EGFR, und es fehlt ihnen außerdem die Tyrosinkinase-Aktivität.

**[0074]** In einigen bevorzugten Ausführungsformen schließen die Konstrukte die neu Transmembran-Region der Ratte ein. In einigen bevorzugten Ausführungsformen enthält die neu Transmembran-Region der Ratte ein Val → Glu Mutation bei Aminosäure 664. Die neu Transmembran-Region der Ratte ohne die Mutation bei Aminosäure 664 wird als die „N“-Form, und die neu Transmembran-Region der Ratte mit der Mutation bei Aminosäure 664 wird als die „T“-Form bezeichnet.

**[0075]** In einigen bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kodiert die Nukleinsäuresequenz für eine trunkierte Spezies von p185 der Ratte. Die vorliegende Erfindung schließt jede trunkierte Spezies des p185 der Ratte ein, die entweder N-terminale oder C-terminale Deletionen umfasst, die entweder mit dem humanen p185 oder dem humanen EGFR dimerisiert und der die Tyrosinkinase-Aktivität fehlt. Darüber hinaus können auch trunkierte Spezies, welche substituierte Aminosäuren umfassen, wirksam sein. Jedoch müssen die trunkierten Spezies fähig sein, mit humanem p185 oder humanem EGFR zu dimerisieren. Folglich ist jeder Teil von p185, der in der Lage ist, entweder mit humanem p185 oder humanem EGFR zu dimerisieren und gleichzeitig einen tk<sup>-</sup> Phänotyp aufweist, hierin eingeschlossen. Bevorzugterweise kodiert die Nukleinsäuresequenz für ein Protein, das aus den Aminosäureresten von p185 der Ratte von etwa 1-690 bis etwa 1-740 besteht. Einige bevorzugte Ausführungsformen umfassen die N-Form der Transmembran-Region, während in anderen die T-Form vorhanden ist.

**[0076]** In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kodiert die Nukleinsäuresequenz für eine p185-Spezies der Ratte, der die Tyrosinkinase-Aktivität aufgrund der Substitution oder Deletion von Teilen von Aminosäuren fehlt, insbesondere solcher innerhalb der Region des Moleküls, die für die Tyrosinkinase-Aktivität verantwortlich ist. Die vorliegende Erfindung schließt jede tk<sup>-</sup> Spezies von p185 der Ratte ein, einschließlich der Substitution oder Deletion von Aminosäuren, die für die tk-Aktivität verantwortlich sind, wobei die Spezies außerdem mit dem humanen p185 oder humanem EGFR dimerisiert. Darüber hinaus kann eine solche Spezies, welche substituierte Aminosäuren außerhalb der tk-assoziierten Sequenzen umfasst, ebenfalls wirksam sein. Einige Ausführungsformen umfassen die N-Form der Transmembran-Region, während in anderen die T-Form vorhanden ist.

**[0077]** Die Positionen 753-758 von p185 der Ratte umfassen einen entscheidenden Lysinrest, der direkt an das ATP-Molekül bindet, welches der Phosphatdonor in der Tyrosinkinase-Reaktion ist (Moller et al., FEBS Lett., 1985, 186, 1; und Sternberg et al., FEBS Lett., 1984, 175, 387). Lys<sup>757</sup> liegt 15 Aminosäurereste stromabwärts eines konservierten Motivs, dass auch in Nukleotid-bindenden Proteinen ohne Kinase-Aktivität zu finden ist (Wierenga et al., Nature, 1983, 302, 842). Es wird angenommen, dass die Glycinreste eine hydrophoben Tasche um den kritischen Lysinrest bilden, der direkt das ATP-Molekül bindet (Moller et al., FEBS Lett., 1985, 186, 1; und Sternberg et al., FEBS Lett., 1984, 175, 387). Folglich sind sämtliche Spezies von p185, welche einer Zerstörung in der ATP-bindenden Domäne oder der umgebenden Region umfassen, wobei ATP nicht länger an den kritischen Lys-Rest bindet, hierin eingeschlossen. Jedoch müssen diese Spezies außerdem mit humanem p185 oder humanem EGFR dimerisieren. Vorzugsweise kodiert die Nukleinsäuresequenz für ein Protein, das die Aminosäuresequenz von p185 der Ratte hat, die in der GENE BANK Zugangs-Nr. X03362 und in Bargmann, et al. (1986) Nature, 319, 226-230, MEDLINE Identifikation: 86118662; und Lofts et al. (1993)

Oncogene 8, 2813–2820 dargestellt ist, wobei diese Aminosäuresequenz von etwa der Position 753 bis etwa 758 eine Substitution oder Deletion oder eine Kombination von beiden enthält, wobei die genannte Substitution kein Lysin-Rest umfasst. Einige bevorzugte Ausführungsformen umfassen die N-Form der Transmembran-Region während in anderen die T-Form vorhanden ist.

**[0078]** In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kodiert die Nukleinsäuresequenz für p185 der Ratte, wobei die Aminosäuresequenz eine Substitution oder Deletion bei Position 757 enthält. Diese Substitution oder Deletion entfernt den kritischen Lys-Rest an dieser Position spezifisch. Folglich kann ATP dieses Molekül nicht länger binden, was zu einem tk- Phänotyp führt. Einige bevorzugte Ausführungsformen umfassen die N-Form der Transmembran-Region, während in anderen die T-Form vorhanden ist.

**[0079]** In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kodiert die Nukleinsäuresequenz für eine trunkierte Spezies des humanen p185. Die vorliegende Erfindung schließt jede trunkierte Spezies von humanem p185 ein, die entweder N-terminale oder C-terminale Deletionen umfasst, die entweder mit humanem p185 oder humanem EGFR dimerisiert und der die Tyrosinkinase-Aktivität fehlt. Darüber hinaus können auch trunkierte Spezies, die substituierte Aminosäuren umfassen, wirksam sein. Jedoch muss die trunkierte Spezies fähig sein, mit humanem p185 oder humanem EGFR zu dimerisieren. Folglich ist jeder Teil von humanem p185, der fähig ist, entweder mit humanem p185 oder humanem EGFR zu dimerisieren, während er außerdem einen tk- Phänotyp aufweist, hierin eingeschlossen. Vorzugsweise kodiert die Nukleinsäuresequenz für ein Protein, das aus den Aminosäureresten von etwa 1–646 bis etwa 1–704 von humanem p185 besteht. In einigen Ausführungsformen kodiert die Nukleinsäuresequenz für ein Protein, das aus den Aminosäureresten von etwa 1–653 von humanem p185 besteht.

**[0080]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kodiert die Nukleinsäuresequenz für eine Spezies von humanem p185, der die Tyrosinkinase-Aktivität aufgrund der Substitution oder Deletion von Teilen von Aminosäuren, insbesondere solcher innerhalb der Region des Moleküls, die verantwortlich für die Tyrosinkinase-Aktivität ist, fehlt. Die vorliegende Erfindung schließt jede tk- Spezies von humanem p185 ein, die entweder eine Substitution oder Deletion von Aminosäuren umfasst, die für die tk-Aktivität verantwortlich sind, wobei die Spezies außerdem mit humanem p185 oder humanem EGFR dimerisiert. Darüber hinaus können auch solche Spezies wirksam sein, die substituierte Aminosäuren außerhalb der tk-assoziierten Sequenzen umfassen.

**[0081]** Die Positionen 749–754 von humanem p185 umfassen den kritischen Lysin-Rest, der das ATP-Molekül, welches der Phosphatdonor in der Tyrosinkinase-Reaktion ist, direkt bindet. Sämtliche Spezies von p185, die eine Zerstörung in der ATP-bindenden Domäne oder der umgebenden Region umfasst, in denen ATP nicht länger an den kritischen Lys-Rest bindet, sind hierin eingeschlossen. Jedoch müssen diese Spezies außerdem mit humanem p185 oder humanem EGFR dimerisieren. Vorzugsweise kodiert die Nukleinsäuresequenz für ein Protein, das die Aminosäuresequenz von humanem p185 aufweist, die in der GENEBANK Zugangs-Nr. X03363, die hierin durch Referenz eingeschlossen ist und in Yamamoto, et al. (1986) Nature 319, 230–234, der MEDLINE-Identifikation: 86118663 und in Papewalls, et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 5452–5452, MEDLINE Identifikation: 92020265 dargestellt ist, wobei diese Aminosäuresequenz eine Substitution oder Deletion enthält oder eine Kombination davon, von etwa Position 749 bis etwa 754, wobei die genannte Substitution keinen Lysin-Rest umfasst.

**[0082]** In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kodiert die Nukleinsäuresequenz für humanes p185, wobei die Aminosäuresequenz eine Substitution oder Deletion bei Position 753 enthält. Diese Substitution oder Deletion entfernt den entscheidenden Lys-Rest an dieser Position spezifisch. Folglich kann ATP dieses Molekül nicht länger binden, was zu einem tk- Phänotyp führt.

**[0083]** In einigen Ausführungsformen kodiert die Nukleinsäure für ein humanes EGFR-Protein, ein humanes p185 Protein, ein von humanem erbB3 abgeleitetes Protein oder ein von humanem erbB4 abgeleitetes Protein. In einigen Ausführungsformen kodiert die Nukleinsäure für ein Fusionsprotein. Das Fusionsprotein wird durch chimäre Sequenzen kodiert, die von humanen und nicht-humanen, insbesondere Ratten-Sequenzen abgeleitet sind.

**[0084]** In einigen Ausführungsformen ist die Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: einem trunkierten neu der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 (N691stop Konstrukt); einem trunkierten neu der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 und einer Val → Glu Mutation bei Aminosäure 664 (T691stop Konstrukt); einem chimären p185 Gen, das die humane p185c-erbB2 Ektodomäne umfasst, die mit der neu Transmemb-

ran-Region der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 verbunden ist (N691stop Konstrukt); einem p185 Gen, das die Ektodomäne des humanen p185c-erb82 umfasst, die mit der neu Transmembran-Region der Ratte verbunden ist, mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 und einer Val → Glu Mutation bei Aminosäure 664 (T691stop Konstrukt); einem chimären p185 Gen, das die Ektodomäne des humanen EGFR umfasst, die mit der neu Transmembran-Region der Ratte verbunden ist, mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 (N691stop Konstrukt); einem chimären p185 Gen, das die Ektodomäne des humanen EGFR umfasst, die mit der neu Transmembran-Region der Ratte verbunden ist, mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 und einer Val → Glu Mutation bei Aminosäure 664 (T691stop Konstrukt); einem chimären p185 Gen, das die Ektodomäne des humanen erbB3 umfasst, die mit der neu Transmembran-Region der Ratte verbunden ist, mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 (N691stop Konstrukt); einem chimären p185 Gen, das die Ektodomäne des humanen erbB3 umfasst, die mit der neu Transmembran-Region der Ratte verbunden ist, mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 und einer Val → Glu Mutation bei Aminosäure 664 (N691stop Konstrukt); einem chimären p185 Gen, das die Ektodomäne des humanen erbB4 umfasst, die mit einer neu Transmembran-Region der Ratte verbunden ist, mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 (N691stop Konstrukt); und einem chimären p185 Gen, das die Ektodomäne des humanen erbB4 umfasst, die mit einer neu Transmembran-Region der Ratte verbunden ist, mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 und einer Val → Glu Mutation bei Aminosäure 664 (T691stop Konstrukt).

**[0085]** Anders als nicht-transformierte replizierende Zellen, die getötet werden können, wenn sie einer therapeutischen Bestrahlung ausgesetzt werden, sind Tumorzellen gegenüber der Induktion des Zelltodes durch Bestrahlung resistent. Es wurde jetzt herausgefunden, dass durch Zerstörung der multimeren Anordnungen, die eine erhöhte Kinase-Aktivität produzieren, die mit dem transformierten Phänotyp einer Tumorzelle assoziiert ist, wie z.B. einer Tumorzelle, die normalerweise resistent gegenüber der durch Bestrahlung induzierten Zelltod ist, empfindlich gegenüber Bestrahlung wird. Entsprechend stellt ein Aspekt der vorliegenden Erfindung Verfahren zur Verfügung, um Bestrahlungs-resistente Tumorzellen, Bestrahlungs-sensitiv zu machen. Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung einer Zusammensetzung, welche die mit der multimeren Rezeptor-Anordnung assoziierter Kinase-Aktivität zerstört, bei der Herstellung eines Medikamentes zur Verabreichung in Kombination mit Gamma-Bestrahlung an ein Individuum, das Tumorzellen aufweist, die multimedre Rezeptor-Anordnungen haben, die eine mit einem transformierten Phänotyp assoziierte Kinase-Aktivität bereitstellen.

**[0086]** Es gibt mehrere bekannte Rezeptor-Anordnungen, die in Tumorzellen eine erhöhte Kinase-Aktivität zeigen, die mit dem transformierten Phänotyp assoziiert ist. Von Mitgliedern der erbB Rezeptor-Familie ist bekannt, dass sie multimedre Ensembles bilden, die zu einer erhöhten Tyrosinkinase-Aktivität in Tumorzellen führen. Multimedre Anordnungen, an denen Mitglieder der erbB Familie beteiligt sind, schließen erbB-Homodimere ebenso wie erbB-Heterodimere ein, welche monomere Komponenten von verschiedenen erbB Familienmitgliedern umfassen. Multimedre Rezeptor-Anordnungen von Rezeptoren des aus Blutblättchen stammenden Wachstumsfaktors (platelet derived growth factor receptors, PDGFR) zeigen ebenfalls eine erhöhte Kinase-Aktivität, die mit dem transformierten Phänotyp assoziiert ist.

**[0087]** Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Dimerbildung von erbB Proteinen in erbB-vermittelten Tumorzellen zerstört, um solche Zellen empfindlicher gegenüber der Zellzerstörung unter Verwendung von Bestrahlung zu machen. Entsprechend werden Kombinationstherapien zur Verfügung gestellt, welche zunächst die Verabreichung einer Zusammensetzung an ein Individuum umfassen, die einen Wirkstoff umfasst, der zu einer Störung der erbB-Dimerisierung führt, gefolgt von der Exposition des Patienten gegenüber einer therapeutischen Bestrahlungsmenge. Gemäß diesen Aspekten der Erfindung werden Zusammensetzungen zur Verwendung bei der Behandlung von Individuen zur Verfügung gestellt, die einen erbB Protein-vermittelten Tumor haben. Eine Zusammensetzung, welche die erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität inhibiert, die aus der Dimerisierung von erbB Proteinen in einer Tumorzelle resultiert, wird dem Individuum verabreicht, gefolgt von der Exposition des Individuums gegenüber einer therapeutisch wirksamen Menge einer Antikrebsbestrahlung nach einer Zeitspanne, die ausreichend für die Zusammensetzung ist, um die Tyrosinkinase-Aktivität zu inhibieren, die mit der Dimerisierung von erbB Proteinen der Tumorzelle assoziiert ist.

**[0088]** In einigen Tumorzellen ist das p185-Translationsprodukt des erbB2-Gens überexprimiert und bildet Homodimere und Heterodimere mit anderen erbB Familienmitgliedern. Eine solche Dimerisierung von überexprimiertem p185 führt zu erhöhten Tyrosinkinase-Aktivitäten, was mit dem transformierten Phänotyp assoziiert ist. Die Zerstörung der Tyrosinkinase-Aktivität, wie z. B. durch Inhibition der Dimerbildung zwischen monomeren Komponenten, führt zu einem zytostatischen Effekt auf die Tumorzellen. Es wurde jetzt herausgefunden,

den, dass die Zerstörung außerdem die zuvor Bestrahlungs-resistenten Tumorzellen Bestrahlungs-empfindlich macht.

**[0089]** In ähnlicher Weise wird in einigen Tumorzellen eine mutierte Form von EGFR ( $\Delta$ EGFR) exprimiert, die Liganden-unabhängig ist.  $\Delta$ EGFR bildet Homodimere und Heterodimere mit Wildtyp EGFR und anderen erbB Familienmitgliedern. Solche Dimerisierungen von  $\Delta$ EGFR führen zu erhöhten Tyrosinkinase-Aktivitäten, was mit dem transformierten Phänotyp assoziiert ist. Die Zerstörung der Tyrosinkinase-Aktivität, wie z.B. durch Inhibition der Dimerbildung zwischen monomeren Komponenten, führt zu einem zytostatischen Effekt auf die Tumorzellen. Es wurde nun herausgefunden, dass die Zerstörung außerdem die zuvor Bestrahlungs-resistenten Tumorzellen Bestrahlungs-sensitiv machen.

**[0090]** In einigen Ausführungsformen ist der erbB Protein-vermittelte Tumor ein Hirnkrebstumor. In einigen Ausführungsformen ist der erbB Protein-vermittelte Tumor ein glialer Tumor. In einigen Ausführungsformen ist der erbB Protein-vermittelte Tumor ein Glioblastom. In einigen Ausführungsformen ist der erbB Protein-vermittelte Tumor ein Brustkrebstumor. In einigen Ausführungsformen ist der erbB Protein-vermittelte Tumor ein Ovarial-Krebstumor. In einigen Ausführungsformen ist der erbB Protein-vermittelte Tumor ein pankreatischer Krebstumor.

**[0091]** In einigen Ausführungsformen wird die mit der multimeren Rezeptor-Anordnung assoziierte Kinase-Aktivität durch Verabreichung einer Zusammensetzung an das Individuum zerstört, die einen Wirkstoff umfasst, der mit einer monomeren Komponente der Anordnung interagiert und so die Dimerisierung durch physikalische Veränderung des Monomers verhindert, so dass es thermodynamisch weniger geneigt ist, die Anordnung zu bilden. Solche physikalischen Veränderungen können z.B. konformationelle, sterische und/oder elektrostatische Änderungen sein, welche das Monomer in einen Zustand versetzt, der für die Dimerbildung weniger geeignet ist. Beispiele für Wirkstoffe, die das Monomer physikalisch verändern, schließen Antikörper, Proteine, Peptide und nicht-proteinöse Moleküle ein.

**[0092]** Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff „Antikörper“ Antikörper, ebenso wie Antikörper-Fragmente, wie z.B. FAb- und F(Ab)<sub>2</sub>-Fragmente. Antikörper können in einigen Ausführungsformen monoklonale Antikörper oder humanisierte Antikörper sein. Antikörper gegen p185 sind in US-Patent-Nr. 5,677,171 und US-Patent Nr. 5,705,157, das außerdem Antikörper gegen EGFR beschreibt, beschrieben. US-Patent Nr. 5,470,571 beschreibt ebenfalls Antikörper gegen EGFR.

**[0093]** In einigen Ausführungsformen werden Peptide, die Antikörper nachahmen, zur Verfügung gestellt, um die Bildung multimerer Anordnungen zu inhibieren und die mit einer solchen Bildung assoziierte erhöhte Kinase-Aktivität zu inhibieren. Zum Beispiel werden Peptide konstruiert, die Sequenzen aufweisen, die mit den CDR-Regionen von Antikörpern übereinstimmen. Verfahren zur Herstellung solcher Peptide sind außerdem in WO 95/34312 beschrieben. Peptidomimetische Antikörper gegen P185 werden in US-Patent Nr. 5,663,144 beschrieben.

**[0094]** Gemäß einigen Ausführungsformen der Erfindung umfasst die Zusammensetzung, die dem Individuum verabreicht wird, um die mit der multimeren Rezeptor-Anordnung assoziierten Kinase-Aktivität zu zerstören, einen Wirkstoff, der ein Nukleinsäuremolekül ist, das für ein Kinase-defizientes Protein oder Peptid kodiert, das mit einer monomeren Komponente der genannten Anordnung interagiert, um es an der Interaktion mit einer weiteren Komponente der Anordnung zu hindern. Das heißt, das Nukleinsäuremolekül kodiert für ein Kinase-defizientes Protein, das mit dem endogenen Protein der Zelle um die Bildung multimerer Komplexe kompetitiert. Komplexe, die zwischen dem Kinasedefizienten Protein und den endogenen Proteinen der Zelle gebildet werden, stellen keine erhöhte Kinase-Aktivität zur Verfügung. Folglich wirken die Kinase-defizienten Proteine als Köder zur Bindung endogener Proteine und verhindern dadurch die Bildung Kinase-aktiver multimerer Komplexe. Beispiele für solche Nukleinsäuremoleküle werden in US 5,837,523 beschrieben.

**[0095]** Gemäß einigen Verfahren ist die Zusammensetzung, die einem Patienten verabreicht wird, die eine Verbindung umfasst, die kompetitiv mit einem erbB Protein in einer Tumorzelle interagiert, um die Dimerbildung mit einem anderen erbB Protein zu inhibieren, um die Dimerisierung von erbB Proteinen zu verringern, ein Nukleinsäuremolekül, das für ein Protein kodiert. Das Protein blockiert die Dimerbildung durch kompetitive Interaktion mit einem erbB Protein. In einigen Ausführungsformen interagiert das Protein mit der Transmembran-Region des genannten erbB Proteins. In einigen dieser Ausführungsformen umfasst das Protein, das mit der Transmembran-Region des erbB Proteins interagiert, eine neue Transmembran-Region der Ratte mit einer Val zu Glu Mutation bei Aminosäure 664. In einigen Ausführungsformen interagiert das Protein mit der Ektodomänen-Region des erbB Proteins. In einigen dieser Ausführungsformen umfasst das Protein, das mit der

Ektodomänen-Region des erbB Proteins interagiert, eine p185 Ektodomäne. In einigen bevorzugten Ausführungsformen ist das Nukleinsäuremolekül, das für das Protein kodiert, ein virales Genom. In einigen bevorzugten Ausführungsformen ist es ein Genom eines rekombinanten Adenovirus. Gemäß einigen Ausführungsformen umfasst das Nukleinsäuremolekül eine kodierende Sequenz, die funktionell mit regulatorischen Elementen für die Translation in Zellen des genannten Individuums verbunden ist. In einigen Ausführungsformen umfasst die kodierende Sequenz Sequenzen, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus: einem trunzierten neu Gen der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691; einem trunzierten neu Gen der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 und einer Val → Glu Mutation bei Aminosäure 664; einem chimären p185 Gen, das die Ektodomäne des humanen p185c-erbB2 umfasst, die mit der neu Transmembran-Region der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 verbunden ist; einen chimären p185 Gen, das die Ektodomäne des humanen p185c-erbB2 umfasst, die mit der neu Transmembran-Region der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 und einer Val → Glu Mutation bei Aminosäure 664 verbunden ist; einem chimären p185 Gen, das die Ektodomäne des humanen EGFR umfasst, die mit der neu Transmembran-Region der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 verbunden ist; einem chimären p185 Gen, das die Ektodomäne des humanen EGFR umfasst, die mit der neu Transmembran-Region der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 und einer Val → Glu Mutation bei Aminosäure 664 verbunden ist; einem chimären p185 Gen, das die Ektodomäne von humanem erbB3 umfasst, die mit der neu Transmembran-Region der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 verbunden ist; einem chimären p185 Gen, das die Ektodomäne von humanem erbB3 umfasst, die mit der neu Transmembran-Region der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 und einer Val → Glu Mutation bei Aminosäure 664 verbunden ist; einem chimären p185 Gen, das die Ektodomäne des humanen erbB4 umfasst, die mit der neu Transmembran-Region der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 verbunden ist; und einem chimären p185 Gen, das die Ektodomäne des humanen erbB4 umfasst, die mit der neu Transmembran-Region der Ratte mit einem Stopkodon bei Aminosäure 691 und einer Val → Glu Mutation bei Aminosäure 664 verbunden ist.

**[0096]** In einigen Ausführungsformen kodieren die Nukleinsäuremoleküle für Peptide, die mit den Transmembran-Regionen der erbB Proteine interagieren und folglich die Dimerisierung von erbB Proteinen verhindern. Beispiele für solche Nukleinsäuremoleküle werden in Loftis, et al. 1993 Oncogene 8:2813–2820 offenbart.

**[0097]** Gemäß einigen bevorzugten Ausführungsformen wird die Zusammensetzung, die den Wirkstoff umfasst, der für die Zerstörung der Kinase-Aktivität sorgt, die mit der multimeren Rezeptor-Anordnung assoziiert ist, durch irgendeinen Verabreichungsweg verabreicht, der verwendet werden kann, um das Agens an den Tumor zu liefern. In einigen Ausführungsformen wird die Zusammensetzung durch intravenöse, intraarterielle, intramuskuläre, intradermale, subkutane, parenterale oder intratumorale Verabreichung verabreicht. Gemäß einigen bevorzugten Ausführungsformen hat das Individuum eine Operation gehabt, um Tumorkonglomerate vor der Verabreichung der Zusammensetzung zu entfernen.

**[0098]** Gemäß den Aspekten der vorliegenden Erfindung wird das Individuum nach Verabreichung der Zusammensetzung, die einen Wirkstoff umfasst, der die Zerstörung der mit der multimeren Rezeptor-Anordnung assoziierten Kinase-Aktivität zerstört, anschließend einer therapeutischen Menge an Gamma-Bestrahlung ausgesetzt. Die Strahlentherapie kann jederzeit begonnen werden, nachdem eine ausreichende Zeitspanne verstrichen ist, in der der Wirkstoff die mit der multimeren Rezeptor-Anordnung assoziierte Kinase-Aktivität zerstören konnte. Im Allgemeinen wird das Individuum der Bestrahlung in einigen Fällen 1–10 Minuten, in einigen Fällen 1–10 Stunden und in einigen Fällen bis zu 24–72 Stunden nach der Verabreichung des Wirkstoffes ausgesetzt. In einigen Fällen wird die Bestrahlung in einer einzigen Dosis verabreicht, während in anderen Ausführungsformen mehrere Dosen über mehrere Stunden, Tage und/oder Wochen verabreicht werden. Der Wirkstoff macht die Bestrahlungs-resistenten Tumorzellen Bestrahlungssensitiv. Folglich kann die Exposition gegenüber der Bestrahlung erfolgen, sobald der Wirkstoff die Kinase-Aktivität inhibiert. Die Gammabestrahlung wird gemäß den radiotherapeutischen Standard-Protokollen unter Verwendung von Standard-Dosierungen und Standard-Behandlungsschemata verabreicht. Die Verabreichung des Wirkstoffes macht die Bestrahlung bei der Beseitigung der Tumorzellen effektiver.

**[0099]** Gemäß den Aspekten der vorliegenden Erfindung wird dem Individuum nach Verabreichung der Zusammensetzung, die einen Wirkstoff umfasst, der die Zerstörung der mit der multimeren Rezeptor-Anordnung assoziierten Kinase-Aktivität verursacht, anschließend ein zytotoxisches chemotherapeutisches Agens zusätzlich zu oder anstelle der Exposition gegenüber einer therapeutischen Menge an Gamma-Strahlung verabreicht. Wie in dem Falle der Bestrahlungstherapie, kann die Chemotherapie jederzeit begonnen werden, nachdem eine ausreichende Zeitspanne verstrichen ist, in der der Wirkstoff die Zerstörung der Kinase-Aktivität, die mit der multimeren Rezeptor-Anordnung assoziiert ist, bewirken konnte. Im Allgemeinen wird dem Individuum das Chemotherapeutikum in einigen Fällen 1–10 Minuten, in einigen Fällen 1–10 Stunden und in einigen Fällen

bis zu 24–72 Stunden nach der Verabreichung des Kinase-inhibierenden Wirkstoffes verabreicht. In einigen Fällen wird das Chemotherapeutikum in einer Einzeldosis zur Verfügung gestellt, während in anderen Ausführungsformen mehrfache Dosen über mehrere Stunden, Tage und/oder Wochen verabreicht werden. Der Wirkstoff macht die Tumorzellen sensitiver gegenüber zytotoxischen Agenzien. Folglich kann die Verabreichung der Chemotherapeutika erfolgen, sobald der Wirkstoff die Kinase-Aktivität inhibiert. Die Chemotherapeutika werden gemäß radiotherapeutischen Standard-Protokollen unter Verwendung von Standard-Agenzien, -Dosierungen und -Behandlungsschemata verabreicht. In einigen Ausführungsformen wird das Chemotherapeutikum ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: Cisplatin, Doxorubicin, Daunorubicin, Tamoxifen, Taxol und Methotrexat. In einigen Ausführungsformen werden sowohl die Chemotherapie als auch Bestrahlungsbehandlungen im Anschluss an die Verabreichung des Wirkstoffes angewendet. In einigen Ausführungsformen werden Standardkombinationen der beiden therapeutischen Behandlungsformen in Verbindung mit der Verabreichung des Kinaseinhibierenden Wirkstoffes verwendet.

**[0100]** Die vorliegende Erfindung wird weiterhin durch die folgenden Beispiele veranschaulicht.

#### BEISPIELE

Beispiel 1: Konstruktion von Mutanten, Expressions-Vektoren und Erzeugung von Zelllinien

**[0101]** Detaillierte Verfahren für die Konstruktion von mutierten p185-Spezies, Expressionsvektoren und Zelllinien wurden zuvor beschrieben (Qian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 1500; und Weiner et al., Oncogene, 1989, 4, 1175).

##### Konstruktion des mutierten N757

**[0102]** Der ATP-bindende mutierte Nneu K757M (N757) wurde von pSV2TneuK757M (Weiner et al., Oncogene, 1989, 4, 1175) mit Hilfe von Subklonierungsmethoden abgeleitet. Dieses Konstrukt wurde durch ortsspezifische Mutagenese zum Einfügen eines Met anstelle des Lys<sup>757</sup> hergestellt. Der Fachmann auf dem Gebiet würde die Herstellung eines solchen Mutanten durch ortsspezifische Mutageneser einfach verstehen. Kurz beschrieben, wurde ein Xba1-Fragment von pSV2neuT, das einer 1,2 kb Region entspricht, die die vermutliche ATP-Bindungsstelle der publizierten Nukleotidsequenz umfasst, in M13Mp18 kloniert und in den E. coli Stamm CJ236 (dot<sup>-</sup>, ung<sup>-</sup>) pUC13 transfiziert, so dass die HindIII-Stelle des Polylinkers an dem 5' Ende der insertierten Sequenzen lag. Die Mutagenese wurde wie beschrieben unter Verwendung eines Primers, in dem das Kodon AAG, das für Lys kodiert, durch das Kodon AUG ersetzt war, das Met entspricht, durchgeführt (Bargmann et al., Nature, 1986, 319, 226). Die so erzeugten Punktmutationen wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft. Das Plasmid, das die neue Mutation trug, wurde mit Xba1 geschnitten, was das ursprüngliche Fragment freisetzte. Dieses Fragment wurde durch Standard-Methoden, die den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind, isoliert und zurück in pSV2-neu kloniert, um den onkogenen p185neu Expressionsvektor zu regenerieren, wobei der Vektor den Austausch von Met für Lys bei Aminosäureposition 757 enthielt (Klon M757).

##### Konstruktion des mutierten N691stop

**[0103]** Der Mutant N691stop mit der carboxyterminalen Deletion von 591 Aminosäuren wurde von pSV2Nneu (Bargmann et al., Nature, 1986, 319, 226) durch Ersetzen des normalen Kodons Thr<sup>691</sup> durch ein Stopkodon mit Hilfe der ortsspezifischen Mutageneser abgeleitet.

##### Konstruktion von Ndx

**[0104]** Der Mutant Ndx mit der carboxyterminalen Deletion von 541 Aminosäuren wurde von der c-neu cDNA durch Deletion eines Xba1-Fragments und Insertion eines Stopkodons anstelle des normalen Kodons bei Position 741 mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese abgeleitet.

##### Konstruktion von Expressions-Vektoren

**[0105]** Für Expressions-Vektoren wurden Fragmente, welche die cDNA der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) der Maus enthalten, aus pSV2DHFR und Fragmente, welche das bakterielle Neomycin-Phosphotransferase-Resistenzgen (neo<sup>r</sup>) enthalten, aus pSV2NEO (Southem et al., J. Mol. Appl. Genet., 1982, 1, 327) in pSV2Nneu subkloniert, so dass ein aus einem 14,8 kb DHFR, neo<sup>r</sup> und Nneu cDNA kombinierter Vektor erzeugt wurde. Die wt oder mutierten neu Fragmente wurden isoliert und zurück in einen pSV2neo<sup>r</sup>/dhfr/Nneu Expressionsvektor ligiert. Sämtliche dieser cDNAs standen unter der Kontrolle eines Simianvirus 40 (SV40)

frühen Promotors. Eine Gen-Einheit, welche für das bakterielle Hygromycin-Resistenzgen (Hyg<sup>r</sup>) unter der Kontrolle des Herpes Simplex Virus Thymidinkinase-Promotors kodiert, wurde aus pHyg isoliert und anstelle eines neo<sup>r</sup>-Genfragments in pEGFR1 kloniert (Gorman et al., J. Cell. Biochem., 1988, 12A, Suppl. C219), um einen weiteren kombinierten Expressionsvektor, pEGFR/Hyg<sup>r</sup>, zu erzeugen. Die humane EGFR cDNA stand unter der Kontrolle des SRa-Promotors, einem effizienten Transkriptions-Kontroll-Elements, das den SV40 frühen Promotor und das R-U5 Segment der langen terminalen Wiederholung des humanen T-Zell Leukämie-Virus-Typ 1 enthält (Takebe et al., Mol. Cell. Biol., 1988, 8, 466).

#### Transfektion und Kultivieren der Zelllinien

**[0106]** Das Konstrukt pEGFR/Hyg<sup>r</sup> wurde zunächst mit Hilfe der Kalziumphosphat-Präzipitation in NR6 Zellen transfiziert (Pruss et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 3918, das hiermit durch Referenz eingeschlossen ist). Nach 3-wöchiger Hygromycin-Selektion (35 µg/ml) wurde die EGFR-Expression der resultierenden Kolonien mit Hilfe eines anti-EGFR Immunblottings identifiziert. Zellen, die EGFR exprimierten, wurden weiterhin mit Hilfe der limitierenden Verdünnung vor der zweiten Transfektionsrunde mit neu cDNA-Expressionsvektoren kloniert. Die EGFR-exprimierenden Zellen, NE91 genannt, wurden zusammen mit NR6-Zellen mit pSV2neo<sup>r</sup>/dhfr/neu transfiziert, der für wt oder mutierte neu Proteine kodiert, und mit G418 selektiert. Die Neu-exprimierenden Klone in NR6 Zellen und NE91 Zellen wurden mit Hilfe eines durchflusszytometrischen Assays durch Färbung mit einem anti-neu monoklonalen Antikörper 7.16.4 (Drebin et al., Cell, 1985, 41, 695) gescreent und wurden NR6 Neu bzw. NE Neu genannt. Diese DHFR-enthaltenden, einfach transfizierten Klone (die nur Neu exprimieren) oder doppelt transfizierten Klone (die Neu und EGFR exprimieren) wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), enthaltend 5% fötales Rinderserum, G418 (0,3 mg/ml) und Hygromycin (15 µg/ml) aufbewahrt. Die Neu Amplifikation wurde durch schrittweise erhöhte Dosen (0,3–1,0 µM) des Methotrexat für wenige Monate erreicht, um den Level der Rezeptor-Expression zu erhöhen.

#### Durchflusszytometrie

**[0107]** Die Zellen wurden mit gepuffertem EDTA (Versene, M.A. Bioproducts) von den Gewebskulturschalen entfernt und zweimal in FACS-Medium (Hanks balancierte Salzlösung (Gibco), angereichert mit 2% fötalem Kälberserum, 0,2% Natnumazid und 10 mM HE-PES) gewaschen.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in 0,1 ml FACS Medium mit 7.16.4 anti-neu monoklonalem Antikörper (Drebin et al., Cell, 1985, 41, 695) oder einem irrelevanten Kontroll-Antikörper gleichen Isotyps 1 Stunde lang bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit 2,5 ml FACS Medium gewaschen. Das Zellpellet wurde resuspendiert, und die Zellen wurden mit 0,1 ml FITC-konjugiertem Ziege Kaninchen anti-Maus IgG (reagiert mit den schweren und leichten Ketten des Antikörpers, Tago), der 1:50 in FACS Medium verdünnt wurde, 1 Stunde lang bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal gewaschen und in einem FACS IV Becton Dickenson analysiert.

#### Beispiel 2: Tyrosinkinase-Aktivität

#### Membran-Reinigung

**[0108]** Die Zellen wurden mit Hilfe einer Kombination des Schockgefrierens und Wiederauftauens und der Dounce-Homogenisierung, wie in Gaulton et al., J. Immunol., 1986, 7, 2470 beschrieben lysiert. Die nukleäre Fraktion wurde durch Zentrifugation bei  $2000 \times g$  für 5 Minuten entfernt. Die  $2000 \times g$  Überstandsfraktion wurde anschließend erneut bei  $25000 \times g$  für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert, und der  $25000 \times g$  Überstand wurde als zytosolische Fraktion behalten. Das Pellet wurde erneut in 1,5 ml Membranpuffer (40 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 20 mM HEPES (pH 6,8), 2 mM PMSF und 5 mM Na Pyrophosphat) gelöst, anschließend mit einer (20%–37%) Sukrose-Lösung in Membranpuffer überschichtet und bei 22000 rpm für 18 Stunden bei 2°C unter Verwendung eines Beckman SW50.1 Rotors zentrifugiert. Die membranreiche Zwischenphase wurde in 1 ml Gesamtvolume entfernt, mit 10 ml Membranpuffer verdünnt und wurde bei 40000 rpm 60 Minuten lang unter Verwendung eines SW40.1 Rotors genau wie in Zick et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984, 119, 6 beschrieben zentrifugiert. Das resultierende Pellet, das die gereinigten Membranfragmente enthielt, wurde in 100 µl Kinase-Puffer (siehe unten) pro  $10^7$  ursprünglicher Zellen gelöst. Die Membranproteine wurden unter Verwendung eines BioRad Protein Assay Kits quantifiziert und bis zur Verwendung im Assay bei –80°C gelagert.

#### Tyrosinkinase-Aktivität in Membranen

**[0109]** Die Membrankonzentrationen wurden durch das Verfahren von Bradford wie in Gaulton et al., J. Immunol., 1986, 7, 2470 beschrieben bestimmt. Verdünnungen der Membranen wurden in vierfacher Ausferti-

gung in der Gegenwart oder Abwesenheit eines synthetischen Polypeptids, das Tyrosin als spezifischen Indikator für die Tyrosin-Phosphorylierung enthielt, inkubiert. Der Kinase-Reaktionspuffer (50  $\mu$ l 0,1 M Hepes pH 7,3, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) wurden in Gegenwart von ATP (1  $\mu$ Ci Gamma [<sup>32</sup>P]ATP; Amersham) 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 mM EDTA (Endkonzentration) gestoppt, sofort gefolgt von einer TCA Immunpräzipitation auf Glasfaserfiltern (Whatman GF/A). Die Filter wurden ausgiebig mit TCA gewaschen, gefolgt von einem Ether, luftgetrocknet, in einen Scintillations-Cocktail (Biofluor) getaucht und die Beta-Emissionen wurden gemessen. Vertiefungen in vierfacher Ausführung, die in Gegenwart von Tyrosin-enthaltendem Substrat analysiert wurden, wurden von den Tyrosinsubstrat-enthaltenden Vertiefungen abgezogen.

**[0110]** Die Membranproteine wurden mit dem Zufalls-Polymer aus Glutaminsäure-Tyrosin (4:1) (poly glu:tyr, PGT) als Substrat für die Tyrosin-Phosphorylierung inkubiert wie in Zick et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1984, 119, 6 beschrieben. Kurz beschrieben wurden die Membranproteine in 50 ml 10 mM HEPES pH 7,2, enthaltend 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> und 150  $\mu$ M (10  $\mu$ Ci) [<sup>32</sup>P]ATP, 15 Minuten lang bei Raumtemperatur in Gegenwart (spezifisch) oder Abwesenheit (Hintergrund) von Poly glu:tyr Substrat mit einer Konzentration von 2,5 mg/ml inkubiert. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von EDTA mit einer Endkonzentration von 50 mM und einem nicht-radioaktiven Überschuss an ATP gestoppt, und die Proben wurden auf Whatman Glasfiber-Filterpapier gespottet. Die Filter wurden dreimal mit eiskaltem 10% TCA, enthaltend 10 mM Pyrophosphat und 1 mM ATP, gewaschen, gefolgt von einmaligem Waschen mit Acetat. Die Proben wurden anschließend getrocknet und in BioFlur (NEN) gezählt. Für die Immunpräzipitation von Phosphotyrosin-enthaltenden Membranproteinen wurden 50  $\mu$ g der gereinigten Membranen in Kinase-Puffer wie oben beschrieben 15 Minuten lang inkubiert. Nach der Markierung wurden die Proben in Lyse-Puffer, angereichert mit 5 mM EDTA, löslich gemacht, vorgeklärt und mit 2  $\mu$ l Ascites von MA-2G8A6 + Protein A Agarose immunpräzipitiert. Der MA-2G8 Antikörper präzipitiert spezifisch phosphotyrosin-markierte Polypeptide, wie in Daniel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 2084, beschrieben.

#### Beispiel 3: Dimerisierung mit p185 oder EGFR

**[0111]** EGFR und p185 Heterodimere wurden mit Hilfe einer Immunpräzipitation und eines Immunblottings mit einem anti-Rezeptor-spezifischen Antikörper nach der Behandlung mit EGF und einem chemischen Quervernetzungsreagenz. Die physikalische Verbindung von EGFR und Kinase-defizienten p185 Proteinen wurde auf diese Weise untersucht.

#### Assay zur chemischen Quervernetzung

**[0112]** Die Zellen wurden über Nacht in 10 cm Petrischalen kultiviert, mit oder ohne EGF (GIB-CO/BRL) bei 37°C für 10–15 Minuten inkubiert und zweimal mit kalter Phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) gewaschen. Drei ml PBS, enthaltend 2 mM Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS<sup>3</sup>) oder 3,3'-Dithiobis(sulfosuccinimidylpropionat) (DTSSP) (Pierce), wurden dazugegeben und bei 18°C für 30 Minuten inkubiert, wobei die Platten gelegentlich bewegt wurden. Nach dem Quench der Quervernetzungsreaktionsmischung mit Puffer enthaltend 10 mM Tris-HCl, 0,9% NaCl und 0,1 M Glycin, wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit PI/RIPA-Puffer (Wada et al., Cell, 1990, 61, 1339) löslich gemacht.

#### Markierung und Immunpräzipitation

**[0113]** Sämtliche Reagenzien wurden von Sigma erhalten, es sei denn, etwas anderes ist angegeben. Für die Markierung mit [<sup>32</sup>P] wurden  $1 \times 10^6$  Zellen ausplattiert und 24 Stunden kultiviert und anschließend mit anorganischem [<sup>32</sup>P] (Amersham) mit 0,5 mCi/ml in 5% FCS/Phosphat-freiem RPMI 6 Stunden lang inkubiert. Nach der Markierung wurden die Zellen mit kalter Phosphat-gepufferter Salzlösung, enthaltend 100  $\mu$ M EDTA, 10 mM Natriumfluorid, 10 mM Natriumpyrophosphat und 400  $\mu$ M Natriumorthovanadat gewaschen und in Lyse-Puffer (1% NP40, 0,1% Deoxycholat, 0,1% SDS, 0,15 M NaCl, 0,01 M Natriumphosphat pH 7,4, 1% Trasylol, 1 mM PMSF, 2 mM EDTA, 10 mM Natriumfluorid, 10 mM Natriumpyrophosphat, 400  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM Iodacetamid und 1 mM ATP) 30 Minuten lang lysiert. Die vorgeklärten Überstände wurden einer Immunpräzipitation mit dem monoklonalen Antikörper 7.16.4 oder mit Kaninchen-Antiseren DBW-2 unterzogen, welche die neu Proteine des Menschen und der Ratte erkennen (Kokai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 84 8498). Die Immunpräzipitate wurden in Laemmli Proben-Puffer gekocht und in einem 8% SDS-PAGE analysiert (Laemmli, Nature, 1970, 227, 680). Die getrockneten Gele wurden bei -70°C auf einen durch kurze Lichtexposition vorbehandelten Film exponiert. Die Densitometeruntersuchungen der Gele wurden auf einem Hoefer GS300 Scanning Densitometer durchgeführt. Die relativen Schwärzungen wurden durch Ausschneiden der relevanten gescannten Peaks in parallelen Experimenten und deren Wiegen auf einer analytischen Waage bestimmt. Die

Aufnahme des proto-onkogenen und des onkogenen p185neu wurde anschließend direkt miteinander verglichen.

#### Fokusbildungs- und Tumorigenitäts-Assays

**[0114]** Zellen ( $10^4$ ) wurden in Petrischalen ausplattiert und in DMEM, enthaltend 2% FBS, kultiviert. Das Medium wurde alle 3–4 Tage ausgewechselt. Nach 3 wöchiger Kultivierung wurden die Zellen mit 10% Formalin fixiert und mit Hämatoxylin gefärbt, um morphologisch transformierte Foci zu beobachten. Um das Tumorwachstum in athymischen Nacktmäusen zu analysieren, wurden Zellen ( $10^6$ ) jeder Linie in 0,1 ml PBS suspendiert und intradermal in das mediale Dorsum von NCR Nacktmäusen injiziert. PBS allein wurde außerdem als Kontrolle injiziert. Das Tumorwachstum wurde alle 4–5 Tage bis zu 10–12 Wochen lang beobachtet.

#### ERGEBNISSE

**[0115]** NE91 ist eine transzidierte Zelllinie, die EGFR in NR6 Zellen exprimiert (Pruss et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 3918), einer Maus Fibroblasten-Zelllinie, der endogenes EGFR fehlt. Wildtyp (WT) zelluläres p185 (Nneu) oder Kinase-defizientes Neu (d.h. N757 und N691stop, die eine Punktmutation K757M an der ATP-Bindungsstelle bzw. eine Deletion der zytoplasmatischen Domäne enthalten), wurden sowohl in NR6 als auch in NE91 Zellen exprimiert. Die resultierenden transzidierten Klone wurden NR6 Neu bzw. NE Neu genannt.

Kinase-defiziente mutierte neu Proteine unterdrückten die Wirkung des EGFR bei der zellulären Transformation und zerstörten die transformierende Synergie mit EGFR

**[0116]** Wir haben zuvor gezeigt, dass die Koexpression von erhöhten Mengen an EGFR und zellulärem p185, nicht jedoch die jedes einzelnen, murine Fibroblastenzellen vollständig transformierten, wie mit der M1 Zelllinie gezeigt (Kokai et al., Cell, 1989, 58, 287). In der vorliegenden Studie wurden die transformierten Phänotypen dieser transzidierten Zellen, die Wildtyp oder Kinase-defiziente Neu Proteine in Gegenwart oder Abwesenheit von EGF exprimieren, analysiert.

**[0117]** NE91 Zellen, die EGFR allein exprimieren, bildeten einen Monolayer in der Abwesenheit von EGF und Foci in Gegenwart von EGF. Die beobachtete unvollständige Transformation (d.h. in einer EGF-abhängigen Weise), tritt in Übereinstimmung mit früheren Berichten auf (DiFiore et al., Cell, 1987, 51, 1063; Dobashi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88, 8582). Jedoch führte die Koexpression von WT zellulärem p185 und EGFR in NE NneuB2 Zellen in ähnlicher Weise wie bei M1 Zellen zu einer vollständigen Transformation, d.h. die Fokusbildung war EGF-unabhängig. Zelllinien, die EGFR zusammen mit einer Form des Kinase-defizienten neu (NE N757 und NE N691stop Zellen) koexprimierten, bildeten keine Foci, noch nicht einmal in Gegenwart von EGF. Ähnliche Resultate wurden beobachtet, wenn das Adhäsions-unabhängige Kolonie-Wachstum in Weich-Agar untersucht wurde.

**[0118]** Das Tumorwachstum in Nacktmäusen wurde als Kriterium für die vollständige Transformation *in vivo* verwendet. B104-1-1 Zellen, die onkogenes p185 exprimieren, wurden als positive Kontrolle verwendet, und von diesen Zellen verursachte Tumoren traten schnell auf (mit einer Latenzzeit von 5 Tagen). Zelllinien, die gleiche Mengen an EGFR (NE91) oder zellulärem p185 (NR6 Nneu) allein exprimierten, entwickelte keine Tumoren. Jedoch verursachte die Injektion der Zellen, die sowohl EGFR als auch zelluläres p185 koexprimieren (M1 und NE NneuB2) Tumoren (2–3 Wochen Latenzzeit). Die Ergebnisse waren konsistent mit einem früheren Bericht (Kokai et al., Cell, 1989, 58, 287).

**[0119]** Jedoch wurden nach der Injektion von Zelllinien, die Kinase-defizientes Neu allein exprimieren oder mit EGFR koexprimieren, keine Tumoren beobachtet (>10 Wochen). Diese Daten legen nahe, dass die normale zelluläre p185 Kinase-Aktivität und EGFR Funktion für die synergistische Transformation und die Tumorbildung nötig war. Die Koexpression von Kinase-defizienten Neu-Proteinen mit EGFR zerstörte nicht nur diese Art von Synergie, sondern unterdrückte außerdem das EGF-abhängige Transformationspotential von EGFR. Daher wurde die EGF-Rezeptor-Funktion, die durch Liganden-Stimulation vermittelt wurde, in den folgenden Studien weiter analysiert.

Die EGF-induzierte Rezeptor-Herabregulierung war weniger effizient in neu Kinasedefizienten mutierten Zellen

**[0120]** Wir untersuchten als nächstes, ob die normale Rezeptor-Herabregulierung durch die Koexpression mit Kinase-defizientem Neu beeinträchtigt war. Die Zellen wurden unterschiedlich lange mit EGF inkubiert, bevor

die Zelloberfläche mit anti-neu mAb 7.16.4 oder anti-EGFR mAb 425 gefärbt wurde, gefolgt von einer Färbung mit FITC-konjugiertem anti-Maus IgG. Die Zelloberflächen-Expression des jeweiligen Rezeptors wurde unter Verwendung einer durchflusszytometrischen Analyse analysiert. Die Zelloberflächen-Expression von EGFR in NE91 Zellen war nach 15-minütiger Behandlung mit EGF reduziert, und mehr als 60% der Rezeptoren verschwanden nach 1-stündiger Behandlung von der Zelloberfläche. Die Effizienz der EGFR-Herabregulierung in M1 Zellen (die WT Neu und EGFR ko-exprimieren) war ähnlich der in NE91 Zellen beobachteten. Etwa 20% des zellulären p185 wurden zusammen mit EGFR in M1 Zellen ko-herabreguliert. Ähnliche Ergebnisse wurden in NE Nneu B2 Zellen beobachtet. Zelllinien, die nur zelluläres p185 exprimieren, antworteten jedoch nicht auf EGF. In Zelllinien, in denen EGFR zusammen mit Kinase-Defizienten mutierten Neu-Proteinen ko-exprimiert wurden, war die Herabregulierung von EGFR weniger effizient (die maximale Verringerung betrug etwa 20–25%). Darüber hinaus war die Oberflächenexpression des jeweiligen mutierten Neu-Proteins bei Behandlung mit EGF in diesen Zellen nicht signifikant verändert.

Erhöhte Rezeptor-Halbwertszeiten, beobachtet in Kinase-defizienten mutierten neu koexprimierenden Zellen

**[0121]** Um festzustellen, ob die Rezeptoren, die auf der Zelloberfläche herabreguliert wurden, einer Degradation ausgesetzt waren, wurde eine Pulse-Chase-Markierung der Rezeptorproteine wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt, und immunpräzipitierte Neu- und EGFR-Proteine wurden mit Hilfe von SDS-PAGE analysiert. Eine Behandlung mit EGF verursachte eine rasche Degradation von EGFR in NE91 Zellen (die EGFR allein exprimieren). Eine ähnliche EGFR-Degradationsrate wurde in M1 Zellen bei Behandlung mit EGF beobachtet. Jedoch wurde die durch EGF induzierte EGFR-Degradation in solchen Zellen verlangsamt, die EGFR zusammen mit einer Form der Neu Kinase-defizienten Mutante exprimieren (NE N757 oder NE N691stop).

**[0122]** Die Degradationsmuster von WT oder mutierten Neu Proteinen in Antwort auf die Behandlung mit EGF wurden ebenfalls untersucht. Das markierte WT zelluläre p185 verschwand sowohl in M1 Zellen als auch in NE NneuB2 Zellen proportional zu der Behandlungszeit mit EGF, was andeutet, dass WT zelluläres p185 effizient mit EGFR kodegradiert wird. Nach der Behandlung mit EGF für bis zu 6 Stunden gab es nur eine geringe Verringerung der N757 Proteinmengen und keine erkennbare Veränderung in dem reichlichen Vorhandensein des trunkierten N691stop Proteins. Die vorgeschlagene normale Halbwertszeit des humanen c-erbB2 in Epithelzellen des Säugers beträgt 11–13 Stunden (Kornilova et al., Oncogene, 1992, 7, 511). Densitometrische Analysen unserer Autoradiogramme bestätigten, dass die Halbwertszeit von WT zellulärem p185 nach der Behandlung mit EGF auf 3–4 Stunden reduziert wurde, während sich die Mengen des mutierten Neu über die untersuchte Zeit nicht wesentlich veränderten.

EGF-Bindungsaffinität in wt oder mutierten neu Protein exprimierenden Zellen

**[0123]** Unsere Experimente haben gezeigt, dass Kinase-defiziente Neu Mutanten EGFR-Funktionen unterdrücken, wie z.B. die Kinase-Aktivität (Qian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 1500), die EGF-vermittelte Transformation, die Rezeptor-Herabregulierung und die Degradation. Da diese Effekte zum Teil mit Hilfe veränderter EGF-Bindungsaffinitäten interpretiert werden könnten, haben wir die [<sup>125</sup>I]-EGF-Bindungsparameter mit Hilfe der Scatchard-Analyse untersucht.

**[0124]** Die durchschnittlichen Dissoziationskonstanten (Kd) der [<sup>125</sup>I]-EGF-Bindung an diese Zelllinien wurde in drei individuellen Experimenten bestimmt. EGFR zeigte in NE91 Zellen zwei Bindungskomponenten, die hohe ( $7,5 \times 10^{-11}$  M) und geringe ( $4,4 \times 10^{-9}$  M) Bindungsaffinität aufwiesen, und die Fraktion der Rezeptoren mit hoher Affinität betrug 5,4% der Gesamt-Rezeptoren. Die Koexpression von EGFR mit WT Neu in NE NneuB2 Zellen führte zu einer geringen Zunahme der EGF-Bindungsaffinitäten ( $3,2 \times 10^{-11}$  M) und ( $2,0 \times 10^{-9}$  M) sowohl für die Unterklassen mit hoher Affinität bzw. die mit geringer Affinität, und die Fraktion der Rezeptoren mit hoher Affinität betrug 5,7%. Die erhöhten Affinitäten in M1 Zellen waren reproduzierbar, und die Kd-Werte ( $1,3 \times 10^{-11}$  M und  $1,8 \times 10^{-9}$  M) stimmten mit unseren früheren Berichten überein, Kokai et al., Cell, 1989, 58, 287; und Wada et al., Cell, 1990, 61, 1339. Jedoch zeigte der EGFR in Kinasedefizienten Neu ko-exprimierenden Zellen überwiegend EGF-Bindung mit niedriger Affinität,  $4,9 \times 10^{-9}$  M und  $5,2 \times 10^{-9}$  M in NE N691 bzw. NE N757 Zellen, obwohl manchmal eine seltene Unterklasse von EGFR mit hoher Affinität detektierbar war, d.h.  $7,2 \times 10^{-11}$  M (0,5%) in NE N691stop Zellen und  $6,6 \times 10^{-11}$  M ( $\leq 1\%$ ) in NE N757 Zellen. Diese seltenen Spezies könnten eine Reihe von EGFR Homodimeren repräsentieren, die auch noch beobachtet werden, wenn sie mit Kinase-inaktiven Neu-Proteinen koexprimiert werden (Qian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 1500). Aus der Scatchard Analyse wird klar, dass EGFR Zellen, die Kinase-aktives WT Neu koexprimieren, den normalen prozentualen Anteil an hochaffinen EGF-Rezeptoren zeigten, wobei die Affinität für EGF im Vergleich zu NE91 Zellen leicht erhöht ist. Jedoch reduziert die Koexpression von Kinase-defizienten Neu

Proteinen die EGF-Bindungs-Affinitäten in Korrelation mit den reduzierten heterodimeren Kinase-Aktivitäten deutlich.

## DISKUSSION

**[0125]** In den vorliegenden Studien wurden die Rezeptor-Funktionen und Zellphänotypen unter Verwendung von stabil transfizierten Zelllinien, die EGFR zusammen mit WT oder mutierten Neu Proteinen koexprimieren, analysiert. Im Gegensatz zu WT Neu kooperiert Kinase-defizientes Neu nicht mit EGFR, um die Zelltransformation zu vermitteln; darüber hinaus haben wir neue Aspekte der dominant-negativen Rezeptor-Funktionen gezeigt, die aus der Interaktion von mutiertem Neu mit EGFR resultieren.

**[0126]** Die intermolekulare Assoziation und resultierende Tyrosinkinase-Aktivierung zwischen EGFR und WT (Qian et Al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 1330) oder mutierten Neu Proteinen (Qian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 1500) wurde gut charakterisiert. Unsere Studien zeigten, dass die Heterodimerisierung von EGFR und c-neu Produkten sogar in der Abwesenheit von EGF nachgewiesen werden kann und gegenüber einer Form der Homodimerisierung bevorzugt wird. Jedoch waren die Homodimerisierung und Ko-Dimerisierung von WT EGFR und EGFR mit deletierter zytoplasmatischer Domäne gleichermaßen effizient und EGF-abhängig (Kashles et al., Mol. Cell Biol., 1991, 11, 1454). Das Vorherrschen von Heterodimeren könnte helfen, die resultierenden Zellphänotypen und den induzierbaren dominant-negativen Effekt des Kinase-defizienten Neu auf die Suppression der EGFR-Funktion zu erklären, der in signifikanter Weise auftrat, sogar wenn das Verhältnis von EGFR und mutierten Neu-Proteinen 1:1 betrug.

**[0127]** Die Rezeptor-Interaktion mit der resultierenden Aktivierung der Tyrosinkinase tritt durch einen intermolekularen Mechanismus auf, und ist häufig gefolgt von schnellen Transphosphorylierungs-Ereignissen, wie bei pp60<sup>c-Src</sup> (Cooper et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 4232), dem Insulin-Rezeptor (Boni-Schnetzler et al., J. Biol. Chem., 1988, 263, 6822) und EGFR (Honegger et al., Mol. Cell. Biol., 1990, 10, 4035) beobachtet wurde.

**[0128]** Eine Transphosphorylierung trat auch zwischen Heterorezeptor-Spezies, EGFR und Neu/c-erbB2 auf (Connelly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 6054; Spivak-Kroizman et al., J. Biol. Chem., 1992, 267, 8056 und Qian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 1500). Die bevorzugte Heterodimerisierung von EGFR und dem Neu-Rezeptor (Qian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 1500) könnte die Transphosphorylierung von N757 durch EGFR erleichtern. Zur Zeit sind die spezifischen Substrate für EGFR und die Neu Kinase noch nicht gut charakterisiert. In vitro Bindungs-Assays zeigten, dass der phosphorylierte Kinase-defiziente N757 noch fähig war, bei Behandlung mit EGF mit rekombinantem SH2-enthaltendem Protein zu assoziieren. Jedoch kann im Gegensatz zu aktiven Heterodimeren in M1 und NE NneuB2 Zellen der Verlust der Neu-Kinase-Aktivität des mutierten Heterodimers der NE N757 Zellen die Phosphorylierung von bestimmten zellulären Substraten verhindern. Darüber hinaus kann die vorherrschende Transphosphorylierung von N757 durch EGFR und die Besetzung zellulärer Substrate in nicht-funktionellen N757 mit EGFR um zelluläre Signalmoleküle kompetitieren, was zu einer qualitativen und quantitativen Verringerung der EGFR-Funktion führt.

**[0129]** Daher kann das defekte Heterodimer Signale nicht so effektiv wie das Kinase-aktive Heterodimer und das EGFR Homodimer übermitteln, was zu einer Beeinträchtigung der synergistischen Signalgebung führt, die zur Zelltransformation führt, die in M1 und NE NneuB2 Zellen beobachtet wird, sowie zur Inhibierung der EGFR-Funktion. Studien zur Heterodimerisierung von EGFR mit dem N691stop, in dem die zytoplasmatische Domäne deletiert ist, zeigten, dass die heterodimere Form aufgrund der fehlenden Protein-Protein-Interaktion zwischen den zytoplasmatischen Domänen inaktiv war, was zeigt, dass Neu/c-erbB2 nicht einfach ein Substrat für EGFR ist, sondern außerdem ein Transaktivator für EGFR (Qian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 1500). Folglich führten die verringerten Mengen der normalen EGFR homodimeren Form und das Vorherrschen unproduktiver Heterodimere zur Unterdrückung der normalen EGFR-Funktion und zu dem resultierenden dominant-negativen Phänotyp. Die Beobachtung ist vergleichbar mit den Wirkungen von Dimeren, die zwischen WT EGFR und EGFR mit deletierter zytoplasmatischer Domäne gebildet wurden (Kashles et al., Mol. Cell. Biol., 1991, 11, 1454).

**[0130]** Von Kinase-aktiven Rezeptoren wurde berichtet, dass sie nach der Ligandenbindung Lysosomen zur Degradation zugeführt werden (Chen et al., Cell, 1989, 59, 33; Felder et al., Cell, 1990, 61, 623). Frühere Studien, die Kinase-defiziente Insulin-Rezeptoren (Mc-Clain et al., J. Biol. Chem., 1987, 262, 14663 und Russell et al., J. Biol. Chem., 1987, 262, 11833) und EGFR (Honegger et al., Cell, 1987, 51, 199) verwenden, legten nahe, dass aktive Kinase-Domänen wesentlich für das normale Liganden-induzierte Rezeptorrouting sind. Wir verwendeten EGF-behandelte Zelllinien, um zu untersuchen, wie die Aktivitäten der Rezeptor-Kinase-Komplexe

xe mit der Rezeptor-Endozytose und -Zerstörung korrelieren. Unsere Arbeit zeigt, dass EGFR in WT Neu ko-exprimierenden Zellen (M1 oder NE NeuB2) bei Stimulierung mit EGF einer raschen Herabregulierung und Degradation unterzogen wird. Dieser Prozess war in mutierten Zellen im Vergleich zu den NE91 Zellen, die EGFR allein exprimieren, signifikant verzögert. Nur das WT zelluläre p185, nicht jedoch das Kinase-defiziente mutierte Neu Protein, wurde mit EGFR ko-herabreguliert und ko-degradiert. In ähnlicher Weise beeinträchtigte die Behandlung von HC11-Zellen der humanen Säuger-Zelllinie mit EGF die Oberflächenexpression und den Proteinsatz des c-erbB2 Proteins: es gab einen 3–4 fachen Anstieg des lysosomalen c-erbB2 Proteins, und die Halbwertszeit der c-erbB2 Proteine wurde von 11 Stunden (unbehandelt) auf 3,5 Stunden (mit EGF behandelt) verringert (Kornilova et al., Oncogene, 1992, 17, 511). Zusammen mit unseren Beobachtungen legten diese Ergebnisse nahe, dass WT Neu/c-erbB2 (nicht jedoch Kinase-defizientes Neu) mit EGFR und einem aktiven Rezeptor-Tyrosinkinase-Komplex assoziiert und ein normales Rezeptorrouting durchläuft.

**[0131]** Zusammenfassend stellen unsere Ergebnisse einen experimentellen Beweis bereit, dass die defekten oder inaktiven Heterodimere von EGFR und Kinase-defizienten Neu Proteine die synergistische Heterorezeptor-Signalgebung beeinträchtigen, die Funktion von normalem EGFR unterdrücken und den transformierten Phänotyp in lebenden Zellen zerstören. Unser experimentelles Modell legt einen kausalen Zusammenhang zwischen heterodimeren Kinase-Aktivitäten und der Zell-Malignität nahe, was klinische Auswirkungen haben kann. Ein kürzlicher Bericht hat gezeigt, dass eine trunkierte Ektodomäne des c-erbB2 Proteins, das durch alternative RNA-Prozessierung in humanen Karzinomzellen, die p185<sup>c-erbB2</sup> Rezeptor überexprimieren, produziert wird, zu einer Resistenz gegenüber Wachstums-inhibierenden Wirkungen des anti-c-erbB2 monoklonalen Antikörpers führt (Scott et al., Mol. Cell. Biol., 1993, 13, 2247). Es wird spekuliert, dass der direkte Gentransfer der Kinase-defizienten Neu cDNA in Tumorzelllinien zusammen mit der Ko-Expression von EGFR und Neu/c-erbB2 den malignen Phänotyp aufheben könnte, da die mutierten Neu Proteine entweder die Funktion des normalen EGFR oder der c-erbB2 Rezeptoren durch Homo- oder Heterorezeptor-Interaktionen unterdrücken könnte.

#### BEISPIEL 4: INHIBITION EINES NATÜRLICH VORKOMMENDEN EGFR ONKOPROTEINS DURCH DIE P185NEU EKTODOMÄNE: AUSWIRKUNGEN AUF DIE BEITRÄGE DER SUBDOMÄNE ZUR REZEPTOR-ANORDNUNG

##### Einführung

**[0132]** Die Rezeptor-Aktivierung der erbB Familie umfasst sowohl die Bildung von Homodimer als auch die Bildung von Heterodimer-Anordnung. In vielen Fällen erhöht die Bildung von Heterodimeren zwischen erbB Familienmitgliedern die Liganden-Bindungsaaffinität und führt zu der Bildung eines aktiveren Signalgebungs-komplexes, der den Zellphänotyp beeinflusst. Unter Verwendung von p185neu und EGF-Rezeptormutanten wurde gezeigt, dass die Ektodomäne dieser erbB Rezeptoren allein ausreicht, um eine thermodynamisch bevorzugte heterodimere physische Assoziation zu ermöglichen und dass die zytoplasmatischen Kontakte in dem resultierenden Dimer die Liganden-Affinität, die Signalgebung und den Phänotyp beeinträchtigt. Die bio-chemische Analyse von p185neu und EGFR legt nahe, dass sich die Konsequenzen der Dimerbildung zwischen extrazellulären Domänen allein von der Signalgebung unterscheidet, die aus der Bildung eines Dimers aus Endodomänen resultiert. Von der p185neu Ektodomäne abgeleitete Mutanten sind zur spezifischen Trans-Inhibition der EGF-Rezeptor-Signalgebung sowohl in murinen Fibroblasten als auch in primär transformierten EGFR-überexprimierenden humanen Zellen in der Lage. Der aktive Rezeptorkomplex für den Neu Differenzierungsfaktor (Neu Differentiation Factor, NDF/hergulin) scheint entweder ein erbB2-erbB3 oder ein erbB2-erbB4 Heterodimer zu sein, was nahe legt, dass p185neu/erbB2 zum Teil als Transregulator für andere Rezeptor-Kinasen der erbB Familie fungiert.

**[0133]** Um die Rezeptor-Domänen weiter zu untersuchen, die für die transregulatorischen Interaktionen verantwortlich sind, die durch die extrazelluläre Domäne in der erbB Familie vermittelt werden, wurde die Interaktion zwischen EGFR und p185neu/c-erbB2 in transformierten Zellen analysiert. Ein häufig in humanen glialen Neoplasien und anderen humanen epithelialen Malignomen beobachtetes EGFR Onkoprotein ( $\Delta$ EGFR oder EGFRVIII) resultiert aus einer Trunkierung im Leserahmen, welche die Exons 2 bis 7 (Aminosäuren 6 bis 273) in dem Gen, das für die extrazelluläre Region des Moleküls kodiert, umfasst, was zur Expression trunkierter, konstitutiv phosphorylierter  $\Delta$ EGFRs mit 140–155 kDa führt. Es wurde beobachtet, dass  $\Delta$ EGFR Rezeptoren spontan in einer dimeren Form existieren und die konstitutive Signalgebung und onkogene Transformation von Nager-Fibroblasten in einer Liganden-unabhängigen Weise vermitteln, während überexprimierte p170 holo-EGFRs in der Gegenwart von EGF nur schwach transformierend sind.  $\Delta$ EGFR Onkoproteine verleihen in vivo in humanen Glioblastomzellen und in murinen Fibroblasten einen dramatischen Wachstumsvorteil.

**[0134]** Kürzliche Berichte deuten daraufhin, dass  $\Delta$ EGF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche vorhanden sind und langsamer als Liganden-stimulierte holo-EGFRs internalisiert werden, was die Transformierungseffizienz der  $\Delta$ EGFR Onkoproteine erhöhen könnte. Von anderen Mutationen, welche die extrazelluläre Domäne von der Transmembran- und zytoplasmatischen Region von RTK-Polypeptiden funktionell trennen, wurde ebenfalls beobachtet, dass sie zu einer spontanen Dimerisierung und zum Erwerb eines transformierenden Potentials führen, was nahe legt, dass ein Teil der extrazellulären Domäne eine strukturelle Einschränkung für die Dimerbildung bedeutet, welche vermutlich durch Ligandenbindung oder Massenwirkung beseitigt wird. Extrazelluläre Deletionen, die in  $\Delta$ EGFRs oder v-erbB Onkogenen von Vögeln beobachtet werden, erleichtern vermutlich die Dimerbildung durch Nachahmen der konformationellen Änderungen, die sich aus der Ligandenbindung ergeben. Es wurde beobachtet, dass lösliche extrazelluläre Domänen von EGFR oligomerisieren und dass die strukturelle Veränderung in der Ektodomäne eine spontane Oligomerisierung der extrazellulären Domänen, der zytoplasmatischen Domänen oder von beiden induzieren kann.

**[0135]** Die extrazelluläre Deletion in  $\Delta$ EGFR entfernt die Mehrzahl der Aminosäuren, welche die Subdomänen I und II von EGFR umfassen, was einen großen Teil der ersten (eher aminoterminalen) der beiden Cystein-reichen Sequenzen in der extrazellulären Region des Rezeptors umfasst. Die Subdomäne III, von der berichtet wurde, dass sie EGFR Liganden-bindende Eigenschaften verleiht, bleibt in dem  $\Delta$ EGFR Onkoprotein erhalten, obwohl  $\Delta$ EGFRs den Liganden in NIH3T3-Zellen nicht zu binden scheinen. Die Koexpression von holo-EGFRs und  $\Delta$ EGFRs wurde in humanen Glioblastomen und anderen Tumor-Proben beobachtet, was nahe legt, dass EGFR/ $\Delta$ EGFR koexprimierende Zellen mit der humanen Krankheit in enger Beziehung stehen könnten.

**[0136]** Ein von der Ektodomäne abgeleiteter Mutant des p185neu Onkogens mit einer Carboxyterminalen Deletion (T691stop neu), dem die gesamte Kinase-Domäne und Carboxyterminale Autophosphorylierungsstellen fehlen, wurde in humanen Glioblastomzellen exprimiert, die vollständig langes EGFR und  $\Delta$ EGFRs koexprimieren, um zu untersuchen, ob die p185neu Ektodomäne mit den trunkierten  $\Delta$ EGFRs mit der deletierten Ektodomäne assoziieren und die durch  $\Delta$ EGFR vermittelte Signalgebung beeinflussen könnte.

## Ergebnisse

### Expression von mutierten Formen von EGFR und p185neu in humanen Glioblastomzellen

**[0137]** U87MG humane Glioblastomzellen exprimieren erhöhte Mengen ( $10^5$  Rezeptoren/Zelle) des endogenen Wildtyp EGFR. Drei klonale Derivate von elterlichen U87MG humanen Glioblastomzellen wurden für diese Studien verwendet: U87/T691-1 Zellen enthalten T691stop neu in dem U87MG Hintergrund; U87MG  $\Delta$ EGFR Zellen exprimieren erhöhte Konzentrationen ( $10^6$  Rezeptoren/Zelle) an humanen EGFR Proteinen in elterlichen U87MG Zellen; und doppelt transfizierte U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen enthalten endogenes EGFR,  $\Delta$ EGFRs und T691stop mutierte neu Proteine. Die Expressionsmengen an EGFRs und trunkierten neu Proteinen in von U87MG-abgeleiteten humanen Glioblastomzellen nach der metabolischen Markierung wurden verglichen. Subklone, die von elterlichen U87MG humanen Glioblastomzellen abgeleitet wurden, die wegen der Expression von  $\Delta$ EGFR und/oder T691stop neu mutierten Rezeptoren bemerkenswert sind, wurden 15 Stunden lang mit  $^{35}$ S-Cystein markiert, und die Zelllysate wurden entweder mit anti-EGFR mAb 528, der sowohl mit EGFR als auch mit den Ektodomänen von  $\Delta$ EGFR reagiert oder mit anti-neu mAb 7.16.4, der die Ektodomäne von p185neu erkennt, immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden gelöst und mit Hilfe eines 8% SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurden Protein-Signale beobachtet, welche EGFR (170 kDa),  $\Delta$ EGFRs (140–155 kDa) und trunkierte T691stop neu Proteine (115 kDa) repräsentieren. U87MG Zellen exprimieren nur endogenes vollständig langes EGFR; U87/T691-1 Zellen exprimieren endogenes EGFR und T691stop neu Proteine; U87MG. $\Delta$ EGFR Zellen exprimieren endogenes EGFR und transfizierte  $\Delta$ EGFRs; und U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen exprimieren EGFR,  $\Delta$ EGFRs und T691stop neu Proteine. Sämtliche Signale wurden nach der Autoradiographie beobachtet (24 ständige Exposition). Die Immunpräzipitation mit mAb 528 (Oncogene Science), der mit EGFR und  $\Delta$ EGFR reagiert, zeigte sämtliche EGFR-Formen, die in den von U87MG-abgeleiteten Zelllinien exprimiert werden. EGFRs wurden nur in U87MG. $\Delta$ EGFR und U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen identifiziert. Die metabolische Markierung und Immunpräzipitation mit mAb 7.16.4, der mit der Ektodomäne von p185neu reagiert, erlaubte die Identifikation von T691stop mutierten neu Rezeptoren mit 115 kDa in U87/T691-1 Zellen und in U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen. Eine durchflusszytometrische Analyse von U87/T691-1 und U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Subklonen mit mAb 7.16.4 bestätigte die Oberflächenlokalisierung von T691stop neu Proteinen. Die durchflusszytometrische Analyse bestätigte außerdem die Zelloberflächen-Lokalisierung von  $\Delta$ EGFRs sowohl auf U87MG. $\Delta$ EGFR als auch auf U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Subklonen. U87MG Glioblastomzellen enthalten vernachlässigbare Mengen an erbB2 oder erbB3.

**[0138]** Die Immunpräzipitation und das Immunblotting von EGFRs in U87MG.ΔEGFR Zellen deckte das Vorhandensein von endogenem EGFR (170 kDa) und transfizierten ΔEGFRs auf, die als Doubletsen mit Mr 140 kDa und 155 kDa liefen. U87MG.ΔEGFR Zelllysate wurden entweder mit mAb Δ124, der nur mit ΔEGFR reagiert oder mit mAb 528, der mit der extrazellulären Domäne sowohl von EGFR als auch von ΔEGFR reagiert, immunpräzipitiert. Gleiche Proteinmengen, die mit Hilfe des Bio-Rad Protein-Assay-Kits (Bio-Rad Laboratories) bestimmt wurden, wurden immunpräzipitiert, und die Immunkomplexe wurden mit Hilfe eines SDS/8% PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Immunpräzipitierte EGFRs wurden mit Hilfe des Immunblotting mit Ab-4, einem polyklonalen Antikörper gegen humanes EGFR, detektiert. Der Δ124 Antikörper präzipitierte zwei Spezies von ΔEGFRs mit 140–155 kDa. mAb 528 präzipitierte endogenes EGFR (mr = 170 kDa) ebenso wie ΔEGFRs (140–155 kDa). Die beiden ΔEGFRs Spezies in U87MG.ΔEGFR Zellen waren klarer erkennbar mit dem mAb Δ124. Sämtliche Proteinsignale wurden mit Hilfe des verstärkten Chemilumineszenz-Systems (enhanced chemiluminescence, ECL) system, Amersham) visualisiert. Die Scanning-Densitometrie der mit dem mAb Δ124 immunpräzipitierten ΔEGF Rezeptoren zeigte, dass das Verhältnis von 155 kDa zu 140 kDa ΔEGFR Formen in U87MG.ΔEGFR Zellen 2,3 betrug. Darüber hinaus zeigte die densitometrische Analyse von mAb 528 Immunkomplexen, dass das Verhältnis von ΔEGFR/EGFR in U87MG.ΔEGFR Zellen etwa 10:1 betrug. Dieses Muster konnte auch in U87MG.ΔEGFR/T691s Doppeltransfektanten nachgewiesen werden. Die Scanning-Densitometrie wurde verwendet, um ein stöchiometrisches Verhältnis von ΔEGFR:EGFR von 10:1 mit Hilfe der Immunpräzipitation von Zelllysaten unter Verwendung von mAb 528, der mit den extrazellulären Domänen von EGFR und ΔEGFR reagiert, gefolgt von einem Immunblott mit einem polyklonalen Antiserum, das mit EGFR sowohl in U87MG.ΔEGFR Zellen als auch in U87MG.ΔEGFR/T691s Zellen reagiert, zu bestätigen.

**[0139]** Von der T691stop neu Ektodomäne wurde unter Verwendung des Membranimpermeablen Reagenz zur Quervernetzung, DTSSP (3,3'-Dithiobis (sulfosuccinimidylpropionat) gezeigt, dass sie effizient Heterodimere mit dem vollständig langen Wildtyp EGFR auf der Oberfläche von elterlichen U87MG Zellen und in Fibroblasten von Nagern bildet,. Die p185neu Ektodomäne inhibierte die EGF-induzierte Herabregulierung von endogenem EGFR in von U87MG abgeleiteten Zellen, wie mit Hilfe des Immunblottings bestimmt wurde. Die durchflusszytometrische Analyse deutete darauf hin, dass die an der Zelloberfläche auftretende Rezeptor Assozierung die inhibition von EGFR vermittelt, eher als die Endozytose und Degradation. Insbesondere wurden Experimente durchgeführt, welche die Assoziation zwischen endogenem EGFR und trunkierten neu Rezeptoren in vivo sowie die Inhibition der EGF-induzierten Herabregulierung von EGFR in Gliomzellen, die T691stop neu Rezeptoren exprimieren, zeigten. U87MG Elternzellen und U87/T691-1 Zellen (U87MG Zellen, die T691stop neu exprimieren), wurden mit dem anti-EGFR mAb 528 (Oncogene Science) oder dem anti-neu mAb 7.16.4 nach der Quervernetzung mit DTSSP (3,3'-Dithiobis(sulfosuccinimidylpropionat) (2 mM) (Pierce) mit oder ohne Behandlung mit EGF (100 ng/ml bei 37°C für 10–15 min) präzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mit Hilfe eines SDS/8% PAGE unter reduzierenden Bedingungen analysiert. EGFR (Mr = 170 kDa) wurde durch Immunblotting mit Ab-4 (Oncogene Science), einem polyklonalen Antikörper gegen humanes EGFR, nachgewiesen. Kopräzipitierte EGFR Proteine wurden in U87/T691-1 Zellen nachgewiesen, die mit anti-neu mAb 7.16.4 immunpräzipitiert wurden. Die Behandlung mit EGF führte zu einer effizienteren Herabregulierung von EGFR in U87MG Zellen als in U87/T691-1 Zellen. Diese Daten stimmen mit früheren Studien, die in Fibroblasten von Nagern durchgeführt wurden, überein. Die T691stop neu Ektodomäne inhibiter die EGF-induzierte Phosphorylierung des Wildtyp endogenen EGFR in von U87MG abgeleiteten Zellen. ΔEGFR wird in U87MG.ΔEGFR Zellen konstitutiv phosphoryliert, während p170 EGFR in U87MG Elternzellen und in U87MG.ΔEGFR Zellen nur nach Zugabe von EGF phosphoryliert wird. Das Blotten mit einem anti-Phosphotyrosin Antikörper zeigte, dass die ΔEGFR Spezies mit einem geringeren Molekulargewicht (p140) im Verhältnis zu der p155 Spezies in U87MG.ΔEGFR Zellen unterphosphoryliert ist. Die Liganden-abhängige Aktivierung von EGFRs in von U87MG abgeleiteten humanen Glioblastomzellen wurde wie folgt bestimmt. Der Phosphotyrosingehalt von anti-EGFR Immunkomplexen in U87MG Zellen, in U87/T691-1 Zellen (die endogenes vollständig langes EGFR und T691stop mutiertes neu enthalten) und in U87MG.ΔEGFR Zellen (die endogenes EGFR und ΔEGFR enthalten) wurde bestimmt. Gleiche Zellzahlen wurden ausplattiert und nach der Anheftung an 10-cm Platten in Serum-freiem Medium 24 Stunden lang hungrig gelassen. Die Zellen wurden ± EGF (100ng/ml bei 37°C für 10–15 Minuten) behandelt, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit PI/RIPA Puffer gelöst. Lysate mit gleichen Proteinkonzentrationen, die mit Hilfe des Bio-Rad Assays bestimmt wurde (Bio-Rad Laboratories) wurden mit dem anti-EGFR mAb 528 immunpräzipitiert, und die Immunkomplexe wurden mit Hilfe eines SDS/8% PAGE unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Phosphorylierte EGFRs wurden in elterlichen U87MG Zellen und U87MG.ΔEGFR Zellen, nicht jedoch in U87/T691-1 Zellen nachgewiesen. Die Phosphorylierung von endogenem, vollständig langen EGFR (170 kDa) war in U87MG Zellen und in U87MG.ΔEGFR Zellen EGF-abhängig. Jedoch war die Phosphorylierung von ΔEGFRs in U87mG.ΔEGFR Zellen nicht abhängig von der Behandlung mit EGF. Der Blot wurde gestript und erneut mit dem polyklonalen anti-EGFR Antikörper, Ab-4, getestet. Das Vorhandensein sämtlicher EGFRs wurde in den wie oben beschrie-

ben behandelten Zellarten bestätigt. EGFR Proteine traten als Doublet von 140–155 kDa auf, wobei die Spezies mit höherem Molekulargewicht signifikanter phosphoryliert waren. Sämtliche Protein-Signale wurden mit Hilfe des verstärkten Chemilumineszenz (ECL) Systems (Amersham) visualisiert.

Modulation des durch ΔEGFR-vermittelten Zellwachstums und der Transformation durch den T691stop neu Mutanten

**[0140]** Die Zellproliferation und Transformationseffizienz von U87MG-abgeleiteten humanen Glioblastom-Zelllinien wurde *in vitro* und *in vivo* bestimmt, um die Modulation der ΔEGF Rezeptor-Signalgebung durch die von der Ektodomäne abgeleiteten p185neu mutierten Proteine zu bestimmen. Die Inhibition des Zellwachstums unter Vollmedium- oder reduzierten Serum-Bedingungen wurde in den folgenden Experimenten untersucht.  $2 \times 10^4$  Zellen jeder Zelllinie wurden in 6-Well Platten ausplattiert und in Voll-Wachstumsmedium anhängen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder weiterhin in Voll-Wachstumsmedium (10%-FBS) kultiviert oder in 2%-FBS Serum transferiert. Die Zellen wurden vier Tage lang wachsen gelassen und anschließend trypsinisiert und gezählt. Elterliche U87MG Zellen wurden zur Normalisierung (Wachstumsratio = 1,0 für sämtliche Experimente) verwendet. Das Wachstum aller abgeleiteten Zelllinien wurde zum Vergleich ausgedrückt als Teil der elterlichen Zelllinie. U87MG.ΔEGFR Zellen exprimieren endogenes EGFR und ΔEGFRs, U87MG.ΔEGFR/T691s Zellen exprimieren EGFR, ΔEGFR und T691stop neu, und U87/T691-1 Zellen exprimieren endogenes EGFR und T691stop neu Proteine. Die ΔEGFR Expression (U87MG.ΔEGFR Zellen) erhöhte die Zellproliferation unter reduzierten Serum-Bedingungen im Vergleich zu elterlichen U87MG Zellen, was mit der Liganden-unabhängigen Aktivierung von ΔEGFRs übereinstimmt. Die Expression T691stop mutierter neu Proteine inhibierte das Zellwachstum in reduziertem Medium und – bemerkenswerterweise – in Voll-Wachstumsmedium sowohl in EGFR/ΔEGFR-koexprimierenden Glioblastomzellen als auch in elterlichen U87MG Zellen, die nur endogenes EGFR enthalten. Erwähnenswerterweise zeigten U87MG.eEGFR/T691s Subklone eine verringerte Zellproliferation im Vergleich zu elterlichen U87MG Zellen, denen EGFRs fehlen, sowohl in Voll-Wachstumsmedium als auch – zu einem höheren Grad – unter reduzierten Serum-Bedingungen.

**[0141]** ΔEGFR erhöhte die Transformationseffizienz *in vitro* in Adhäsions-unabhängigen Wachstums-Assays gegenüber elterlichen U87MG Zellen nicht. Das Adhäsions-unabhängige Wachstum wurde in den folgenden Experimenten untersucht. 1000–3000 Zellen jeder Zelllinie wurden in Weichagar-Platten ausplattiert und 21–28 Tage lang kultiviert. Die Kolonien wurden anschließend visualisiert und nach der Färbung gezählt. U87MG Zellen sind primäre transformierte humane Zellen, die mehrere somatische genetische Veränderungen enthalten, einschließlich Deletionen von p16 und in dem mutmaßlichen Protein-Tyrosinphosphatase-Gen, PTEN. Das Wachstum der U87MG.ΔEGFR/T691s Zellen in Weichagar war im Vergleich zu elterlichen U87MG Zellen bzw. U87MG.ΔEGFR Zellen um 41,3% und 45% reduziert. Die Inhibition des Adhäsions-unabhängigen Wachstums, das durch T691stop neu Proteine erreicht wurde, war signifikanter in U87MG Elternzellen, denen ΔEGFR fehlt (durchschnittlich 75,2% Inhibition relativ zu den elterlichen U87MG Zellen in drei unabhängigen Experimenten).

**[0142]** Der ΔEGF Rezeptor verleiht *in vivo* in dem U87MG Zell-Hintergrund einen selektiven Wachstumsvorteil, während viele Studien gezeigt haben, dass Holo-EGFRs *in vivo* nicht transformierend sind, außer unter definierten Bedingungen, in denen p185neu Rezeptoren koexprimiert werden. Es wurde gezeigt, dass die Expression der T691stop mutierten neu Ektodomäne in U87MG Zellen vorzugsweise den U87MG onkogenen Phänotyp inhibiert, wenn sie mit einer Form des trunkierten p185neu (N691stop) verglichen wird, der sich von T691stop dadurch unterscheidet, dass er die protoonkogene Transmembranregion enthält. Ein Vergleich des Tumorwachstums in athymischen Mäusen zwischen von U87MG abgeleiteten Zelllinien wurde wie folgt durchgeführt.  $10^6$  Zellen jeder Zelllinie wurden intradermal an Tag 0 injiziert, und das Tumorvolumen wurde 1–2 ×/Woche festgehalten. U87MG Zellen wurden auf einer Seite injiziert und die transfizierte Zelllinie wurde auf der gegenüberliegenden Seite des Tieres injiziert. Die T691stop neu Protein-Expression setzt den selektiven *in vivo* Wachstumsvorteil, der durch ΔEGFR in U87MG Zellen vermittelt wird, außer Kraft. Dieses Ergebnis wurde durch eine Analyse der drei zusätzlichen U87MG.ΔEGFR/T691s Subklone bestätigt. Der U87MG.ΔEGFR/T691s Subklon zeigte Wachstumskinetiken, die ähnlich denen der elterlichen U87MG Zellen sind, obwohl er *in vivo* stärker als U87MG Zellen inhibiert zu sein schien. Die *in vivo* beobachtete Inhibition in allen U87MG.ΔEGFR/T691s Subklonen stand in direktem Zusammenhang mit der Stöchiometrie der T691stop mutierten neu Expression.

Der T691stop neu Mutant bildet *in vivo* Heterodimere mit ΔEGFR

**[0143]** Aufgrund der genetischen Komplexität der U87MG.ΔEGFR Transfektanten und der U87MG.ΔEGFR/T691s doppelt transfizierten Subklone und der mehrfachen homodimeren und heterodimeren

Komplexe, die mit ähnlichen Molekulargewichten in der Gradienten-SDS-PAGE-Analyse laufen, wurde das Thio-spaltbare, Membran-impermeable Vernetzungsmittel DTSSP verwendet, um die individuellen Komponenten der mutmaßlichen Oberflächen-gekoppelten heteromeren Komplexe zu untersuchen. Der mAb 528 wurde verwendet, um sämtliche EGFRs (Wildtyp und  $\Delta$ EGFRs), welche Heteromere mutierten neu Proteinen formen könnten, zu immunpräzipitieren. Ko-präzipitierte  $\Delta$ EGFR Monomere aus anti-neu Immunkomplexen wurden mit Hilfe eines in vivo Quervernetzungsexperimentes unter Verwendung von DTSSP beseitigt. Die Quervernetzung von U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen und das Auftrennen der Immunkomplexe mit Hilfe von SDS/6–8% PAGE unter reduzierenden Bedingungen förderte Beweismittel für die Heterodimerbildung zwischen T691stop neu Proteinen und den p140 $\Delta$ EGFR, p155 $\Delta$ EGFR und p170EGFR Formen zutage. Die meisten der T691stop neu mutierten Rezeptoren assoziierten bei Verwendung dieser Verfahren mit der p140 $\Delta$ EGFR Form, obwohl schwache Banden für heterodimerisierte p155 $\Delta$ EGFR und p170EGFR Proteine wiederholt beobachtet wurden. Die Identifikation von  $\Delta$ EGFR Proteinen auf der Zelloberfläche von U87MG. $\Delta$ EGFR und U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Doppeltransfektanten mit Hilfe der Durchflusszytometrie unterstützt die Beobachtungen, die mit dem Membranimpermeablen Quervernetzungsmitteln gemacht wurden. T691stop neu mutierte Rezeptoren bilden Heterodimere mit  $\Delta$ EGF Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Experimente zum Nachweis von ko-präzipitierten  $\Delta$ EGFRs aus anti-neu Immunkomplexen mit Hilfe der in vivo Quervernetzung wurden wie folgt durchgeführt. 1 mg Lysat von U87MG Elternzellen (Spur 1, 2), U87MG.EGFR Zellen und U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen wurde mit anti-EGFR mAb 528 oder anti-neu mAb 7.16.4 nach der Quervernetzung mit DTSSP (3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidylpropionat) (2 mM) (Pierce), gefolgt von der Behandlung mit EGF (37°C für 15 min), immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mit Hilfe einer SDS/8%PAGE unter reduzierenden Bedingungen analysiert, und die Nylon-Membran wurde mit Ab-4, einem polyklonalen Ab gegen humanes EGFR, geblottet.

**[0144]** Die EGFRs wurden in U87MG Zellen (nur endogenes EGFR, Mr = 170 kDa); in U87MG. $\Delta$ EGFR Zellen (endogenes EGFR und  $\Delta$ EGFRs, Mr 140–155 kDa); und in U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen (endogenes EGFR und  $\Delta$ EGFRs, Mr 140–155 kDa) nachgewiesen. Ko-präzipitierte EGFR Proteine wurden in U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen nachgewiesen, die mit anti-neu mAb 7.16.4 immunpräzipitiert wurden. In U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen wurde festgestellt, dass T691stop neu mit der Form des  $\Delta$ EGFR mit geringerem Molekulargewicht (140 kDa, stärkstes Signal), der langsamer laufenden Form des  $\Delta$ EGFR (p155) und dem endogenen Holo-EGFR (p170) ko-präzipitierte. Die Behandlung mit EGF führte zu einer besseren Visualisierung der immunkomplexierten Monomere, jedoch konnten ko-präzipitierte EGFRs in anti-neu Immunkomplexen aus U87MG-abgeleiteten Zelllinien ohne Behandlung mit EGF identifiziert werden.

**[0145]** Der Phosphotyrosingehalt immunpräzipitierter EGFRs in U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen wurde unter Verwendung des oben beschriebenen Blots bestimmt. Der Blot wurde gestript und erneut mit dem anti-Phosphotyrosin Antikörper; mAb PY-20 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.), getestet. Die in anti-neu Immunkomplexen nachgewiesenen EGFR Proteine wiesen nach der Behandlung mit EGF vernachlässigbare Phosphotyrosingehalte in U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen im Vergleich zu anti-EGFR Immunkomplexen in U87MG Elternzellen und in U87MG. $\Delta$ EGFR und U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen. Der Phosphotyrosingehalt der anti-EGFR Immunkomplexe in U87MG. $\Delta$ EGFR Zellen und U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen unterschied sich nicht merklich in diesen Proteinlysat-Konzentrationen.

**[0146]** Das Blotten mit einem anti-Phosphotyrosin Antikörper bestätigte, dass beide  $\Delta$ EGFR Spezies, die mit T691stop neu assoziiert sind, unterphosphoryliert sind. Ein vernachlässigbarer Phosphotyrosingehalt für EGFR Monomere, die mit T691stop neu Rezeptoren immunkomplexiert waren, wurde durchgängig in sämtlichen Experimenten nachgewiesen. Es wurde beobachtet, dass EGF die Effizienz der Heterodimerbildung zwischen p170EGFR und der neu Ektodomäne erhöht, obwohl diese Assoziation Ligandenunabhängig ist. EGF erhöhte die Bildung von Immunkomplexen zwischen EGFR und der p185neu Ektodomäne minimal, was nahe legt, dass EGF die Heterodimerbildung stabilisieren könnte, wenn nicht sogar die EGFR Homodimerbildung.

Verringerung des Phosphotyrosingehalts von EGFR Monomeren in vivo durch T691stop neu Koexpression

**[0147]** Der Phosphotyrosingehalt der  $\Delta$ EGFR Monomere, die mit T691stop neu Rezeptoren immunkomplexiert sind, war in sämtlichen Experimenten vernachlässigbar. Die Ergebnisse deckten außerdem auf, dass die  $\Delta$ EGFR Form mit geringerem Molekulargewicht (140 kDa) im Vergleich zu der p155 $\Delta$ EGFR Form sowohl in U87MG. $\Delta$ EGFR Zellen als auch in U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Doppeltransfektanten relativ unterphosphoryliert war.

**[0148]** Unterschiede in dem Phosphotyrosingehalt von  $\Delta$ EGFR Monomeren zwischen U87MG. $\Delta$ EGFR Zellen und U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen wurden in in vivo Quervernetzungsexperimenten in Immunpräzipitationen

größerer Zelllysate unter Verwendung des mAb 528, der mit sämtlichen EGFR Formen reagiert, nicht beobachtet. Folglich wurde zur spezifischen Untersuchung des in vivo Phosphotyrosingehalts von  $\Delta$ EGFRs in T691stop neu-exprimierenden Zellen ein Antikörper, der nur mit  $\Delta$ EGFR reagiert, verwendet, um  $\Delta$ EGFRs aus Zelllysaten zu präzipitieren, die reduzierte Proteinkonzentrationen von solchen Proteinen enthalten, die zum Nachweis von heterodimeren Komplexen benötigt werden. Der Phosphotyrosingehalt von  $\Delta$ EGFRs in vivo in U87MG. $\Delta$ EGFR Zellen mit oder ohne Koexpression des T691stop mutierten neu wurde wie folgt bestimmt. Lysate (200  $\mu$ m) von U87MG. $\Delta$ EGFR Zellen und U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen wurden mit dem nur mit  $\Delta$ EGFR reagierenden mAb  $\Delta$ 124 immunpräzipitiert und entweder mit dem anti-Phosphotyrosin mAb PY-20 oder mit anti-EGFR polyklonalen Antikörper Ab-4 geblottet. Das Blotten mit PY-20 nach der Immunpräzipitation mit mAb  $\Delta$ 124, der nur mit  $\Delta$ EGFR reagiert, zeigte mehrere Phosphoproteine in U87MG. $\Delta$ EGFR Zellen und in U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen. Die langsamer laufende Form von  $\Delta$ EGFR (155 kDa) wurde mit Hilfe des PY-20 Antikörpers nachgewiesen, während die schneller laufende Form von  $\Delta$ EGFR (140 kDa) nicht durch den PY-20 Antikörper nachgewiesen wurde, was auf einen relativ niedrigeren Phosphotyrosingehalt als p155 kDa hinweist. Nach dem Strippen der Membran und dem erneuten Testen mit Ab-4, der mit sämtlichen EGFRs reagiert, wurde beide  $\Delta$ EGFR Formen sowohl in U87MG. $\Delta$ EGFR als auch in U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Doppeltransfektanten sichtbar gemacht. Eine Scanningdensitometrische Analyse des Phosphorylierungsgehaltes von immunpräzipitierten p155 $\Delta$ EGFR Monomeren in diesen Zelllinien zeigte eine Verringerung um 33,7% in U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen im Vergleich zu U87MG. $\Delta$ EGFR Zellen unter Vollwachstumsbedingungen. Die beobachteten konstitutiven Unterschiede im  $\Delta$ EGFR Phosphotyrosingehalt konnten folglich nicht durch Serum-enthaltende Faktoren überwunden werden. Das Verhältnis der PTyr/ $\Delta$ EGFRs in U87MG. $\Delta$ EGFR (Zellen betrug 1,57; dieses Verhältnis in U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen betrug 1,04, wie mit Hilfe der Scanning-Densitometrie bestimmt wurde. Dieser Unterschied wurde in zwei weiteren Experimenten beobachtet.

**[0149]** Der Phosphotyrosingehalt sämtlicher immunpräzipitierter  $\Delta$ EGFR Monomere in lebenden Zellen wurde analysiert, nicht nur der der  $\Delta$ EGFR Monomere, die mit T691stop neu Proteinen immunkomplexiert waren. Zusätzlich zu der Feststellung, dass  $\Delta$ EGFRs, die mit T691stop neu mutierten Rezeptoren immunkomplexiert sind, einen vernachlässigbaren Phosphotyrosingehalt aufweisen, weisen diese Daten daraufhin, dass die Oberflächenexpression von T691stop neu allein ausreicht, um den Phosphotyrosingehalt des monomeren  $\Delta$ EGFR in trans zu reduzieren. In T691stop neu-enthaltenden Zellen könnte die beobachtete 33,7%ige Verringerung des Phosphotyrosingehalts von immunpräzipitierten  $\Delta$ EGFR Monomeren die Signalgebung von dem aktivierte  $\Delta$ EGFR Rezeptorkomplex verringern, da der Signalkomplex ein Multimer höherer Ordnung sein könnte und von  $\Delta$ EGFR berichtet wurde, dass er eine geringere Stöchiometrie des Phosphotyrosingehalts als EGF-stimuliertes Wildtyp EGFR hat. Die Substratbindung und/oder die katalytische Aktivität der  $\Delta$ EGFR Rezeptor-Kinase könnte durch eine Verringerung des monomeren  $\Delta$ EGFR Phosphotyrosingehalts verändert sein. Die geringere Menge an konstitutivem Phosphotyrosingehalt von  $\Delta$ EGFR relativ zu Liganden-stimuliertem Wildtyp EGFR könnte der Grund sein für die negative Wirkung auf das in vivo Wachstumsverhalten von individuellen Punktmutationen in den terminalen Autophosphorylierungsstellen von  $\Delta$ EGFR. Hetero-Oligomere, die durch die Assoziation zwischen  $\Delta$ EGFR Dimeren und T691stop neu Dimeren gebildet werden, könnten ein Mechanismus für die Verringerung des Phosphotyrosingehalts von  $\Delta$ EGFR und die phänotypische Inhibition sein, die aus der Expression und Oberflächenlokalisierung des T691stop neu resultiert.

Verringerung der in vitro Kinase-Aktivität von  $\Delta$ EGFR durch die Expression von T691stop neu

**[0150]** Da eine Verringerung des Phosphotyrosingehalts des monomeren  $\Delta$ EGFR in Zellen beobachtet wurde, die T691stop neu mutierte Rezeptoren exprimieren, wurde untersucht, ob die katalytische Aktivität der EGFR Rezeptor-Kinase durch die Expression von T691stop neu verändert werden könnte. Unter Bedingungen, die mit denen identisch waren, welche das Vorhandensein von  $\Delta$ EGFR in quervernetzten T691stop neu-assoziierten Heterodimeren bestätigten, wurden Experimente zur Untersuchung der Verringerung der EGFR in vitro Kinase-Aktivität durch Expression von T691stop neu durchgeführt. 200  $\mu$ g Lysate wurden aus U87MG. $\Delta$ EGFR Zellen und U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen mit und ohne Vorbehandlung mit dem Membran-impermeablen Quervernetzungssagens DTSSP (2 mM) erhalten. Anti-EGFR (mAb  $\Delta$ 124) Immunkomplexe aus diesen Zellen wurden in 50  $\mu$ l Kinase-Reaktionspuffer, enthaltend 0,2 mCi [ $^{32}$ P]- $\gamma$ -ATP, bei Raumtemperatur für 30 Minuten suspendiert. Proteinproben wurden mit Hilfe eines 10% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe der Autoradiographie analysiert. Es wurde gezeigt, dass anti-EGFR Immunkomplexe eine erhöhte in vitro Kinase-Aktivität in U87MG. $\Delta$ EGFR Zellen aufweisen, die mit einem Membran-impermeablen Quervernetzungsmittel (DTSSP) vorbehandelt wurden, nicht jedoch in doppelt transfizierten Zellen, die T691stop neu exprimierten Rezeptoren exprimieren. Die Expression von T691stop neu führte zu einer eindrucksvollen Inhibition der Trans-Phosphorylierung der langsamer laufenden Form (155 kDa) von  $\Delta$ EGFR aufgrund der Heterodimer-Bildung, die durch Verwendung von DTSSP bestätigt wurde. Diese Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Versuchen bestätigt. Da das 155 kDa  $\Delta$ EGFR in größeren Mengen sowohl in U87MG. $\Delta$ EGFR Zellen als auch in

U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen vorhanden ist, könnte die durch T691stop neu vermittelte Verringerung der katalytischen Aktivität der  $\Delta$ EGFR Rezeptor-Kinase die phänotypische Inhibition erklären, die in doppelt transfizierten humanen Glioblastomzellen beobachtet wird. In diesen in vitro Experimenten wurden keine signifikanten Unterschiede bei der Phosphorylierung der p140 $\Delta$ EGFR Form beobachtet; jedoch könnte diese Spezies, da sie in vitro phosphoryliert war, in vivo phosphoryliert sein. Die Inhibition der katalytischen Aktivität des  $\Delta$ EGFR Rezeptors wurde für die Rezeptor-Transphosphorylierung einheitlich beobachtet. Bei der Verwendung geringerer Proteinkonzentrationen in den in vitro Kinase-Experimenten gab es eine minimale Phosphorylierung des exogenen Histone III Substrats in sämtlichen anti-EGFR-Immunkomplexen.

**[0151]** Die phänotypische Inhibition der  $\Delta$ EGFR Signalgebung, die durch T691stop neu mutierte Rezeptoren in humanen Glioblastomzellen vermittelt wird, scheint folglich aus folgendem zu resultieren: (1) der Heterodimerbildung zwischen T691stop neu Proteinen und beiden Formen von  $\Delta$ EGFR, obwohl eine erhöhte Heterodimerbildung mit p140 $\Delta$ EGFR beobachtet wurde; (2) der Trans-Inhibition des Phosphotyrosingehalts der 155 $\Delta$ EGFR Monomere in vivo durch Expression von T691stop neu; und (3) der Inhibition der Trans-Phosphorylierung der p155 $\Delta$ EGFR Kinase als eine Folge der Expression von T691stop neu und der Heterodimerbildung.

#### Diskussion

**[0152]** U87MG Zellen, in denen konstitutiv aktive  $\Delta$ EGF Rezeptoren mit endogenem EGFR koexprimiert werden, stellen eine starke Annäherung an eine besonders aggressive Unterart von humanen Glioblastomen dar, solchen Tumoren, in denen eine p16 Deletion, ein allelischer Verlust auf Chromosom 10q und eine Aktivierung von EGFR auftritt, während p53 nicht mutiert ist. Von U87MG abgeleitete humane Glioblastomzellen, die endogenes EGFR, erhöhte Mengen an  $\Delta$ EGFR Onkoproteinen und T691stop Kinasedefizienten neu mutierten Rezeptoren exprimieren (U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s doppelt transfizierte Subklone) wurden in sämtlichen in vitro und in vivo Assays stärker als elterliche U87MG Zellen inhibiert. Dies stellt eine signifikante Verringerung des Phänotyps dar, der mit Hilfe der Expression des  $\Delta$ EGFR Onkoproteins allein im U87MG Hintergrund (U87MG. $\Delta$ EGFR Zellen) beobachtet wurde, insbesondere in vivo. Angesichts der Tatsache, dass die Überexpression des Wildtyp EGFR allein in vivo nicht-onkogen ist, angesichts der beobachteten Bildung von Heterodimeren der  $\Delta$ EGFR-neu Ektodomäne und dem Verhältnis von  $\Delta$ EGFR:EGFR Proteinen in diesen Zellen, scheint es, dass die beobachtete Wachstumsinhibition, die durch T691stop neu verliehen wird und von U87MG. $\Delta$ EGFR/T691s Zellen gezeigt wird, durch die gestörte Signalgebung über  $\Delta$ EGFR Rezeptoren eher als durch endogene p170 EGFRs vermittelt wird.

**[0153]** Es ist möglich, dass die T691stop neu mutierten Rezeptoren einen  $\Delta$ EGFR-EGFR heterodimeren Komplex verhindern, obwohl das stöchiometrische Verhältnis von  $\Delta$ EGFR:EGFR in U87MG. $\Delta$ EGFR Zellen und in U87MG.EGFR/T691s Zellen etwa 10:1 beträgt. Anders als endogenes Wildtyp EGFR tritt die Dimerbildung des  $\Delta$ EGF-Rezeptors und die Autophosphorylierung in Gliomzellen unabhängig vom Liganden auf, und  $\Delta$ EGFR-exprimierende NIH3T3 Zellen zeigen ein Liganden-unabhängiges Wachstum und transformierende Eigenschaften, was nahe legt, dass sich die onkogene Signalgebung aus konstitutiv phosphorylierten  $\Delta$ EGFR Dimeren ergibt. Andere haben keine EGFR- $\Delta$ EGFR Heterodimere in U87MG. $\Delta$ EGFR Zellen identifiziert. Darüber hinaus kann die Tyrosin-Phosphorylierung der Kinase-defizienten Mutanten von  $\Delta$ EGFR, die in U87MG Zellen exprimiert werden, nicht durch Aktivieren des Wildtyp EGFR durch Behandlung mit Liganden wieder hergestellt werden, was ein Fehlen der substantiellen Transphosphorylierung zwischen EGFR und  $\Delta$ EGFRs nahe legt. Angesichts der thermodynamischen Vorliebe der p185neu/erbB2 Proteinen zur Heterodimerisierung mit EGFR und anderen erbB Rezeptoren, könnten  $\Delta$ EGFRs leichter Dimere mit von der p185neu Ektodomäne abgeleiteten Proteinen bilden als mit Holo-EGFRs.

**[0154]** T691stop inhibiert die Phosphorylierung von p170EGFR in U87MG Zellen, und mit T691stop neu Proteinen immunkomplizierte EGFR und  $\Delta$ EGFR Monomere weisen einen vernachlässigbaren Phosphotyrosingehalt auf. Der Nachweis der Assoziation zwischen T691stop und  $\Delta$ EGFR deutet nicht notwendigerweise auf eine gegenüber p170 EGFR bevorzugte Assoziation hin, da  $\Delta$ EGFR und EGFR in diesen Zellen nicht in vergleichbaren Mengen exprimiert werden. Die durchflusszytometrische Analyse sämtlicher EGFRs in U87MG. $\Delta$ EGFR und U87MG.EGFR/T691s-exprimierenden Subklonen weist daraufhin, dass die Expression der p185neu Ektodomäne die Zelloberflächenpopulationen des gesamten EGFR, des Wildtyp EGFR oder des  $\Delta$ EGFR weder in U87MG Zellen, die nur endogenes EGFR enthalten, noch in U87MG. $\Delta$ EGFR Transfektanten, die EGFR und  $\Delta$ EGFR enthalten, veränderte. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass Ektodomänen von p185neu die EGFR-Signalgebung durch die Bildung defekter heteromerer oder oligomerer Rezeptor-Anordnungen, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, eher als durch Induzieren einer Internalisierung und Herabmodulierung des  $\Delta$ EGF-Rezeptors zerstört.

**[0155]** Die Autophosphorylierung von Tyrosinresten auf EGF Rezeptoren aktiviert die Bindungsstellen für Signalmoleküle und könnte ebenso die katalytische Aktivität des EGF Rezeptors regulieren. Der konstitutive Phosphotyrosingehalt von ΔEGFR Monomeren in vivo und die Kinase-Aktivität von ΔEGFR in vitro ist als eine Folge der Expression von T691stop neu in trans verringert. Die phänotypische Inhibition, die in vitro und in vivo in U87MG Zellen beobachtet wird, die ΔEGFRs und T691stop neu Proteine koexprimieren (U87MG.ΔEGFR/T691s Zellen) im Vergleich zu ΔEGFRs allein (U87MG.ΔEGFR Zellen), könnte zum Teil auf die reduzierten Bindungsstellen auf EGFRs für Signalmoleküle als Folge der Bildung von Heterodimeren mit T691stop neu zurückzuführen sein. Darüber hinaus könnte die Kinase-Aktivität zur Trans-Phosphorylierung des ΔEGF Rezeptors oder eines anderen Substrates/anderer Substrate auch durch eine konformationelle Änderung reduziert sein, die durch Assoziation mit dem T691stop neu mutierten Rezeptor induziert wird. Die Daten unterstützen das Argument, dass eine Verringerung der Kinase-Aktivität zur Trans-Phosphorylierung des Rezeptors zu einer Verringerung der Transformation beiträgt. Es wurde beobachtet, dass die in vitro Kinase-Aktivität für ein exogenes Histonsubstrat wesentlich geringer als für die Trans-Phosphorylierung des Rezeptors war und nicht merklich durch die Expression von T691stop neu verändert wurde. Die in vitro Kinase-Aktivität von ΔEGFR für exogenes Substrat wird durch Substitutionen der Carboxy-terminalen Autophosphorylierungsstellen nur minimal verändert; die Verringerung des Phosphotyrosingehalts in vivo als Folge Carboxy-terminaler Punktmutationen in ΔEGFR scheint auf zuverlässigere Weise mit einer phänotypischen Inhibition zu korrelieren. Der Grad der Inhibition, die in vivo durch den T691stop neu Mutanten erreicht wird, der in U87MG.ΔEGFR Zellen exprimiert wird, war demjenigen ähnlich, der von einer Punktmutation der ATP-Bindungsstelle oder von einem ΔEGFR Mutanten mit einer Substitution der Tyrosine 1068, 1148 und 1173 gezeigt wurde.

**[0156]** Studien, die trans-dominante p185neu Mutanten verwenden, deuteten darauf hin, dass die Ektodomänen von p185neu und EGFR für die physikalische Assoziation ausreichen und dass die EGFR-Signalgebung mit diesem Kinase-negativen p185neu Mutanten moduliert werden kann. Rezeptor-Interaktionen in der zytoplasmatischen Domäne bestimmen die erfolgreiche Signalgebung sowohl für p185neu Rezeptoren als auch für EGF-Rezeptoren. In Abwesenheit kristallographischer Daten zu den extrazellulären Regionen von p185neu und EGFR sind die strukturellen Einzelheiten der Interaktionen der Ektodomänen zwischen diesen Rezeptoren unbestimmt. Es wurde beobachtet, dass ΔEGF Rezeptoren in Abwesenheit von Liganden in einer dimerisierten Form existieren. Von löslichen extrazellulären von EGFR wurde beobachtet, dass sie in Antwort auf EGF nach der Quervernetzung oligomerisieren, obwohl von der Subdomäne III allein abgeleitete proteolytische Fragmente nicht oligomerisierten, was nahe legt, dass andere Subdomänen zu der Dimerbildung beitragen. Von der Subdomäne III wurde berichtet, dass sie EGFR Liganden-bindende Eigenschaften verleiht. Aktivierte erbB-Onkogene von Vögeln bilden Homodimere in Abwesenheit eines Liganden, der Deletionen der gesamten extrazellulären Region außer einem Teil der Subdomäne IV (zweite Cystein-reiche Domäne) aufweist. Jedoch war die physiologische Bedeutung dieser beobachteten Homodimerbildung unklar, da dies nicht mit gewebspezifischen Transformierungseigenschaften dieser Mutanten korrelierte.

**[0157]** In transformierten Zellen kann zwischen den extrazellulären Regionen von p185neu und EGFR eine physische Assoziation auftreten, trotz einer Deletion, welche den größten Teil der beiden unabhängigen Subdomänen (I, II) in der extrazellulären Region des EGF Rezeptors umfasst. Extrazelluläre Mutanten von p185neu, in denen entweder die Subdomäne I oder II deletiert ist, behalten die Fähigkeit zur Bildung von Heterodimeren mit vollständig langem EGFR bei, was bestätigt, dass diese Sequenzen für die heteromere physische Assoziation von p185neu-EGFR nicht entscheidend sind. Die phänotypische Inhibition von EGFR Onkoproteinen durch T691stop neu Proteine stützt das Argument, wonach eine physische Assoziation, die primär von den Subdomänen III und IV bestimmt wird, ausreichend für die Veränderung der Signalgebung ist. Auf Grundlage einer Analyse der Transformierungseffizienz von Fibroblasten, die humanes Wildtyp EGFR und Deletionsmutanten der extrazellulären Subdomäne von p185neu exprimieren, scheint die Subdomäne III in p185neu die am wenigsten relevante extrazelluläre Subdomäne für die Bildung eines transformierenden p185neu/EGFR heterodimeren Signalgebungskomplexes zu sein, was nahe legt, dass die von der Subdomäne IV vermittelten Interaktionen für die Initiation und/oder Stabilisierung von homodimeren und heterodimeren Rezeptorkomplexen die wichtigsten sein könnten.

**[0158]** Jede der beiden extrazellulären Cystein-reichen Domänen in der Subdomäne II und IV von p185neu und EGFR könnte eine einzigartige Faltung besitzen, die als die „EGF-Faltung“ oder „Cysteinknoten“ bekannt ist. Das Motiv ist gekennzeichnet durch eine Wiederholung von sechs Cysteinresten und durch wenigstens zwei Disulfidbindungen innerhalb der Kette. Obwohl ein ähnliches Motiv in anderen Proteinen beobachtet wurde, ist sein Vorhandensein in Zytokinen und Transmembran-Rezeptoren hoch konserviert, einschließlich des strukturell aufgeklärten Rezeptors des Tumornekrose-Faktors (tumor necrosis factor, TNF). Von mehreren Tyrosinkinase-Rezeptoren wurde gezeigt, dass sie diese Cystein-reichen Domänen enthalten, und es wird ange-

nommen, dass sie ähnliche Konformationen wie die des TNF Rezeptors annehmen. Tumornekrose-Faktor (TNF) Rezeptoren wurden in Kristallstrukturen der unkomplexierten Form als Dimere beobachtet. In dieser Form bildet die letzte extrazelluläre Cystein-reiche Domäne die hauptsächlichen dimeren Kontakte. In diesen Studien ist die Membran-proximale Domäne gestört, möglicherweise aufgrund des Fehlens der Transmembran-Region, welche diese Domäne in einem stabilen Zustand hält. Folglich wird angenommen, dass in dem gesamten Rezeptor die letzte Cystein-reiche Domäne, die direkt amino-terminal neben der Transmembran-Sequenz liegt, durch die Transmembran-Sequenz stabilisiert wird und möglicherweise an der Bildung funktioneller Dimere beteiligt ist. Es wurde ein hoher Grad an Sequenzhomologie zwischen der zweiten Cystein-reichen Domäne (Subdomäne IV) von p185neu und EGFR und dem Cysteinknoten in dem TNF-Rezeptor festgestellt. Ein einfacher Vergleich der Sequenzen in den Transmembran-proximalen Domänen der TNF- und p185neu Rezeptoren zeigt, dass wenigstens vier der sechs Cysteine konserviert sind.

**[0159]** Die Regulation durch Trans-Rezeptor-Interaktionen wurde in sämtlichen erbB Familienmitgliedern beobachtet, von denen viele eine veränderte Expression oder Regulation in humanen epithelialen Malignomen aufwiesen. Die physiologische Tendenz dieser Rezeptor-Familie, heterodimere Assoziationen zu bilden, legt nahe, dass das Targeting humaner erbB Onkoproteine mit Strukturen oder Arzneimitteln, die bestimmte Subdomänen der p185neu Ektodomäne nachahmen, bei bestimmten humanen Malignitäten erreichbar sein könnte. Alternativ könnte mit Hilfe eines gentherapeutischen Ansatzes bezügliche humaner Neoplasien die cDNA für die Ektodomäne von p185neu an erbB Rezeptorpositive Tumorzellen geliefert werden. ΔEGFR Onkoproteine werden in vielen humanen epithelialen Neoplasien differentiell exprimiert und könnten ein Tumor-spezifisches Ziel darstellen, jedoch werden diese Rezeptoren nicht durch Liganden-Bindung reguliert, sind konstitutiv phosphoryliert und werden schwach internalisiert. Diese Eigenschaften könnten die Bemühungen zur Inhibition der Signalgebung von ΔEGF Rezeptoren in humanen Tumoren beschränken. Die bevorzugte thermodynamische Tendenz zur erbB-Heterodimerbildung in Abwesenheit eines Liganden legt nahe, dass ein Targeting der erbB-Onkoproteine mit der Ektodomäne von p185neu, mit neuen Arzneimitteln oder mit Peptidmimetika, die für die Dimerbildung relevant sind, für das Erreichen einer Wachstumsinhibition wirksamer sein könnten, als die Inhibition der Liganden-induzierten Aktivierung mit monoklonalen Antikörpern oder Liganden-bindenden Antagonisten.

#### Material und Methoden

##### Vektorkonstruktion

**[0160]** Der Deletionsmutant T691stop neu wurde von der cDNA für das onkogene neu der Ratte, pSV2Tneu, abgeleitet, die eine einzige Punktmutation in der Transmembran-Region enthält. Ortsspezifische Mutagenese wurde verwendet, um ein Stopkodon an der Position Thr-691 in die Endodomäne einzuführen. Diese zytoplasmatisch-deletierte Form von p185neu, der die katalytische Domäne der Kinase und die Carboxy-terminalen Autophosphorylierungsstellen fehlen, wurde anschließend in einen Säuger-Expressionsvektor insertiert. Ein Fragment, welches das Hygromycin<sup>r</sup> Gen aus pHYG enthält, wurde in APtag-1, einen Expressionsvektor für alkalische Phosphatase (AP) unter Kontrolle des Maloney Leukämie Virus-Promotors und LTR (MuLVLTR), subkloniert. Das AP-Gen wurde anschließend durch die mutierte cDNA für T691stop neu ersetzt. Folglich wurde T691stop in dem pMuLVLTR/T691stop/Hyg<sup>r</sup> Expressionsvektor exprimiert.

##### Kultivieren der Zellen und Entwickeln von stabil transfizierten Zelllinien

**[0161]** Die U87MG humane Glioblastom Eltern-Zelllinie und der zuvor beschriebene U87MG.ΔEGFR humane Glioblastom-Subklon, der humane ΔEGFR Rezeptoren enthält (Nishikawa et al., 1994) wurden von Dr. Webster Cavenee (Ludwig Cancer Institute, San Diego, Kalifornien) erhalten. Für stabile Zelltransfektionen wurden mit Hilfe des Lipofektaminreagens (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) zehn Mikrogramm des Konstruktions pMuLV-LTR/T691stop/Hyg<sup>r</sup> in U87MG.ΔEGFR Zellen transfiziert, unter Bedingungen, die durch Transfektionen unter Verwendung des pCMV-β (bakterielle β-Galaktosidase) (Clontech) Reporterkonstrukt bestimmt wurden. Die optimale Transfektionseffizienz wurde durch die mit Hilfe eines Luminometers (Tropix) nachgewiesene Chemilumineszenz bestimmt. Sämtliche Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Bio-Whittaker, Walkersville, MD) mit 10% fötalem Rinderserum (Hyclone, Ogden, UT), 100U Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 2mM L-Glutaminen (GIBCO BRL) kultiviert. Die kultivierten Zellen wurden bei 37°C in 95% Luft/5%CO<sub>2</sub> gehalten. U87MG.ΔEGFR Zellen wurden für die Aufrechterhaltung der ΔEGFR Transgen-Expression mit 0,4mg/ml G418 (Geneticin, GIBCO BRL) angereichert.

**[0162]** Zur Entwicklung der von U87MG abgeleiteten Doppel-Transfektanten, die ΔEGFR und T691stop neu Proteine exprimieren, wurde das Medium sowohl mit G418 Sulfat als auch mit Hygromycin B angereichert.

Nach 2-3 Wochen in Selektionsmedium, enthaltend 70 µg/ml Hygromicin B (Boehringer Manheim) und 0,4mg/ml G418 Sulfat (Geneticin, GIBCO BRL), wurden etablierte U87MG.ΔEGFR Klone, die T691stop neu exprimieren (U87MG.ΔEGFR/T691 Zellen genannt) isoliert und mit Hilfe der durchschlusszytometrischen Analyse unter Verwendung des mAb 7.16.4 gegen die neu Ektodomäne analysiert. Das Medium für die stabil transfizierten Subklone war zur Aufrechterhaltung der Transgen-Expression mit 0,4mg/ml G418 Sulfat und 35–70 µg/ml Hygromicin B angereichert. Stabil transfizierte Zelllinien wurden mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse mit mAb 7.16.4 regelmäßig überprüft, um stabile Expressionslevel des T691stop neu Transgens zu belegen.

#### Metabolische Markierung von Zellen, gefolgt von Immunpräzipitation

**[0163]** Subkonfluente Zellen ( $1 \times 10^6$ ) werden über Nacht auf 10-cm Platten in Vollwachstumsmedium (10% FBS-DMEM) ausgesät. Am folgenden Tag werden die Zellen in Cysteinfreiem DMEM eine Stunde lang hungrig gelassen und anschließend mit  $^{35}\text{S}$ -Cystein (50 µCi/ml) (Amersham) 15 Std. lang in 3% dialysiertem FBS/Cystein-freiem DMEM gepulst. Die Lysate werden nach zwei Waschriten in PBS unter Verwendung eines PI/RIPA-Puffers gewonnen. Immunpräzipitationen werden 60 Minuten lang auf Eis ausgeführt, und die Komplexe werden vor dem Auf trennen mit Hilfe eines 8% SDS-PAGE, dem Trocknen und der Exposition auf einen Film, durch Bindung an Protein A-Sepharose aufgetrennt. Der monoklonale Antikörper 7.16.4 gegen die Ektodomäne von p185neu wird in US-Patent Nr. 5,677,171 beschrieben. Der monoklonale Antikörper 528 gegen die extrazellulären Domänen von EGFR und EGFR wurde von Oncogene Science erhalten. 5 µg des Antikörpers wurden für die Immunpräzipitation der Proteine aus Lysaten, die von 10-cm Platten gewonnen wurden, verwendet.

#### Quervernetzungsstudien, Immunpräzipitationen und Westerblotting

**[0164]** Gleiche Zellzahlen wurden ausplattiert und über Nacht in 10-cm Platten kultiviert. Die Zellen wurden 24 Std. in Serum-freien Medium hungrig gelassen und mit EGF (100 ng/ml bei 37°C für 10–15 min) behandelt und anschließend zweimal mit kalter Phosphat-gepufferter Salzlösung (phosphate-buffered salin, PBS) gewaschen. Zur Quervernetzung wurde anschließend PBS, enthaltend 2 mM DTSSP (3,3'-Dithiobis(sulfosuccinimidylpropionat), dazu gegeben und die Zellen wurden bei 23°C 30 Minuten lang inkubiert, wobei die Platten gelegentlich bewegt werden. Die Quervernetzungsreaktion wurde mit Puffer, enthaltend 10 mM Tris HCl, 0,9% NaCl und 0,1 M Glycin gestoppt. Die Zellen wurden anschließend zwei mal mit kaltem PBS gewaschen und in PI/RIPA Puffer gelöst. Die Zelllysate wurden einer Immunpräzipitation entweder mit dem anti-neu mAb 7.16.4, dem anti-EGFR mAb 528 oder dem anti-ΔEGFR mAb Δ124 unterzogen. Die Immunkomplexe der neu Proteine oder EGFR-Proteine wurden anschließend löslich gemacht und mit Hilfe von SDS-PAGE Gelen (6–8%) aufgetrennt, und auf Nitrozellulose übertragen, bevor sie entweder mit dem polyklonalen anti-EGFR Antikörper Ab-4 (Oncogene Science) oder dem anti-Phosphotyrosin mAb PY-20 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.) immungeblottet wurden.

#### In vitro Kinase-Assay

**[0165]** Die Zellen wurden in 100 mm Kulturplatten ausplattiert und am nächsten Tag zweimal in eiskaltem PBS gewaschen und in 1 ml Lysepuffer (50 mM Hepes, pH 7,5, 150 mM NaCl, 3% Brij-35, 2 mM EDTA, 0,02 mg/ml Aprotinin, 10% Glycerin, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) lysiert. Die Zelllysate wurden bei 20000 g 15 Minuten lang zentrifugiert. Die Proteinkonzentrationen der Zelllysate wurden mit Hilfe des Dc Protein-Assays (Bio-Rad) gemessen. 40 Mikroliter der 50% (vol/vol) Protein A-Sepharose wurden verwendet, um die Immunkomplexe zu sammeln, welche anschließend dreimal mit Waschpuffer gewaschen wurden (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1% Brij-35, 2 mM EDTA, 0,01 mg/ml Aprotinin, 0,03 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). Die Pellets wurden in 20 Mikrolitern 20 mM HEPES (pH 7,4, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,1% Brij-35, 0,03 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0,02 mg/ml Aprotinin), enthaltend 5 uCi  $^{32}\text{P}$ -γ-ATP, suspendiert und bei Raumtemperatur 30 Minuten lang inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 × Elektrophorese-Probenpuffer, enthaltend 2 mM ATP, beendet. Nach Inkubation bei 100°C für 3 Minuten wurden die Proben anschließend mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert.

#### In vitro und in vivo Tumorigenitäts-Assays,

**[0166]** Das Zellwachstum unter Vollserum- oder reduzierten Serum-Bedingungen wurde wie folgt bestimmt:  $2 \times 10^4$  Zellen jeder Zelllinie wurden in 6-Well-Platten ausplattiert und in Vollwachstumsmedium anheften gelassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder in Vollwachstumsmedium (10%-FBS) weiter kultiviert oder in 2%-FBS Serum transferiert. Die Zellen wurden vier Tage lang wachsen gelassen und anschließend trypsinisiert und gezählt.

**[0167]** Das Adhärenz-unabhängige Wachstum wurde durch Bestimmen der Effizienz zur Kolonie-Bildung der Zellen, die in Weichagar suspendiert waren, bestimmt.  $1-3 \times 10^3$  Zellen wurden in 1 ml Toplayer (0,18% Agarose/10% FBS-DMEM) in 6 cm Kulturplatten suspendiert, die eine 3 ml, das Zellwachstum unterstützende Schicht (feeder layer) bestehend aus 0,25% Agarose in DMEM, angereichert mit 10% FBS und 20 mM Hepes (pH 7,5) enthielten. Die Kolonien ( $>0,3$  mm) wurden nach der Färbung mit p-Iodnitrotetrazolium violett (1 mg/ml) am Tag 21-28 für sämtliche Zelllinien visualisiert und gezählt. Jede Zelllinie wurde dreifach für drei verschiedene Experimente untersucht.

**[0168]** 6-8 Wochen alte NCr homozygote Nacktmäuse wurden von dem National Cancer Institute erworben. Die Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden in 0,1 ml PBS suspendiert und intradermal in das mediane Dorsum eines jeden Tieres injiziert. Elterliche U87MG Zellen wurden in die eine Seite der einzelnen Tiere injiziert, und stabil transfizierte Zelllinien wurden in die gegenüberliegende Seite injiziert, um einen direkten Vergleich des Wachstums innerhalb eines jeden Tieres anzustellen. PBS allein wurde als zusätzliche Kontrolle ebenfalls in jedes Tier injiziert. Die Tiere wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien des Committee für Tiere der Universität von Pennsylvania und den von dem Committee on Care and Use of Laboratory Animals des Institute of Laboratory Animal Resource entwickelten Richtlinien gehalten. Das Tumorwachstum wird 10-12 Wochen lang zweimal wöchentlich beobachtet. Die Tumorgröße wurde durch Messen des Tumorvolumens (Länge  $\times$  Breite  $\times$  Dicke) berechnet.

#### Antikörper

**[0169]** Der monoklonale Antikörper (mAb) 7.16.4, der mit der Ektodomäne von p185neu reagiert, wurde zuvor beschrieben. Der anti-Phosphotyrosin Antikörper mAb PY-20 wurde von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) erhalten. mAb 528 (Ab-1), der mit der extrazellulären Region von EGFR und  $\Delta$ EGFR reagiert, wurde von Oncogene Science (Uniondale, NY) erworben. mAb  $\Delta$ 124, der nur mit dem  $\Delta$ EGFR reagiert, wurde von Dr. Webster K. Cavenee, Ludwig Cancer Institute, San Diego, CA, erhalten. Der polyklonale Antikörper Ab-4, der mit EGFR reagiert und für das Immunblotting verwendet wurde, wurde von Oncogene Science (Uniondale, NY) erhalten.

### BEISPIEL 5 KONVERSION EINES RADIORESISTENTEN PHÄNOTYPS ZU EINEM SENSITIVEREN DURCH AUSSCHALTEN DER ERBB REZEPTOR-SIGNALGEBUNG IN HUMANEN KREBSZELLEN

#### Einführung

**[0170]** Die molekularen Parameter, welche bestimmen, wie eine Zelle mehr oder weniger empfindlich gegenüber DNA-Schädigung wird, die durch Bestrahlung oder chemotherapeutische Mittel induziert wird, sind kaum verstanden. Es wurde behauptet, dass der Status der Zellzyklus-Kontrollpunkt Signalgebungswege eine wichtige Determinante für die Antwort auf eine DNA-Schädigung ist, und Mutationen in Kontrollpunkt-Komponenten in humanen Krebsarten weit verbreitet sind. Ein kürzlich eingeführtes Paradigma schlägt vor, dass Tumorzellen in Antwort auf zytotoxische Therapien abhängig von dem funktionellen Zustand der Kontrollpunkt-Wege einen Wachstumsstop oder Apoptose zeigen und dass die durch Bestrahlung induzierte Apoptose aus zerstörten Wachstumsstop-Stoffwechselwegen resultieren. In ähnlicher Weise erhöht der unvollständige Mechanismus der DNA-Reparatur, der während der Verzögerung der Kontrollpunkt-Phase auftritt, in anderen Systemen, die nicht-transformierte Zellen verwenden, die Tendenz zur Apoptose.

**[0171]** Humane Glioblastome zeigen zahlreiche genetische Veränderungen, einschließlich der Amplifikation und/oder Mutation des Genes, das für den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) kodiert, was in einigen Fällen zu der Expression einer konstitutiv aktiven EGF-Rezeptor-Kinase führt.

**[0172]** Die Expression eines trans-Rezeptor-Inhibitors von EGFR, der von der Ektodomäne des p185neu Onkogens abgeleitet ist (T691stop neu), bildet Heterodimere sowohl mit dem vollständig langen EGFR als auch mit einer konstitutiv aktivierte extrazellulär-deletierten mutierten EGF-Form ( $\Delta$ EGFR), die häufig in humanen glialen Tumoren beobachtet wird, insbesondere solchen mit höhergradiger Pathologie. Das Zellwachstum und die Transformation von EGFR-positiven oder EGFR/ $\Delta$ EGFR-koexprimierenden humanen Gliomzellen wird durch Kinase-defiziente Deletionsmutanten p185neu inhibiert. Der an der Oberfläche lokalisierte T691stop neu mutatierte/EGFR heterodimere Rezeptor-Komplex zeigt eine verringerte Affinität für den EGF-Liganden, beeinträchtigte Internalisierungskinetiken, einen reduzierten Phosphotyrosingehalt und eine verringerte enzymatische Kinase-Aktivität im Vergleich zu vollständig langem EGFR und EGFR homodimeren Komplexen.

**[0173]** Die spezifischen Stoffwechselwege, welche die onkogene Transformation in EGFR-positiven transformierten humanen Zellen vermitteln, sind noch nicht vollständig charakterisiert. Natürlich vorkommende ΔEGFR Onkoproteine könnten die konstitutive Aktivität eines Grb2/Shc/Ras Stoffwechselweges und die Signalgebung über Phosphatidyl-Inositol-3 (PI-3) Kinassen erhöhen, vermutlich durch Binden bestimmter Adapter-Proteine. Bestimmte Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinassen, wie z.B. solche der Familie der c-jun-aminoterminalen Kinassen (JNK), könnten durch Liganden-unabhängige onkogene ΔEGF Rezeptoren konstitutiv aktiviert werden. Obwohl festgestellt wurde, dass holo-EGFRs nur in einer Liganden-abhängigen Weise bei hohen Expressionsmengen des Rezeptors in Fibroblasten schwach-transformierend sind, weisen viele humane Tumoren erhöhte Mengen an EGFR auf und dies könnte zu einer nicht-regulierten Kinase-Aktivität in transformierten Zellen beitragen.

**[0174]** Es wurden Experimente entwickelt, um zu untersuchen, ob die spezifische Inhibition der Signalgebung durch das überexprimierte EGFR in radioresistenten humanen Gliomzellen die physiologische Antwort dieser Zellen gegenüber der Induktion eines Genomschadens verändern würde. Eine Gamma-Bestrahlung in Kombination mit einer erbB Rezeptor-Inhibition führte zu einem höheren Grad an Bestrahlungs-induziertem Wachstumsstop und Apoptose in Zellen, die normalerweise resistent gegenüber ionisierender Strahlung sind. Eine verstärkte Apoptose trat in transformierten humanen Gliomzellen auf, die entweder ein Wildtyp oder ein mutiertes p53 Protein enthalten und legt nahe, dass sowohl p53-abhängige als auch p53-unabhängige Mechanismen dieses physiologische Resultat vermitteln. Stoffwechselwege, die entfernt von der spezifischen inhibitorischen Interaktion zwischen dem T691stop mutierten neu Protein und dem EGF-Rezeptor liegen, bestimmen die Tumor-Ansprechempfindlichkeit gegenüber genomischem Schaden, und diese Stoffwechselwege können durch proximale Rezeptor-Assoziationen moduliert werden. Spezifische inhibitorische Stoffwechselwege, die auf der Ebene der Zellmembran eingeleitet werden und mit dem Wachstumsarrest und/oder der Apoptose assoziiert sind, können nachfolgende Kontrollpunkt-Ergebnisse in Antwort auf eine DNA-Schädigung modulieren. Diese Ergebnisse haben eine Auswirkung auf die Entwicklung von Rezeptor-spezifischen Agenzien, die fähig sind, Zellen gegenüber zytotoxischen Therapien zu sensibilisieren und legen nahe, dass eine erbB Rezeptor-spezifische Inhibition in Kombination mit zytotoxischen Behandlungen die Antwort auf Antikrebsmittel verbessern könnte.

#### Material und Methoden

##### Vektor-Konstruktion

**[0175]** Die Derivatisierung des T691stop neu mutierten Rezeptor-Konstruktes wird oben genauer beschrieben.

##### Kultivieren der Zellen und Entwicklung stabil transfizierter Zelllinien

**[0176]** Die U87/MG humane Glioblastom-Zelllinie wurde von Dr. Webster Cavenee (Ludwig Cancer Institute, San Diego, California) erhalten. U373MG humane Gliomzellen, die ursprünglich aus einem humanen anaplastischen Astrozytom isoliert wurden, wurden von der American Type Tissue Collection (ATCC) (Rockville, MD) erhalten.

##### Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklus-Verteilung

**[0177]** Für die Durchfluss-Zytometrie wurden Zellen durch die Behandlung der Reihe nach mit 0,003% Trypsinlösung, gefolgt von 0,05% Trypsininhibitor, 0,01% RNase A Lösung und anschließend 0,0416% Propidium-iodid (PI) und 5 mM Spermintetrachloridlösung, gefärbt. Jede Behandlung wurde 10 Minuten lang bei fortlaufendem Schütteln bei Raumtemperatur durchgeführt. Sämtliche Reagenzien wurden von Sigma bestellt. Die Zellzyklus-Analyse wurde innerhalb von 2 Stunden nach der Färbung in einem Becton-Dickinson FACScan Durchfluss-Zytometer durchgeführt. Zehntausend Ereignisse wurden für jede Probe gesammelt, und die Daten wurden unter Verwendung des ModFIT-Zellzyklus-Analyseprogramms (Becton-Dickinson, Version 2,0) analysiert.

##### Färbung der Nuklei und morphologische Analyse der Apoptose

**[0178]** Die Zellen wurden vor der Bestrahlung für wenigstens 12 Stunden auf Deckgläser ausplattiert. Die Bestrahlung wurde unter Bedingungen durchgeführt, die mit denen des Kolonie-Bildungs-Assays (Colony Formation Assay) übereinstimmen. Die Deckgläser wurden anschließend zweimal mit PBS zu den angegebenen Zeitpunkten gewaschen und in einer 50:50 Mischung aus eiskaltem Methanol/Aceton zehn Minuten lang fixiert.

Die Deckgläser wurden anschließend mit 4'6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochloridhydrat (DAPI) (Sigma, St. Louis, MO) mit einer Konzentration von 0,1 µg/ml in PBS gefärbt. Eine Übereinstimmung zwischen einzelnen Beobachtern bei der Apoptosezählung wurde mit Hilfe einer TdT-vermittelten dUTP nick end labeling (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)-Färbung sowie von drei unabhängigen Beobachtern bestätigt.

**[0179]** Die Zellzählungen wurden innerhalb von 30 Minuten nach der Färbung durchgeführt, und Photografien wurden auf einem Zeiss Axioplan Epifluoreszenz-Mikroskop aufgenommen. Wenigstens drei unabhängige Felder mit 100 Zellen wurden für jede Probe gezählt.

#### Kolonie-Bildungs-Assay

**[0180]** Das Zellüberleben nach der Bestrahlung wurde mit Hilfe des Kolonie-Bildungs-Assays bestimmt. Die Anzahl der auszuplattierenden Zellen wurde so berechnet, dass sie 20 bis 200 Kolonien pro Platte bei jeder Bestrahlungsdosis bilden und in 10 cm Kulturplatten ausplattiert (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Die Zellen wurden unter Verwendung eines J.L. Shepherd Modell 30 Mark I Cäsium-137 Strahlers, der 12,8 Gy/min liefert, bestrahlt, wobei sich die Zellen auf einer rotierenden Plattform befanden, um eine einheitliche Bestrahlung sicherzustellen. Die Zellen wurden nach der Bestrahlung 7–10 Tage lang bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend mit Kristallviolett gefärbt. Kolonien, die mehr als 50 Zellen enthielten, wurden unter einem Präparationsmikroskop ausgezählt. Die Überlebensfraktion ist das Verhältnis der Anzahl von gebildeten Kolonien zur Anzahl von ausplattierten Zellen und wurde entsprechend der Ausplattierungseffizienz korrigiert. Wenigstens drei verschiedene Zellkonzentrationen wurden für jede Bestrahlungsdosis verwendet.

#### Westernblotting

**[0181]** Für jeden Zeitpunkt wurden 10<sup>5</sup> Zellen pro 6 cm Platte durch Lyse in 400 µl Probenpuffer (10% Glycerin, 2% SDS, 100 mM DTT, 50 mM Tris, pH 6,8) geerntet. 30 µl jedes Lysates wurden pro Spur geladen und mit Hilfe einer Elektrophorese auf einem 15% SDS-Polyacrylamidgel vor dem Übernachtrtransfer auf einer Nitrocellulose-Membran (Bio-Rad, Hercules, CA) aufgetrennt. Die Membranen wurden mit einem Maus anti-humanen p53 monoklonalen Antikörper (NeoMarkers, Fremont, CA.) getestet, gefolgt von einem Ziege anti-Maus sekundären Antikörper, der an Meerrettichperoxidase gekoppelt ist (Amersham, Arlington Heights, IL). Um die Hintergrund-Antikörperbindung zu reduzieren, wurde die Inkubation mit dem sekundären Antikörper in 2,5% Milchpulver in PBS durchgeführt. Der Nachweis wurde mit Hilfe der Chemilumineszenz (ECL, Amersham, Arlington Heights, IL.) durchgeführt. Die relativen Mengen der p53 Expression wurden durch Scannen der Blots unter Verwendung eines Scanning-Densitometers (Molecular Dynamics) bestimmt.

#### Antikörper

**[0182]** Der monoklonale Antikörper 7.16.4, der gegen die p185neu Ektodomäne gerichtet ist, wird oben beschrieben. Anti-ERK und anti-JNK Antikörper wurden von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA.) erhalten. Polyklonale Antikörper, die mit p53 und p21 reagieren, wurden von NeoMarkers (Fremont, CA.) erhalten. Antikörper, die mit bcl-2, bax und bcl-x<sub>L</sub> reagieren, wurden von Oncogene Science (Uniondale, N.Y.) erhalten.

#### Ergebnisse

##### Zellzyklusverteilung der sich im Zellzyklus befindlichen humanen Glioblastomzellen, die mit Gammastrahlung behandelt wurden: Auswirkungen der Zerstörung der erbB Signalgebung auf den Wachstumsstop

**[0183]** Sowohl bei U87MG Zellen als auch bei U87/T691 Zellen führte ein verlängerter Serumzug allein (72–100 Std.) zu einer erhöhten Akkumulation von Zellen in G0/G1, mit bescheidenen Verringerungen sowohl in der S- als auch der G2/M-Population. Die U87/T691 Zellen zeigten eine höhere G0/G1 Fraktion als die elterlichen U87MG Zellen sowohl bei der Präsenz von Serum oder nach einem längeren Serum-Entzug, was darauf hinweist, dass der relativ verstärkte Wachstumsstop, der durch Expression des T691stop neu mutierten Rezeptors induziert wurde, nicht durch Wachstum in Vollserum überwunden wurde.

**[0184]** Die Induktion des Wachstumsstops durch Exposition von asynchron sich im Zellzyklus befindlichen transformierten humanen Gliazellpopulationen gegenüber Gammabestrahlung war höher als die durch verlängerten Serumzug allein. Sowohl in U87MG Zellen als auch in U87/T691 Zellen verursachte die Bestrahlung von Zellen, die unter Vollserum-Wachstumsbedingungen wachsen gelassen wurden, starke Zunahmen in G0/G1 und G2/M und eine Abnahme in dem prozentualen Anteil von Zellen in der S-Phase, wie mit Hilfe der

durchflusszytometrischen Färbung des DNA-Gehalts bestimmt wurde ([Fig. 1B](#) und [Fig. 1D](#)). Die Verringerung der S-Phasen-Fraktion und die Akkumulation von Zellen in G2 ist charakteristisch für Zellen, die einen DNA-Schaden erleiden. Die Daten in den [Fig. 1A](#), [Fig. 1B](#), [Fig. 1C](#) und [Fig. 1D](#) zeigen ein repräsentatives Experiment von Zellen, die 72 Stunden nach der Gamma-Bestrahlung analysiert wurden. Frühere Zeitpunkte zeigen ähnliche Trends, jedoch wurde die Analyse 72 Stunden nach der Bestrahlung als mit nachfolgenden Experimenten übereinstimmend ausgewählt. Eine Analyse von drei unabhängigen Experimenten zeigte die folgenden Änderungen in der Zellzyklus-Verteilung (durchschnittliche Prozentzahl der Zellen  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM);  $\pm$  Bestrahlungsbehandlung [radiation treatment, RT]):

1. U87MG Elternzellen:

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

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

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

2. U87/T691 Zellen:

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  $12,5 \pm 3,5$ .

**[0185]** U87/T691 Zellen zeigten mit oder ohne Bestrahlungsbehandlung eine höhere G0/G1-Fraktion und reduzierte S- und G2/M-Populationen im Vergleich zu elterlichen Glioblastomzellen, wenn sie asynchron in Kultur wachsen gelassen wurden, und der stärkste Unterschied trat in der G0/G1 Population auf. Die Strahlungs-induzierten Zunahmen der G2/M-Fraktion wurden sowohl in U87MG Zellen als auch in U87/T691 Zellen beobachtet, jedoch zu einem höheren Grad in elterlichen U87MG Zellen. Die Kombination von Serumentzug und Strahlungsbehandlung in diesen Zellpopulationen verhielt sich nicht additiv und veränderte die Zellzyklus-Verteilung in der Zelllinie nicht merklich im Vergleich zu der mit Bestrahlungsbehandlung. Folglich scheint die Zerstörung der EGFR-vermittelten Signalgebung einen Wachstumsstop durch einen Mechanismus zu induzieren, der sich von dem bei verlängertem Serumentzug beobachteten unterscheidet.

Die Trans-Rezeptor-Inhibition sensibilisiert humane Glioblastomzellen gegenüber Bestrahlungs-induzierter Apoptose

**[0186]** Von humanen Glioblastomzellen wurde gezeigt, dass sie sowohl experimentell als auch klinisch besonders resistent gegenüber der Behandlung mit Bestrahlung sind. Die EGFR-Überexpression und/oder Mutation wurde mit besonders aggressiven humanen glialen Tumoren in Zusammenhang gebracht, und es wurde vorgeschlagen, dass die Onkogenität auf die reduzierte Apoptose in vitro und in vivo zurückgeht. Ob die Inhibition der EGFR-vermittelten Signalgebung in humanen Glioblastomzellen durch den T691stop neu mutierten Rezeptor die Zellen gegenüber dem apoptotischen Zelltod sensibilisieren könnte, wurde untersucht.

**[0187]** Bei verlängertem Serumentzug wurde nur 0–1% Apoptose in U87MG Elternzellen mit Hilfe der 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Färbung oder der TUNEL-Färbung beobachtet, was weniger war als das, was in anderen Studien beobachtet wurde. Die von U87MG abgeleiteten Zellen zeigten in durchflusszytometrischen Analysen nach der Färbung mit PI unter Bedingungen, welche Apoptose verursachen, keinen Sub-G0 Peak was mit den Beobachtungen anderer übereinstimmt. Die Expression des T691stop neu Inhibitors in U87MG Zellen führte nur zu 0–2% Apoptose bei verlängertem Serumentzug, wie mit Hilfe des immunhistochemischen Nachweises apoptotischer Nuklei mit DAPI bestimmt wurde.

**[0188]** Die Apoptose war in wiederholten Studien bei 72 Stunden maximal, und dieser Zeitpunkt wurde für alle zusätzlichen Experimente ausgewählt. Die Expression des T691stop neu Proteins in dem U87MG Zell-Hintergrund erhöhte den Grad an Bestrahlungs-induzierter Apoptose auf  $23 \pm 7,9\%$  (Durchschmitt  $\pm$  SEM) bei 72 Std. in vier unabhängigen Experimenten in Vollwachstumsmedium ([Fig. 2A](#)). Der verlängerte Serumentzug, kombiniert mit Bestrahlung führte zu  $33 \pm 10,6\%$  Apoptose in U87/T691 Zellen und zu  $11 \pm 1,5\%$  Apoptose in elterlichen U87MG Zellen, einer vergleichbaren Zunahme in beiden Populationen gegenüber der, die bei Bestrahlung der Zellen im Vollwachstumsmedium beobachtet wurde. Es wurden Experimente einschließlich morpho-

logischer Bestimmungen der Apoptose in humanen Gliomzellen nach der Gammabestrahlung durchgeführt. Alle Zellen wurden 72 Stunden nach der Exposition gegenüber Gamma-Bestrahlung mit DAPI gefärbt. Nuklei, welche eine apoptotische Morphologie zeigten, wurden beobachtet. Die morphologischen Veränderungen des nukleären Blebbing und der Fragmentierung, die kennzeichnend für die Apoptose sind, wurden durch immunhistochemische Analyse der von U87MG abgeleiteten kultivierten Zellen, die mit DAPI gefärbt wurden, gezeigt. Die apoptotischen Indizien stellen eine Unterrepräsentation des gesamten Zelltodes nach der Bestrahlung in U87/T691 Zellen dar, da wir unfähig waren, treibende Zellen immunhistochemisch zu untersuchen.

Klonogenes Überleben bestrahlter humaner Glioblastomzellen.

**[0189]** Wir bestimmten die Anzahl von Zellen, die dem Wachstumsstop oder dem Tod entkommen und fähig sind, weiterhin eine Kolonie zu bilden, ein Assay, welches häufig verwendet wird, um die Radiosensitivität zu bestimmen. In bestimmten Fällen konnten klonogene Wachstums-Assays nicht mit der Sensitivität gegenüber Bestrahlung oder Chemotherapie korreliert werden, vermutlich da das Schicksal der toten oder stabil arretierten Zellen in diesem Assay nicht bestimmt wird. Wie in [Fig. 3](#) gezeigt, zeigten U87/T691 Zellen über einen Bereich von Bestrahlungskonzentrationen (2–10 Gy) eine erhöhte Sensitivität gegenüber Bestrahlung. U87/T691 Zellen waren etwa eine halbe Logarithmusstufe sensitiver gegenüber Bestrahlung als ihre nicht-transfizierten elterlichen Gegenstücke bei sämtlichen getesteten Bestrahlungsdosen. Diese Ergebnisse wurden mit zusätzlichen T691stop neu-exprimierenden Subklonen bestätigt. U87MG Zellen und ihre Derivate enthalten Wildtyp p53 und p21 Proteine.

Zusammenhang zwischen der Bestrahlungssensitivität humaner Glioblastomzellen und dem p53 Status

**[0190]** Es wurde gezeigt, dass der p53-Status die Antwort gegenüber ionisierender Strahlung in einer Anzahl von transformierten oder nicht-transformierten Zellarten beeinflusst. Eine Analyse der p53 Induktion in humanen Glioblastomzellen nach der Gamma-Bestrahlung wurde durchgeführt.  $10^5$  U87MG Zellen und U87/T691 Zellen, welche ein Wildtyp p53 Gen-Produkt enthalten, wurden ausplattiert und nach der Anheftung über Nacht mit Gamma-Bestrahlung bestrahlt (10 Gy). Es wurden anschließend Lysate zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung entnommen, einer SDS-PAGE unterzogen und mit einem Antikörper, der mit p53 reagiert, immunblotet. Kontrollzellen waren MCF-7 Brustkrebszellen, die immunreaktives p53-Protein enthalten. Eine stärkere Induktion des p53 Proteins 12 Stunden nach der Gamma-Bestrahlung in U87/T691 Subklonen wurde durchgehend beobachtet. Die Western-Analyse der Zelllysate, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlungsbehandlung erhalten wurden, zeigte gleichbleibende Zunahmen der p53 Proteinkonzentration, die zu sämtlichen Zeitpunkten zwischen 6–72 Std. nach der Bestrahlung sowohl in U87MG Zellen als auch ihren T691stop neutransfizierten Derivaten nachgewiesen wurden. Der Zeitpunkt Null zeigt Zellen, die mit Gamma-Strahlung bestrahlt und unverzüglich für die Analyse lysiert wurden. Die p53 Dichten waren zu diesem Zeitpunkt vergleichbar mit scheinbestrahlten, sich im Zellzyklus befindlichen Zellen. Ein 10-facher Anstieg der p53 Dichte 12 Std. nach der Bestrahlung in U87/T691 Zellen im Vergleich zu nur 1,5- bis 3-fachen Anstiegen sowohl in U87MG Zellen als auch in U87/T691 Zellen zu sämtlichen übrigen untersuchten Zeitpunkten wurde beobachtet. Dieser Trend wurde durchgängig beobachtet (vier Experimente) und wurde in U87/T691 Zellen in einigen Experimenten bereits 6 Std. nach der Bestrahlung beobachtet und legt nahe, dass die p53-abhängigen Signalgebungswege durch Zerstören des EGFR in Gegenwart genomicscher Schäden effizienter aktiviert werden könnten. Veränderungen der p53-regulierten Kontrollpunkt-Proteine wurden 12 Std. nach der Induktion des Genomschadens durch Gamma-Bestrahlung beobachtet. Die Wachstumsinhibition und Differenzierung von humanen Brustkrebszellen nach der Ligation von erbB Rezeptoren wurde mit der Aktivierung eines p53-abhängigen Stoffwechselweges in Zusammenhang gebracht.

**[0191]** P21 wurde nach der Bestrahlungsbehandlung sowohl in U87MG Zellen als auch in U87/T691 Zellen induziert, wobei die höchsten Mengen 24 Std. nach der Bestrahlungsexposition in beiden Zelllinien beobachtet wurden. Sowohl in U87MG Zellen als auch in U87/T691 Zellen war die p21 Protein-Dichte 6–24 Std. nach der Bestrahlung vergleichbar. Obwohl andere vorgeschlagen haben, dass die Hochregulierung von bcl-x<sub>L</sub> mit einer reduzierten Apoptose in humanen Gliomzellen assoziiert ist, haben wir keine Veränderungen in der bcl-x<sub>L</sub> Protein-Expression nach der Bestrahlung in U87MG Zellen oder in U87/T691 Zellen nachgewiesen. Sowohl die konstitutiven als auch die Bestrahlungsinduzierten Konzentrationen an bcl-x<sub>L</sub> waren in U87MG Zellen und U87/T691 Zellen äquivalent. Die Untersuchung der Konzentrationen an bax Protein und bcl-2 Protein förderte keine Unterschiede zwischen Glioblastomzellen und ihren inhibierten Subklonen zu Tage.

Apoptose in p53-mutierten humanen Glioblastomzellen

**[0192]** U373MG humane Gliomzellen enthalten ein mutiertes p53 Gen-Produkt, weisen eine Defizienz in der

p21 Expression auf und zeigen in der durchflusszytometrischen Analyse eine vergleichbare Erhöhung des Oberflächen-EGFR im Vergleich zu U87MG Zellen. Diese Zellen wurden verwendet, um zu bestimmen, ob die beobachtete Apoptose nach der Inhibition der EGFR-vermittelten Signalgebung und der Gamma-Bestrahlung abhängig von einem Wildtyp p53 Protein war. U373MG Zellen zeigten nach der Gamma-Bestrahlung Zunahmen der Mengen des mutierten p53 Proteins, exprimieren p21 jedoch nicht konstitutiv oder nach der Behandlung mit Bestrahlung.

**[0193]** Der T691stop neu mutierte Rezeptor wurde in U373MG Gliomzellen exprimiert und bestätigte nach der metabolischen Markierung und durchflusszytometrischen Analyse eine Expression, die vergleichbar zu U87/T691 Zellen ist, in vier U373/T691 Subklonen. Die Durchflusszytometrie zeigte, dass die Oberflächenmengen des T691stop mutierten neu Rezeptors denen in U87/T691, U373/T691 cl 1 und U373/T691 cl 12 Subklonen und zwei zusätzlichen T691stop neu-exprimierenden U373MG Derivaten war. U373MG Derivate, die den T691stop neu mutierten Rezeptor exprimieren, waren fähig zum Wachstumsstop bei geringen Serum-Konzentrationen und zeigten einen arretierten konfluenten Zellrasen ohne die Entwicklung morphologisch transformierter Foci in vitro, was darauf hindeutet, dass die p53 und p21 Wildtyp-Proteine weder für den Wachstumsstop noch für das Inhibieren der Transformation von Gliomzellen, in denen die erbB-Signalgebung zerstört war, benötigt wurden. U373/T691 cl 1 und U373/T691 cl 12 Subklone wurden anschließend zusammen mit U373MG Zellen bestrahlt und zeigten erhöhte Mengen an Apoptose im Vergleich zu ihren elterlichen Gegenstücken ([Fig. 2B](#)). In dem gezeigten repräsentativen Experiment zeigten 72 Stunden nach der Gamma-Bestrahlung zwei U373/T691 Subklone 32% bzw. 59% Apoptose, im Vergleich zu 2% Apoptose in elterlichen U373MG Zellen und einem apoptotischen Index von 20% in U87/T691 Zellen. Die Zerstörung der EGFR-Signalgebung durch Expression von T691stop neu in zwei verschiedenen humanen Gliomzelllinien, die Unterschiede in dem Status von p53 und p21 aufwiesen, führte zu einer erhöhten Strahlungs-induzierten Apoptose. Die Sensibilisierung von humanen Glioblastomzellen gegenüber genetischem Schaden kann folglich in der Gegenwart von Wildtyp p53 und p21 Proteinen auftreten. Zusammengefasst legen diese Daten nahe, dass sowohl p53-abhängige als auch p53-unabhängige Wege die Sensibilisierung gegenüber einem durch eine Kombination aus einer Trans-Rezeptor-Inhibition und einem genetischen Schaden verursachten Zelltyp vermitteln könnten. Bemerkenswerterweise scheinen humane Glioblastomzellen, in denen die EGFR-Signalgebung zerstört ist, nicht sensibler gegenüber einem durch verlängerten Serumzug oder Tumornekrose-Faktor α-vermittelten Zelltod zu sein als Elternzellen.

## Diskussion

**[0194]** Die spezifische Inhibition der EGFR-Signalgebung, welche das Zellwachstum und die Transformation inhibiert, sensibilisierte außerdem Strahlungs-resistente humane Gliomzellen gegenüber Strahlungs-induziertem genetischem Schaden. Glioblastomzellen, die einen trans-dominanten von p185neu abgeleiteten mutierten Rezeptor exprimieren, zeigten nach der Bestrahlung einen stärkeren G1-Phase-Arrest und höhere Apoptoselevel als ihre elterlichen Gegenstücke. In Säuger-Fibroblasten und in spezialisierten neuronalen Zellen kann der Entzug von Serum oder Wachstumsfaktor unter bestimmten Bedingungen zur Apoptose führen. Ein verlängerter Serumzug allein induzierte die Apoptose in humanen Glioblastomzellen in diesen Studien nicht. Ein DNA-Schaden in Kombination entweder mit der Zerstörung der erbB Rezeptor-Signalgebung oder dem Serumzug wurde benötigt, um die Apoptose zu induzieren. Apoptose wurde durch Bestrahlung in 23% der U87MG Derivate und in 32–59% der von U373MG abgeleiteten Subklone, in denen EGFR zerstört war, in Vollwachstumsmedium induziert (im Vergleich zu nur 1–2% in Elternzellen), was darauf hindeutet, dass die Inhibition der EGFR-Signalgebung durch trans-Rezeptor-Inhibition durch Wachstum in Serum nicht überwunden werden konnte. Der Serumzug in Kombination mit dem Bestrahlungsschaden erhöhte die beobachteten Apoptoselevel sowohl in elterlichen U87MG Zellen als auch in T691stop-neu-exprimierenden humanen Glioblastom-Derivaten in gleicher Weise. Bemerkenswerterweise war nach einem DNA-Schaden die durch Zerstörung der erbB Rezeptor-Signalgebung auf der Zelloberfläche beobachtete Apoptose höher als die bei Serumzug beobachtete.

**[0195]** Überwachungssysteme oder Kontrollpunkte haben sich entwickelt, um den Zellzyklus zu stoppen, wenn ein Schaden des Genoms oder der mitotischen Spindel aufgetreten ist. Der DNA-Schaden-Kontrollpunkt arbeitet in verschiedenen Stadien des Zellzyklus unterschiedlich und benötigt die koordinierte Wirkung verschiedenster pleiotroper Gen-Produkte, die an dem Wachstumsstop, der DNA-Reparatur, der transkriptionellen Aktivierung und der Apoptose beteiligt sind. DNA-Schaden-Kontrollpunkte bilden Signal-Transduktionswege, welche die Information von der beschädigten DNA zu den Zellzyklus-Komponenten übermittelt. Die in diesen Studien gezeigten Daten zeigen, dass die Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK)-vermittelten Signalgebungsereignisse die Signalgebungswege der DNA-Schaden-Kontrollpunkte beeinflussen können. Insbesondere kann die Inhibition von EGFR in malignen humanen Gliomzellen den Grad des Wachstumsarrests und der

Apoptose, die nach einem durch Röntgenstrahlen verursachten DNA-Schaden beobachtet werden, erhöhen.

**[0196]** Die Resistenz Gamma-bestrahlter Zellen wird von dem funktionellen Zustand verschiedener Onkogene beeinträchtigt. Die Expression des onkogenen Ras oder Raf verringert die Radiosensitivität in NIH3T3 Zellen, und die Expression von Ras<sup>H</sup> zusammen mit c-Onkogenen oder v-myc-Onkogenen verlieh Fibroblasten des Rattenembryo, die der Gamma-Strahlung ausgesetzt wurden, Resistenz. Es ist außerdem richtig, dass die Expression verschiedener Onkogene Zellen gegenüber der Apoptose bei Exposition gegenüber geringer Serumkonzentrationen oder Antikrebsmitteln sensibilisieren kann. Die Teilungsverzögerung, die sowohl während der G1-Phasen als auch während der G2-Phasen des Zellzyklus auftritt, wird von der Expression dominanter Onkoproteine wie z.B. N-Ras beeinflusst. Die Expression eines Wildtyp p53 Proteins wurde mit einem verringerten Überleben aufgrund der Induktion einer höheren Fraktion von Apoptose im Vergleich zu Zellen, die ein mutiertes p53 Protein enthalten, nach der Gamma-Bestrahlung in Zusammenhang gebracht. Jedoch wurde von Tumorzellen, die ein mutiertes p53 Protein enthalten und von proliferierenden lymphoiden Zellen, die aus p53-/Mäusen stammten, gezeigt, dass sie nach der Bestrahlung in die Apoptose gehen, was einen p53-unabhängigen Mechanismus des Zelltodes nach einem genetischen Schaden nahe legt.

**[0197]** Faktoren, welche den Grad des Wachstumsarrest versus der Apoptose vermitteln, der in einem bestimmten Zelltyp nach einem DNA-Schaden beobachtet wird, wurden bisher nicht definiert, und zell-spezifische Faktoren, welche den Nachweis eines DNA-Schadens, die Erholung der Zelle und die Entscheidung zur Apoptose beeinflussen, sind noch nicht vollständig verstanden. P53-abhängige Mechanismen könnten die Antwort inhibierter Gliomzellen, in einen relativen Wachstumsstop und/oder die Apoptose zu gehen, beeinflussen. Die Ergebnisse in U373MG-abgeleiteten Zellen weisen außerdem darauf hin, dass der apoptotische Zelltod, der nach einem genetischen Schaden in transformierten humanen Zellen auftritt, in denen die EGFR-Signalgebung inhibiert ist, Mechanismen umfasst, die sich von den p53 und p21 Proteinen unterscheiden. P21-/Mäuse entwickeln sich normal und scheinen keine Defekte in dem programmierten Zelltod aufzuweisen, der für die normale Organentwicklung benötigt wird, was darauf hinweist, dass p21 wahrscheinlich nicht für die Apoptose benötigt wird. P53-/Mäuse zeigen eine genetische Instabilität und enthalten erhöhte Mengen an c-myc. Diese Mäuse zeigen signifikante Apoptoselevel in vivo, was darauf hinweist, dass sowohl in normalen Geweben als auch in transformierten Zellen p53-unabhängige Mechanismen der Apoptose auftreten.

**[0198]** Interessanterweise zeigt die kürzliche Arbeit, dass die Abwesenheit von p21 in isogen übereinstimmenden kolorektalen Karzinomzellen zu einem verringerten Wachstumsstop führte, wenn dieser mit p21-positiven Derivaten derselben Zelllinie verglichen wurde, und dieses korrelierte mit einem stärker inhibierten Tumorwachstum in vivo. Diese Beobachtungen wurden der erhöhten Apoptose aufgrund von Defekten in dem von p21-vermittelten Kontrollpunkt-Wachstumsarrest zugeschrieben, obwohl die erhöhte Tendenz von p21-/Zellen zur Apoptose in dieser Arbeit nicht direkt gezeigt wurde. Es wurde vorgeschlagen, dass bei der Antikrebs-Therapie in vivo die Induktion der Apoptose dem Wachstumsstop vorzuziehen sei. In unseren Studien gab es, im Gegensatz zu denen von Waldmann et al. (1997) einen Zusammenhang zwischen der Apoptose, dem erhöhten Wachstumsstop und der Verringerung des klonogenen Überlebens nach der Bestrahlung.

**[0199]** Unter bestimmten Umständen, insbesondere in Krebszellen, kann die Apoptose nach dem Auftreten eines genetischen Schadens begünstigt sein, wenn Defekte in dem Weg, welcher den Wachstumsstop vermittelt, vorhanden sind. Darüber hinaus kann die Apoptose in Zellen nach bestimmten Signalen wie z. B. der Bestrahlung induziert werden, vermutlich durch Aktivieren bestimmter Stoffwechselwege, sogar wenn die Zellen fähig sind, sowohl in den Wachstumsstop als auch in die Apoptose zu gehen, wie es der Fall für p21-defizierte U373MG humane Zellen ist, in denen die EGFR-Signalgebung zerstört ist. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die relativen Anteile des Wachstumsstop oder der Apoptose, die durch einen genetischen Schaden induziert werden, sowohl durch die Integrität spezifischer Kontrollpunkte als auch durch Veränderungen in erbB-Signalgebungswege beeinflusst werden. Bemerkenswerterweise kann die Modulierung der RTK-Signalgebungswege die Resultate des Kontrollpunktes nach der DNA-Schädigung in transformierten Zellen beeinflussen. Andere haben gezeigt, dass die Aktivierung der erbB-Signalgebungswege in Brustkrebszellen zu einer Strahlungsresistenz beiträgt, was nahe legt, dass die Signalgebungswege der erbB Familie die Antwort auf DNA-Schädigung in vielen Tumortypen beeinflusst. Durch Kombinieren der biologischen Inhibition der Signalgebung mit Mitteln, die in der Lage sind, die Rezeptor-Onkoproteine der Tyrosinkinase-Familie spezifisch zu inhibieren, könnten wir in der Lage sein, die Kinetiken der Tumorzell-Antwort auf Standard-zytotoxische Mittel zu beeinflussen. Die Wahl des richtigen Zeitpunkts für die Verabreichung zytotoxischer Therapien kann in solchen Kombinations-Therapien optimiert werden, und diese Daten legen nahe, dass bestimmte Antitumor-Wirkungen der zur Zeit verfügbaren Antikrebs-Behandlungs-Schemata verbessert werden könnten, sogar bei der Behandlung von fortgeschrittenen humanen Malignitäten, die Veränderungen in mehreren Signaltransduktionswegen von Kontrollpunkten enthalten.

## BEISPIEL 6: REKOMBINANTER ADENOVIRUS

**[0200]** Rekombinante Adenoviren gemäß einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden durch Deletieren von E1a und E1b zerstört, welche normalerweise für die Aktivierung der Expression anderer viralen Gene benötigt werden. Diese rekombinanten Adenoviren, die auf dem humanen Ad5 basieren, sind fähig, Gene sehr effizient in humane Hepatozyten ohne offensichtliche zytopathische Effekte oder die Expression adenoviraler Proteine zu transduzieren. Die Herstellung der rekombinanten Adenoviren, welche für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung angepasst werden kann, wird in Kozarsky et al. 1993 Somatic Cell and Molecular Genetics 19(5):449–458, beschrieben, welche hierin durch Referenz eingeschlossen wird. Die Referenz beschreibt einen rekombinanten Adenovires mit einem lacZ Insert. Das lacZ Insert kann durch Sequenzen ersetzt werden, die für Tyrosinkinase-defiziente, erbB-dimerisierende Proteine gemäß der Erfindung kodieren. Das Gen-Konstrukt der Erfindung wird in eine Linker-Sequenz anstelle des lacZ Inserts insertiert.

## Material und Methoden

**[0201]** Rekombinante Adenoviren. Die zur Erzeugung der rekombinanten, E1-deletierten Adenoviren Ad.CBlacZ und Ad.CBhLDLR verwendeten Plasmide wurden wie folgt konstruiert. Das Plasmid CMV $\beta$ AlacZ (10) wurde mit SnaB1 und Nhe1 verdaut, und gag $\beta$ AhLDLR (16) wurde mit Nhe1 verdaut und anschließend teilweise mit Xho1 verdaut, um Fragmente zu isolieren, welche den  $\beta$ -Actin Promotor und entweder die cDNA für das lacZ Gen oder den humanen LDL-Rezeptor enthielten. In diesen Fragmenten wurden mit Hilfe von Klenow stumpfe Enden hergestellt. Das Plasmid pAdCMV-lacZ (17) wurde mit SnaB1 und Not1 verdaut, um den CMV-Promotor und das lacZ Gen zu entfernen (wobei der CMV Enhancer beibehalten wurde), stumpfe Enden wurden mit Klenow hergestellt und das Plasmid wurde mit Inserts ligiert, die den  $\beta$ -Actin-Promotor entweder fusioniert an das lacZ- oder das LDLR-Gen enthielten. Die resultierenden Vektoren wurden pAdCBlacZ bzw. pAd-CBhLDLR getauft.

**[0202]** Die Plasmide wurden mit Nhe1 linearisiert und mit Wildtyp adenoviraler DNA (Stamm sub 360 (18), der eine partielle E3 Deletion enthält), die mit Xba1 und Cla1 verdaut wurde, um die 5'ITR zu entfernen, in 293 Zellen kotransfiziert. Rekombinante Adenoviren wurden nach der Transfektion (19) isoliert, zwei Runden einer Plaque-Reinigung unterzogen, und die Lysate wurden durch Cäsium-Chlorid-Zentrifugation (20) gereinigt. Die Titer der viralen Stämme wurden durch einen Plaque-Test mit limitierender Verdünnung auf 293 Zellen bewertet und nach der vierfachen Verdünnung mit 10 mM TrisCl, pH 8.1, 100 mM NaCl, 0,1% bovines Serum Albumin und 50% Glycerin bei 20°C gelagert. Die Titer der Glycerin Stammlösungen betrugen: Ad.CBlacZ,  $2,4 \times 10^9$  Plaque-bildender Einheiten (plaque-forming units, PFU)/ml; Ad, CvhLDLR,  $4 \times 10^9$  PFU/ml; Wildtyp Ad,  $8 \times 10^9$  PFU/ml.

**[0203]** Die Gen-Konstrukte gemäß der Erfindung werden anstelle der lacZ-Sequenzen in eine Linker-Sequenz in das Plasmid insertiert.

## BEISPIEL 7: REKOMBINANTER ADENOVIRUS

**[0204]** Die rekombinanten Adenoviren gemäß einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind durch Deletieren der E1 und E4 Gene zerstört, welche normalerweise für die Aktivierung der Expression anderer viralen Gene erforderlich sind. Diese rekombinanten Adenoviren, die auf den humanen Ad5 zurückgehen, sind in der Lage, Gene sehr effizient in humane Hepatozyten ohne offensichtliche zytopathische Wirkungen oder die Expression adenoviraler Proteine zu transduzieren. Die Konstruktion der rekombinanten Adenoviren, welche für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung angepasst werden kann, wird in WO96/395... beschrieben. Diese Referenz beschreibt einen rekombinanten Adenovires mit einem lacZ Insert. Das lacZ Insert kann durch Sequenzen ersetzt werden, die für Tyrosinkinase-defiziente, mit erbB-dimerisierende Proteine gemäß der vorliegenden Erfindung ersetzt werden. Das Gen-Konstrukt gemäß der Erfindung wird in eine Linker-Sequenz an die Stelle des lacZ Inserts insertiert.

**[0205]** [Fig. 4](#) ist eine schematische Karte des rekombinanten Adenovirus H5.001 CBLacZ, wobei die Stellen für Restriktionsendonuklease-Enzyme angegeben sind. Der gestreifte Balken stellt das CBLacZ Minigen dar; der schwarze Balken repräsentiert das Ad5 virale Rückgrat, der schräg gestreifte Balken repräsentiert die Ad E4 Deletion.

**[0206]** Neuartige Verpackungszelllinien ermöglichen die Herstellung rekombinanter Adenoviren, die funktional sowohl in den E1 als auch in den E4 Genen deletiert sind.

**[0207]** Die frühe Region 4 (E4) des Adenovires Serotyp 5 besteht aus 7 offenen Leserahmen (open reading frames, ORFs), von denen angenommen wird, dass sie an der virale DNA-Replikation, dem Wirtszell shut-off und der späten mRNA-Akkumulation beteiligt sind. Um rekombinante Adenoviren (Ad) zu erzeugen, die eine Deletion in E4 aufweisen, muss die Funktion der E4 Region dem rekombinanten Virus durch einen Helfervirus oder eine Verpackungszelllinie zur Verfügung gestellt werden.

**[0208]** Um dieses Problem zu vermeiden, enthält die Verpackungszelllinie das Ad5 E1 Gen und nur den ORF6 des Ad5 E4 Gens. Der ORF6 von E4 allein kann die Erfordernisse von E4 in dem viralen Lebenszyklus zur Verfügung stellen. Der ORF6 steht weiterhin bevorzugterweise unter der transkriptionellen Kontrolle eines induzierbaren Promotors, wie z.B. dem Metallothionin-Promotor des Schafs, der durch Zink induzierbar ist, oder dem Maus-Brusttumormavirus (mouse mammary tumor virus, MMTV)-Promotor, der mit einem Glucocorticoid, insbesondere Dexamethason induzierbar ist.

**[0209]** Nachdem der gewünschte Shuttle-Vektor, der die adenoviralen Sequenzen enthält, in die Zelllinie transfiziert wurde, kann die Expression des E4 ORF6 durch den geeigneten Induktor induziert werden.

**[0210]** In einer bevorzugten Form ist die Verpackungszelllinie eine humane embryonale Nierenzelllinie (HEK), die 293 E1 exprimiert, in welche die E4 ORF 6 Sequenz unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors eingeführt wird. Der MMTV Promotor mit seinem Glucocorticoid-Induktor wird vorliegend bevorzugt, da der Zinksulfat-Induktor des MT Promotors selbst toxisch für die Zellen sein kann.

**[0211]** Eine spezifische Lehre zur Konstruktion der Verpackungszelllinien, die nur den ORF 6 der Ad5 E4 Region oder zum funktionellen Vergleich die gesamte E4 Region enthalten, ist unten dargelegt. Kurz beschrieben, wird die gesamte E4 Region und eine ORF6 Sequenz des Ad E4 Gens durch bekannte Methoden erhalten (siehe, z.B., Sambrook et al., „Molecular Cloning. A Laboratory Manual“, 2d edit., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989) und die darin zitierten Referenzen). Um die ORF6 Region zu isolieren, wurde die verankerte Polymerasekettenreaktions-Methode (anchored polymerase chain reaction) verwendet, um die ORF6 Sequenz von ihrem Startkodon bis zu ihrem Terminationskodon zu amplifizieren. Primer, die aus der publizierten Sequenz von ORF6 ausgewählt wurden, werden verwendet, um die ORF Sequenz zu amplifizieren und Restriktionsstellen an die Enden der Sequenz anzuführen. Die gesamte E4 Gen-Sequenz, einschließlich der E4 ORF6 Sequenz, ist in der Genbank-Sequenz von Ad5 publiziert (Genbank Zugangs-Nr. M73260).

**[0212]** Ein Minigen wird konstruiert, welches die ORF6 Sequenz unter die Kontrolle eines ausgewählten Promotors stellt. Das ORF6 Sequenz-Gen wird funktionell mit einer regulatorischen Komponente verbunden, auf eine Art und Weise, die dessen Transkription erlaubt. Solche Komponenten schließen konventionelle regulatorische Elemente ein, wie z.B. einen Promotor zur Kontrolle der ORF6 Expression. Ein induzierbarer Promotor war ein  $Zn^{+2}$ -induzierbarer Metallothionin (MT) Promotor des Schafs (M.G. Peterson et al., Eur. J. Biochem., 174: 417–424 (1988)). Der zweite Promotor ist der Dexamethasoninduzierbare Maus-Brusttumormavirus (MMTV)-Promotor.

**[0213]** Die in dem MMTV-ORF6 Minigen verwendete PolyA Sequenz wird von dem Terminator des Wachstumshormongens zur Verfügung gestellt sowie ein SV40 Replikationsursprung.

**[0214]** Das ORF6-enthaltende Minigen wird in ein pBR322-basiertes Shuttleplasmid subkloniert, das ein Neomycin-Resistenzgen enthält, was ein Shuttle-Vektor ergibt.

**[0215]** Die E1/E4 ORF6-exprimierenden Verpackungszelllinien sind nützlich bei der Erzeugung rekombinanter E1/E4-deletierter Adenoviren.

#### Rekombinante Adenoviren

**[0216]** Die neue E1/E4-exprimierende Zelllinie ist nützlich bei der weiteren Konstruktion von E1/E4-deletierten rekombinanten Adenoviren, die irgendein ausgewähltes Transgen enthalten. Die rekombinanten Adenoviren sind fähig, ein geeignetes Gen an Säugerzellen und Säugergewebe zu liefern. Diese rekombinanten Adenoviren weisen funktionelle Deletionen zummindest in den E1a, E1b und E4 Ad-Genregionen auf. Der Begriff „funktionell deletiert“ bedeutet, dass eine ausreichende Menge der Gen-Region entfernt oder in anderer Weise beschädigt ist, z.B. durch Mutation oder Modifikation, so dass die Gen-Region nicht länger fähig ist, die Produkte der Gen-Expression zu produzieren. Falls dies gewünscht wird, kann die gesamte Gen-Region entfernt werden.

**[0217]** In ähnlicher Weise liegen die Verfahren, die zur Selektion der viralen Sequenzen verwendet werden, die in einem Vektor, bei der Klonierung und Konstruktion des „Minigens“ und bei dessen Insertion in einen gewünschten viralen Shuttle-Vektor nützlich sind, sowie die Herstellung eines rekombinanten infektiösen Virus angesichts der hierin zur Verfügung gestellten Lehren innerhalb des Könnens auf dem Gebiet.

#### Konstruktion des Transgens, das ein „Minigen“ enthält

**[0218]** Ein Minigen ist in diesem Zusammenhang wie oben definiert, außer dass die Komponenten dieses Minigens so konstruiert sind, dass sie das Gen-Produkt in vivo exprimieren. Solche Komponenten schließen konventionelle regulatorische Elemente ein, die notwendig sind, um die Expression des Transgens in einer mit dem rekombinanten Virus transfizierten Zelle zu bewirken. Für dieses Minigen wird ein ausgewählter Promotor funktionell mit dem Transgen verbunden und zusammen mit anderen regulatorischen Elementen innerhalb der ausgewählten viralen Sequenz des rekombinanten Vektors lokalisiert. Die Selektion des Promotors ist eine Routineangelegenheit und stellt keine Beschränkung für diese Erfindung dar. Geeignete Promotoren können konstitutive Promotoren sein oder regulierte (induzierbare) Promotoren, was eine Kontrolle der Menge des Transgens, das exprimiert werden soll, ermöglichen wird. Ein gewünschter Promotor ist zum Beispiel der des Cytomegalievirus (CMV) immediate early Promotors/Enhancers (siehe, z.B., Boshart et al., Cell, 41:521–530 (1985)).

**[0219]** Ein anderer wünschenswerter Promotor schließt den Rous Sarkomvirus LTR Promotor/Enhancer ein. Noch eine andere Promotor/Enhancer-Sequenz ist der Promotor des zytoplasmatischen  $\beta$ -actins (CB) des Huhns (T.A. Kost et al., Nucl. Acids Res., 11(23):8287 (1983)). Weitere geeignete Promotoren können von den Fachleuten auf dem Gebiet ausgewählt werden.

#### Herstellung eines rekombinanten Adenovirus

**[0220]** Die in dieser Erfindung nützlichen Adenovirus-Sequenzen können die DNA-Sequenzen einer Anzahl von Adenovirus-Arten einschließen, welche in der Genbank erhältlich sind, einschließlich des Typ Ad5 (Genbank Zugangs-Nr. M73260). Die Adenovirus-Sequenzen können von jedem bekannten Adenovirus-Serotyp erhalten werden, wie z.B. den Serotypen 2, 3, 4, 7, 12 und 40 und weiterhin eine der zur Zeit 41 identifizierten humanen Arten einschließen.

**[0221]** Ähnliche Adenoviren, von denen bekannt ist, dass sie andere Tiere infizieren, können ebenfalls in den Vektor-Konstrukten dieser Erfindung verwendet werden. Es wird nicht erwartet, dass die Auswahl der Adenovirusart die folgende Erfindung limitiert. Eine Vielzahl von Adenovirus-Stämmen sind von der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, oder auf Anfrage von einer Vielzahl kommerzieller und institutioneller Quellen erhältlich. In der folgenden beispielhaften Ausführungsform wird aus praktischen Gründen ein Adenovirus Typ 5 (Ad5) verwendet.

**[0222]** Ein Adenovirus gemäß dieser Erfindung enthält eine funktionelle Deletion des adenoviralen early immediate early Gens E1a (was sich von mu 1,3 bis 4, 5 erstreckt) und des delayed early Gens E1b (was sich von mu 4,6 bis 11,2 erstreckt). In ähnlicher Weise weist der Adenovirus eine funktionelle Deletion der E4-Region (die sich von mu 92 bis 97,2 erstreckt) oder wenigstens des ORF6 der E4-Region auf.

**[0223]** Beispielhafte rekombinante Adenoviren zur Verwendung in dieser Erfindung können z.B. durch homologe Rekombination der gewünschten Fragmente von verschiedenen rekombinanten Adenoviren erhalten werden, einer Methode, die häufig verwendet wurde, um andere rekombinante Adenoviren zur Verwendung in der Gen-Therapie zu erzeugen. Der rekombinante Adenovirus H5.001CBLacZ wird durch homologe Rekombination zwischen dem viralen Rückgrat des Adenovirus dl1004 (auch H5dl1004) und der pAdCBLacZ Minigen-DNA konstruiert. H5dl1004 ist ein Ad5 Virus, in dem die Region von etwa map unit 92,1 bis map unit 98, d.h. im Wesentlichen das gesamte E4 Gen, deletiert wurde. Der dl1004 Virus wird in Bridge and Ketner, J. Virol., 632(2):631–638/Feb. 1989) beschrieben.

**[0224]** Der pAdCBLacZ Vektor ist ein cDNA Plasmid, das Ad m.u. 0–1 enthält, eine E1-Deletion, in die ein bakterielles  $\beta$ -Galaktosidase-Gen unter der Kontrolle eines  $\beta$ -Actin Promotors des Hühnchens insertiert ist, zusammen mit weiteren regulatorischen Elementen wie unten beschrieben und das von Ad m.u. 9–16 und einer Plasmid-Sequenz flankiert ist.

## Konstruktion E4 ORF6-exprimierender Plasmide

## pMTE4ORF6

**[0225]** Ein beispielhaftes Plasmid, das für die Konstruktion einer Verpackungszelllinie gemäß dieser Erfindung nützlich ist, ist pMTE4ORF6, das einen Metallthionin Promotor (MT-Promotor) des Schafs enthält, der die Transkription einer humanen E4 ORF6 Gen-Sequenz kontrolliert, einen Terminator eines Wachstumshormons (GH), einen SV40 Replikationsursprung, Plasmid-Sequenzen aus einem pBR322-basierten Plasmid einschließlich einem Neomycin-Resistenzgen, eine SV40 Polyadenylierungsstelle und ein Ampicillin-Resistenzgen.

**[0226]** Die verschiedenen funktionellen Fragmente dieses Plasmides können durch andere konventionell verwendete Sequenzen leicht ersetzt werden und sind für die Konstruktion des Plasmides nicht entscheidend.

## pMMTVE4ORF6

**[0227]** Ein weiteres exemplarisches Plasmid, das für die Konstruktion einer Verpackungszelllinie gemäß dieser Erfindung nützlich ist, ist pMMTVE4ORF6, das einen Brusttumormavirus Promotor (MMTV) enthält, der die transkriptionelle Kontrolle einer humanen E4 ORF6-Gen-Sequenz übernimmt, einen Wachstumshormon-Terminator (GH), einen SV40 Replikationsursprung, Plasmid-Sequenzen des Plasmids pBR322 einschließlich eines Neomycin-Resistenzgens und ein Ampicillin-Resistenzgen. Die verschiedenen funktionellen Fragmente dieses Plasmides können auf einfache Weise durch andere konventionelle verwendete Sequenzen ersetzt werden und sind für die Konstruktion des Plasmids nicht entscheidend.

## pLTR.E4(–) endogener E4 Promotor

**[0228]** Ein als Kontrolle für die Konstruktion einer Verpackungszelllinie gemäß dieser Erfindung verwendetes Plasmid ist pLTR.E4(–). Dieses Plasmid enthält den konstitutiven retroviralen MLV LTR und den größten Teil der Ad E4-Gen-Region, mit der Ausnahme, dass der endogene E4 Promotor und ein Teil des E4 ORF1 fehlen. Die anderen Plasmid-Sequenzen bleiben die gleichen wie oben beschrieben.

## pLTR.E4(+) endogener E4 Promoter

**[0229]** Noch ein weiteres Plasmid ist pLTR.E4, das den konstitutiven MLV LTR und den endogenen E4 Promotor sowie ein intaktes E4-Gen enthält. Die anderen Plasmid-Sequenzen bleiben die gleichen wie oben beschrieben.

## Transfektion und Selektion von Klonen

**[0230]** Jedes der oben beschriebenen Plasmide wurde mit Hilfe der Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode in die humane embryonale Nieren-Zelllinie 293 (ATCC CRL 1573) transfiziert, die das Produkt der Adenovirus E1 Gene exprimiert und auf 100 mm Platten (10 µg Plasmid/Platte) angeimpft. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und in verschiedenen Verdünnungen (1:10–1:100) für etwa 10 Tage auf 100 mm Platten angeimpft. Impfmedium enthält G418 (Geneticin, BRL) in einer Konzentration von 1 mg/ml. Resistente Kolonien, die sich entwickelten, wurden unter Verwendung der folgenden Assays selektiert und expandiert. Die vorläufige Analyse der Klone erfolgte wie folgt auf Grundlage der verstärkten Transduktionseffizienz eines rekombinanten Adeno-assoziierten Virus, AV.CMVLacZ, sowie der immunfluoreszenten Lokalisierung des Ad E1 Proteins.

## AV.CMVLacZ Transduktions-Verstärkungs-Assay

**[0231]** Die E1 und E4 Ad Gen-Produkte werden für die Funktion des rekombinanten Adenoassoziierten Virus (adeno-associated virus, AAV) benötigt. Dieses primäre Assay umfasst das Animpfen der Verpackungszelllinie aus Beispiel 1 in 96 Well-35 mm-Kulturplatten ( $2 \times 10^6$  Zellen/Vertiefung) und die Infektion dieser Zellen mit gereinigtem, Hitze-behandeltem AV.CMVLacZ mit einer MOI von 1000 Viruspartikeln/Zellen.

## Herstellung des AV.CMVLacZ

**[0232]** Ein rekombinanter AAV-Virus wird zum Zwecke dieses Experimentes mit Hilfe konventioneller gen-technologischer Verfahren hergestellt. Der rekombinante AAV wird durch Plasmid-Transfektion in Gegenwart eines Helfer-Adenovirus erzeugt (Samulski et al., J. Virol., 63:3822–3828 (1989)). Ein cis-wirkendes Plasmid pAV.CMVLacZ ist von psub201 (Samulski et al., J. Virol. 61:3096–3101 (1987)) abgeleitet und enthält ein p-Ga-laktosidase-Minigen von *E. coli* anstelle der AAV Rep und CAp Gene. Die 5' → 3'Anordnung des rekombinanten AV.CMVLacZ Genoms (4,9 kb) umfasst

- (a) die 5' AAV ITR (bp 1–173) wurde mittels PCR unter Verwendung von pAV2 (C.A. Laughlin et al., Gene, 23:65–73 (1983)) als Template erhalten;
- (b) einen CMB immediate early Enhancer/Promotor (Boshart et al., Cell, 41: 521-530 (1985));
- (c) ein SV40 Intron;
- (d) eine β-Galaktosidase cDNA von *E. Coli*;
- (e) ein SV40 Polyadenylierungssignal (ein 237 Bam HI-BclI Restriktionsfragment, enthaltend die Spaltungs/Poly-A-Signale sowohl von den frühen als auch den späten Transkriptionseinheiten; und
- (f) 3' AAV ITR, erhalten aus pAV2 als ein SnaBI-BglIII Fragment.

**[0233]** Die Rep und Cap Gene werden als trans-wirkendes Plasmid pAAV/Ad zur Verfügung gestellt.

**[0234]** Monolayer von 293 Zellen, die bis zu einer Konfluenz von 90% in 150 mm Kulturplatten gewachsen sind ( $5 \times 10^7$  Zellen/Platte) werden mit H5.CBALP mit einer MOI (multiplicity of infection, Multiplizität einer Infektion) von 10 infiziert. H5.CBALP (auch H5.010ALP genannt) ist ein rekombinanter Adenovirus, der ein Minigen der alkalischen Phosphatase anstelle der Adenovirus E1A und E1b Gen-Sequenzen enthält (map units 1–9,2 der Ad5 Sequenz der GenBank (Zugangs-Nr. M73260)). Die cDNA für die alkalische Phosphatase steht in diesem Virus unter der transkriptionellen Kontrolle eines CMV-verstärkten β-Actin-Promotors. Dieser Helfer-Virus wird in Goldman et al., Hum. Gene Ther., 6:839–851 (July, 1995); Engelhardt et al., Hum. Gene Ther., 5:1217–1229 (October, 1994) beschrieben; und den darin zitierten Referenzen.

**[0235]** Die Infektionen werden in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), angereichert mit 2% fötalem Rinderserum (fetal bovine serum, FBS) mit 20 ml Medium/150 mm Platte durchgeführt. Zwei Stunden nach der Infektion werden 50 µg Plasmid DNA (37,5 µg trans-wirkend und 12,5 µg cis-wirkend) in 2,5 ml der Transfektionsmischung zu jeder Platte dazugegeben und gleichmäßig verteilt. Die Transfektionen erfolgen auf Grundlage von Kalziumphosphat wie beschrieben (B. Cullen, Meth. Enzymol., 152:684–704 (1987)). Die Zellen werden 10–14 Stunden unter diesen Bedingungen kultiviert, und anschließend wird das Infektions-/Transfektionsmedium durch 20 ml frisches DMEM/2% FBS ersetzt. Fünfundvierzig Stunden nach der Transfektion werden die Zellen geerntet, in 10 mM Tris-Cl (pH 8,0) Puffer (0,5 ml/150 mm Platte) suspendiert und mit Hilfe von Ultraschall ein Lysat hergestellt. Das Lysat wird auf 10 mM Manganchlorid eingestellt und danach wurden bovine pankreatische Dnase I (20000 units) und Rnase (0,2 mg/ml Endkonzentration) dazugegeben, und die Reaktion wurde bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Natriumdeoxycholat wurde mit einer Endkonzentration von 1% dazugegeben und bei 37°C für weitere 10 Minuten inkubiert.

**[0236]** Das behandelte Lysat wird 10 Minuten auf Eis gekühlt, und festes CsCl wurde mit einer End-Dichte von 1,3 g/ml dazugegeben. Das Lysat wird mit 1,3 g/ml CsCl Lösung in 10 mM Tris-Cl (pH 8,0) auf ein Endvolumen von 60 ml gebracht und in drei gleiche Aliquots geteilt. Jede 20 ml Probe wird auf einen CsCl-Stufengradienten geschichtet, der aus zwei 9,0 ml Etagen mit Dichten von 1,45 g/ml und 1,60 g/ml zusammengesetzt ist.

**[0237]** Die Zentrifugation wird bei 25000 rpm in einem Beckman SW-28 Rotor für 24 Stunden bei 4°C durchgeführt.

**[0238]** Die Fraktionen, welche die Peak-Titer des funktionalen AV.CMVLacZ Virus enthalten, werden vereint und in drei aufeinanderfolgenden Runden einer Gleichgewichts-Sedimentation in CsCl unterzogen. Die Rotorauswahl schließt einen Beckman NVT-90 (80000 rpm für 4 Stunden) und SW-41 (35000 rpm für 20 Stunden) ein. Im Gleichgewichtszustand erscheint AV.CMVLacZ als eine opaleszierende Bande bei 1,40–1,41 g/ml CsCl. Die Dichten werden aus den Messungen des refraktiven Index berechnet. Der gereinigte Vektor wird durch Dialyse in 20 mM HEPES Puffer (pH 7,8), enthaltend 150 mM NaCl (HBS) gewechselt und bei –80°C in der Gegenwart von 10% Glycerin oder als flüssige Stammlösung bei –20°C in HBS/40% Glycerin eingefroren.

**[0239]** Der gereinigte Virus wird auf Kontaminationen mit dem H5.CBALP Helfer-Virus und auf den AV.CMV-LacZ Titer getestet. Der Helfer-Virus wird durch histochemische Färbung der Reporter-Aktivität der alkalischen

Phosphatase kontrolliert. Eine Probe des gereinigten Virus, die 1,0% des Endproduktes entspricht, wird zu einem wachsenden Monolayer von 293 Zellen dazugegeben, die in einer 60 mm Platte angeimpft wurden. 48 Stunden später werden die Zellen in 0,5% Glutaraldehyd/Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, in PBS gewaschen (3 × 10 Minuten) und bei 65°C für 40 Minuten inkubiert, um die endogene Aktivität der alkalischen Phosphatase zu inaktivieren. Der Monolayer wird auf Raumtemperatur abgekühlt, einmal kurz in 100 mM Tris-Cl (pH 9,5)/100 mM NaCl/5mM MgCl gespült und bei 37°C für 30 Minuten in demselben Puffer, enthaltend 0,33 mg/ml Nitroblau Tetrazoliumchlorid (NBT) und 0,165 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-4-indolylphosphat p-Toluidinsalz (BCIP) inkubiert. Die Farbentwicklung wird durch Waschen des Monolayers in 10 mM Tris-Cl (pH 8,0)/5mM EDTA gestoppt. Routinemäßig entfernt das oben beschriebene Reinigungsschema sämtlichen detektierbaren H5.CBALP Helfervirus mit der dritten Runde der Schwebedichte-Ultrazentrifugation.

**[0240]** Die AV.CMVLacZ Titer werden gemäß der Genom-Kopienzahl (Viruspartikel/ml), der Absorption bei 260 nm ( $A_{260}$  Partikel/ml) und der LacZ bildenden Einheiten (LacZ forming units, LFU/ml) gemessen. Die Konzentrationen der Viruspartikel basieren auf einem Southern-Blotting. Kurz beschrieben wird eine Probe des gereinigten AV.CMVLacZ mit einem Capsid-Verdauungspuffer (50 mM Tris-Cl, pH 8,0/1,0 mM EDTA, pH 8,0/0,5% SDS/Proteinase K 1,0 mg/ml) bei 50°C für eine Stunde behandelt, um die Virus-DNA freizusetzen. Die Reaktionen werden auf Raumtemperatur abgekühlt, Ladefarbstoffe wurden dazugegeben und über ein 1,2% Agarosegel einer Elektrophorese unterzogen. Standardmengen an ds AV.CMVLacZ Genom werden ebenfalls auf dem Gel aufgelöst.

**[0241]** Die DNAs werden auf eine Nylonmembran elektrogeblottet, mit einem  $^{32}$ P Zufallsprimermarkierten Restriktionsfragment hybridisiert, und der resultierende Blot wird auf einem Phosphor Imager 445 SI (Molecular Dynamics) gescannt. Eine Standardkurve wird aus den Duplexformen erzeugt und zur Extrapolation der Anzahl der Virusgenome in der Probe verwendet. LFU Titer werden durch Infizieren von Indikator-Zellen mit limitierenden Verdünnungen der Virus-Proben erzeugt. Die Indikatorzellen schließen HeLa und 293 ein. 24 Stunden später werden die Zellen in Glutaraldehyd fixiert, und die Zellen werden histochemisch auf Grundlage der E. coli p-Galactosidase (LacZ) Aktivität wie in J.M. Wilson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:3014–3018 (1988) beschrieben, gefärbt. Eine LFU wird als die Menge an Virus beschrieben, welche ausreichend ist, um eine visuell nachweisbare  $\beta$ -Galaktosidase-Expression in einer Zelle 24 Stunden nach der Infektion zu bewirken.

#### Induktion der ORF6 Expression

**[0242]** Die Induktion der ORF6 Expression mit 10  $\mu$ M Dexamethason oder 150  $\mu$ M Zinksulfat (für die Negativkontrolle wurde kein Induktor verwendet) wird 2 Stunden vor der Zugabe des Virus begonnen und während der gesamten Dauer des Experimentes fortgesetzt. Vierundzwanzig Stunden nach der Zugabe des Virus werden die Zellen geerntet, Lysate werden mit Hilfe von Ultraschall erzeugt und aufgrund der  $\beta$ -Galaktosidase Expression (d.h. der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität) und der Virus-DNA wie oben beschrieben analysiert. Hirt-Extrakte werden für DNA mit niedrigem Molekulargewicht aus den Zellextrakten hergestellt. Die Herstellung der Hirt-Extrakte und die anschließende Analyse mit Hilfe der Southern-Hybridisierung werden durch Verwenden konventioneller Methoden, die den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind, durchgeführt.

**[0243]** In Abwesenheit der Induktoren erzeugen die Verpackungszelllinien geringere Mengen an  $\beta$ -Galaktosidase in rAAV infizierten Zellen. Die Induktion der ORF6-Expression mit dem Induktor Dexamethason führt zu einem Begleit-Anstieg der AV.CMVLacZ Zelltransduktion zu einem Grad, der wesentlich höher als in der Eltern-Zelllinie 293 ist. Die Expression von E1 allein ist nicht ausreichend, um eine Wirkung auf den von dem Adenovirus vermittelten Anstieg der rAAV-Transduktion zu haben.

#### Immunfluoreszenz Lokalisierung des Ad5 späten Proteins (Ad 5 late protein)

**[0244]** Positive Klone aus dem Assay werden mit dem rekombinanten E4-deletierten Adenovirus H5DI1004 infiziert und unter Verwendung eines Immunfluoreszenz-Assays für die späte Gen-Expression nach einer E4 Komplementation gescreent. Der H5I1004 Virus wurde von Dr. Ketner der Johns Hopkins Universität erhalten und wird in Bridge und Ketner, J. Virol., 632(2): 631–638 (Feb. 1989) beschrieben, was hiermit durch Referenz eingeschlossen wird. Da der ORF6 von E4 die späte Ad Gen-Expression komplementiert, im speziellen die Bildung der Hexon- und Pentonfasern des Adenovirus, sind Zelllinien, die ORF6 enthalten, fähig, an einen Antikörper gegen diese Proteine zu binden.

**[0245]** Jede Zelllinie wird mit E4-deletiertem Virus H5dl1004 mit einer MOI von 0,1 infiziert. Die Zellen werden

mit Maus anti-Adenovirus FITC-markiertem monoklonalem Antikörper entweder gegen die Hexon-Fasern oder die Penton-Fasern in einer 1:10 Verdünnung (Chemicon International Inc., Temecula, CA) behandelt. Positive Klone werden durch Reaktion mit dem Antikörper identifiziert.

#### Relative Plaquebildungs-Effizienz

**[0246]** Die Zelllinien, die eine hohe Komplementationsfähigkeit zeigen, werden aufgrund ihrer relativen Plaquebildungs-Effizienz von H5dl1004 im Vergleich zu W162 Zellen (eine E4-komplementierende Vero-Zelllinie, die nicht E1 exprimiert) (Weinberg und Ketner, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80(17):5383–5386 (1983)) gescreent. RPE%, d.h. die relative Plaquebildungs-Effizienz (relative plaque efficiency), welche den Titer von H5dl1004 auf getesteten Zelllinien/den Titer von H5dl1004 auf W162 Zellen repräsentiert, wird bestimmt. Zum Beispiel beträgt die RPE von 293 Zellen 0.

**[0247]** Die mit Hilfe sämtlicher Kriterien ausgewählten positiven Zelllinien sind in Tabelle I unten dargestellt, zusammen mit den Ergebnissen der Assays.

Tabelle I

E1/E4 Doppelt-komplementierende Zelllinien					
Zelllinie	Trans-Gen	Promotor	IF/LP	AV.CMV LacZ	RPE%
293-10-3	ORF6	MT	++++	++++	246
293-39-11	ORF6	LTR	++++	+++	52
293-84-31	E4-	LTR	++++	++++	179
293-12-31	vollständiges E4	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

#### Konstruktion und Reinigung des H5.001CBLacZ

**[0248]** Das Plasmid pAd.CBLacZ wird wie im Detail in K. Kozarsky et al., Som. Cell Mol. Genet., 19(5):449–458 (1993) beschrieben konstruiert, was hiermit durch Referenz eingeschlossen wird. Dieses Plasmid enthält ein Minigen, das eine 5' flankierende Nhel Restriktionsstelle umfasst, gefolgt von einer Ad5 Sequenz m.u. 0–1, gefolgt von einer E1 Deletion, in die ein CMV Enhancer/eine β-Actin Promotor-Sequenz des Hühnchens insertiert ist (T.A. Kost et al., Nucl. Acids Res., 11(23):8287 (1983)), der die Transkription der nachfolgenden bakteriellen β-Galaktosidase kontrolliert, gefolgt von einer Poly A Sequenz und 3' flankiert durch Ad m.u. 9–16 und einer weiteren Nhel-Stelle. In dem Plasmid wird das Minigen auf beiden Seiten durch Plasmid Sequenzen flankiert, die Arzneimittel-Resistenz-Marker enthalten.

**[0249]** Das Plasmid pAd.CBLacZ wird mit Nhel linearisiert und mit Hilfe des Kalziumphosphat-Co-Transfektionsverfahrens in die neue Verpackungszelllinie mit Cla1-verdautem H5dl1004 (eine Ad5 Sequenz, von der die Region von etwa map unit 92,1 bis map unit 98 deletiert wurde, was im Wesentlichen dem gesamten E4-Gen entspricht) kcotransfiziert.

**[0250]** In der Zelllinie tritt eine homologe Rekombination zwischen diesen beiden viralen Konstrukten zwischen den Ad map units 9–16 auf, was zu einem rekombinanten Adenovirus führt, der H5.001CBLacZ genannt wurde. Dieser rekombinante Adenovirus enthält die Sequenz von etwa dem Nukleotid 1 bis etwa 4628 aus pAd.CBLacZ und die Ad5 map units 9–92,1 und 97,3 bis 100 aus H5dl1004. In diesem rekombinanten Adenovirus werden dadurch die Ad E1 und E4 Gene funktionell deletiert und substantiell strukturell deletiert.

**[0251]** Virale Plaques wurden ausgewählt und mit Hilfe des  $\beta$ -Galaktosidase Assays gescreent, und H5.001 CBLacZ wurde nach drei Runden der Plaque-Reinigung isoliert. Der gereinigte Virus wird außerdem einer Cäsium-Chlorid-Dichtezentrifugation und einer Produktion im Großmaßstab unterzogen. Für die folgenden Maus-Experimente wird der Virus nach der Säulenreinigung und der Zugabe von Glycerin mit einer Endkonzentration von 10% (v/v) verwendet. Der Virus wird bis zu seiner Verwendung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### Wachstumskinetiken des H5.001CBLacZ in Verpackungzelllinien

**[0252]** Die oben beschriebenen Zelllinien werden mit rekombinantem H5.001 CBLacZ mit einer MOI von 0,5 infiziert. Die maximale Virusausbeute wird in Tabelle II unten als LFU/ml dargestellt.

Tabelle II

Zelllinie	Virales Maximum
293-10-3	$2,8 \times 10^{10}$
293-39-11	$9,5 \times 10^8$
293-84-31	$1,1 \times 10^9$
293-12-31	$4,5 \times 10^8$
293-27-6	$2,8 \times 10^{10}$
293-27-17	$2,5 \times 10^{10}$
293-27-18	$2,9 \times 10^{10}$
293-27-28	$1,2 \times 10^{10}$

**[0253]** Beim Wachstum in 293-27-18 Zellen (E4 ORF6 Zelllinie mit MMTV Promotor, der durch Dexamethason induzierbar ist) beträgt die maximale Ausbeute dieses Virus  $2,9 \times 10^{10}$  LFU/ml. Mehrere der Zelllinien wurden zwischen 5 und 20 mal passagiert, und die virale Produktion der Passagen blieb stabil. Jedoch fiel die RPE nach wiederholten Zellpassagen.

**[0254]** Die Gen-Konstrukte gemäß der Erfindung werden anstelle der lacZ Sequenzen in eine Linker-Sequenz in das Plasmid insertiert.

#### Beispiel 8

##### Hintergrund:

**[0255]** Es wurde festgestellt, dass anti-p185<sup>neu</sup> monoklonale Antikörper (mAbs) das Wachstum von p185<sup>neu</sup>-exprimierenden Tumoren in einer Dosis-abhängigen Weise in vitro und in vivo inhibieren. Kombinationen von anti-185<sup>neu</sup> mAbs, die mit bestimmten Epitop-Domänen reagieren, zeigten einen synergistischen inhibitorischen Effekt auf neuüberexprimierende Tumoren in vivo. Diese Studien zeigten das Potential von mAbbasierteren Onkoprotein-spezifischen Therapien.

**[0256]** Die dreidimensionale Struktur von Antigen-Antikörper-Komplexen zeigt, dass die Bindungsstelle durch 6 hypervariable Komplementaritäts-bestimmende Abschnitte (complementarity determining regions, CDRs)-Schleifenstrukturen bestimmt wird (Peterson and Greene, 1994), jedoch wird die Spezifität der Interaktionen durch die CDR3-Schlaufen verliehen. Die Voraussetzung der Konformation und Struktur der CDR-Schlaufen kann durch kleine Peptide imitiert werden, wenn die Sequenz und Struktur der anti-Rezeptor Antikörper bekannt sind.

**[0257]** Die Inhibition des Zellwachstums und der Transformation kann in transformierten Gliazellen durch Modulation der Signalgebung des erbB Rezeptors erreicht werden. Jüngere Studien von uns weisen darauf hin, dass die Induktion der Apoptose einer erfolgreichen Therapie von humanen Krebsarten zugrunde liegen könnte. Strahlung-resistente humane Glioblastomzellen, in denen die erbB Rezeptor-Signalgebung durch Transfek-

tion von trunkiertem neu T691 inhibiert wurde, zeigten einen verstärkten Wachstumsstop und Apoptose in Antwort auf DNA-Beschädigung. Die Inhibition der erbB-Signalgebung ist ein starker Stimulus für die Induktion der Apoptose. Proximale Rezeptor-Interaktionen zwischen erbB Rezeptor-Mitgliedern beeinflussen folglich die Zellzyklus-Kontrollpunkt-Wege, die in Antwort auf einen DNA-Schaden aktiviert werden. Daher kann die Zerstörung des erbB Rezeptors die Antwort auf Gamma-Bestrahlung und andere zytotoxische Therapien verbessern.

**[0258]** Die Daten legen nahe, dass radioresistente humane Tumorzellen, die vollständige erbB-Signalgebungswege benötigen, durch Inhibieren des erbB-Signalgebungswege zu Strahlungs-sensitiven Zellen und bei irgendeinem DNA-Schaden zum Eintritt in den apoptotischen Weg umgewandelt werden können.

**[0259]** Anti-p185<sup>c-erbB-2</sup> mimetisches CDR4D5 wurde konstruiert und entwickelt und verwendet, um zu untersuchen, ob das von dem anti-p185<sup>c-erbB-2</sup> Ab abgeleitete mimetische CDR4D5 die Proliferation von humanen Tumorzellen inhibieren und die Apoptose nach der Gamma-Bestrahlung verstärken kann. Die durchgeführten Experimente werden unten beschrieben.

#### Material und Methoden

##### 1. Peptidomimetisches Design:

**[0260]** Von dem anti-erbB2 Antikörper 4D5 wurde gezeigt, dass er wirksam bei der Herabregulierung des erbB Rezeptors ist. Die Kristallstruktur des humanisierten Antikörpers (1FVD) ist analysiert. Die CDR3 von 4D5 wurde als Template verwendet. Mehrere Analoga zyklischer Peptide wurden erzeugt. Peptide, die verwendet werden können, schließen ein:

<b>SEQ ID NR: 1</b>	<b>FCGDGFYACYMDV-CONH<sub>2</sub></b>
<b>SEQ ID NR: 2</b>	<b>FCDGFYACYMDV-CONH<sub>2</sub></b>
<b>SEQ ID NR: 3</b>	<b>PCDPFYACYMDV-CONH<sub>2</sub></b>
<b>SEQ ID NR: 4</b>	<b>FCPDGFYACYMDV-CONH<sub>2</sub></b>
<b>SEQ ID NR: 5</b>	<b>FCDPPFYACYMDV-CONH<sub>2</sub></b>
<b>SEQ ID NR: 6</b>	<b>FCDGFYACYMDV-CONH<sub>2</sub></b>
<b>SEQ ID NR: 7</b>	<b>FCDPPFYACYMDV-CONH<sub>2</sub></b>
<b>SEQ ID NR: 8</b>	<b>FCDPPPFYACYMDV-CONH<sub>2</sub></b>
<b>SEQ ID NR: 9</b>	<b>FCGDGFYACYMDV-COOH</b>
<b>SEQ ID NR: 10</b>	<b>PCDGPFYACYMDV-COOH</b>
<b>SEQ ID NR: 11</b>	<b>FCDPPFYACYMDV-COOH</b>
<b>SEQ ID NR: 12</b>	<b>FCPDGFYACYMDV-COOH</b>
<b>SEQ ID NR: 13</b>	<b>FCDPPPFYACYMDV-COOH</b>
<b>SEQ ID NR: 14</b>	<b>FCDGPFYACYMDV-COOH</b>
<b>SEQ ID NR: 15</b>	<b>FCDPPFYACYMDV-COOH</b>
<b>SEQ ID NR: 16</b>	<b>FCDPPPFYACYMDV-COOH</b>

##### 2. Zelllinien:

**[0261]** Die folgenden humanen Tumorzelllinien, die variable Mengen an p185<sup>c-erbB-2</sup> Rezeptor exprimieren, wurden verwendet: a) U87MG (nicht nachweisbares p185<sup>c-erbB-2</sup>, b) elterliche U373MG und mit T691 transfizierte U373T691, die geringe bis mittlere Mengen an p185<sup>c-erbB-2</sup> exprimieren, c) MCF7, der mittlere Mengen an p185<sup>c-erbB-2</sup> exprimiert und SKBR3 (hohe Mengen an p185<sup>c-erbB-2</sup>).

## 3. Durchflusszytometrische Analyse der c-erbB Rezeptor-Oberflächenexpression

**[0262]** Subkonfluente Zellen wurden durch kurze Behandlung mit Trypsin (<3 min) geerntet und auf Eis gehalten. Die Zellen wurden gewaschen und in FACS-Puffer (PBS mit 0,5% BSA und 0,1% NaAzid) mit einer Konzentration von etwa  $2 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert, anschließend mit dem Primär-Reagenz (p185<sup>c-erbB-2</sup> Ab) und dem sekundären Reagenz (anti-IgG-FITC) für jeweils 30 Minuten bei 4°C inkubiert, mit zwei Waschschritten zwischen jedem Schritt. Nach der Färbung wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert und sofort analysiert. Die durchflusszytometrische Analyse wurde auf einem Becton-Dickinson FACScan durchgeführt. Positive p185<sup>c-erbB-2</sup> Zelllinien wurden aufgrund des Unterschiedes der durchschnittlichen Fluoreszenz zwischen den Zelllinien, die mit Anti-Rezeptor Antikörper gefärbt wurden und den entsprechenden Zelllinien, die mit dem sekundären Reagenz (anti-IgG-FITC) allein gefärbt wurden, bestimmt. Die Homogenität der p185<sup>c-erbB-2</sup>-positiven Klone wurde durch den Peak der positiv gefärbten Zellpopulation um dessen Achse herum bestimmt. Auf FACS Histogrammen wird eine erhöhte Oberflächenrezeptor-Expression korreliert mit dem Grad des Shifts. Die relativen Rezeptor-Zahlen auf jedem Zelltyp werden durch Vergleich der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität mit der von Zellen mit bekannten Rezeptor-Kopienzahlen geschätzt.

## 4. Zellproliferations-Assay:

**[0263]** Proliferations-Assay, wie durch MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid]-Inkorporation gemessen. Die Zelllinien wurden in 96-Well-Platten (5000 Zellen/Vertiefung) in 10% DMEM mit den angegebenen Mengen des mimetischen CDR4D5 ausplattiert und 48 Stunden lang inkubiert. MTT wurde für 4 Stunden zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden in 50% SDS/20% Dimethylsulfoxid lysiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Proliferation wurde durch Messen der optischen Dichte bei 570 nm unter Verwendung eines ELISA-Lesegerätes bestimmt. Es wurde festgestellt, dass die Anzahl der in diesem Assay verwendeten Zellen innerhalb des linearen Bereiches für diesen Zelltyp lag.

5. Strahlungs-Sensibilisierungs-Effekt des anti-p185<sup>c-erbB-2</sup> mimetischen CDR4D5, wie mit Hilfe der morphologischen Analyse der Apoptose bestimmt.

**[0264]** 30 000 Zellen wurden über Nacht in 6 Well-Platten auf Deckgläsern anheften gelassen. Die Zellen wurden mit 50 µg/ml des mimetischen CDR4D5 für 48 Stunden vor der Bestrahlung inkubiert. 10 Gy Bestrahlung wurden verabreicht, und die Zellen wurden bei 37°C inkubiert. Die nukleare Morphologie wurde zu folgenden Zeitpunkten bestimmt: 12, 24, 48 und 72 Stunden nach der Bestrahlung. Die Deckgläsern wurden zu den angegebenen Zeitpunkten zweimal mit PBS gewaschen und in einer 50:50 Mischung aus eiskaltem Methanol/Aceton für 1 Minute fixiert. Die fixierten Zellen wurden anschließend mit 4',6'-Diamidino-2-phenylindol Di-hydrochloridhydrat (DAPI) (Sigma, St. Louis, MO) mit einer Konzentration von 0,25 ng/ml in PBS gefärbt, und die morphologische Bestimmung der apoptotischen Nuklei wurde unter Verwendung einer direkten Zählung bestimmt. Die Konsistenz bei den Apoptose-Zählungen zwischen den Beobachtern wurde mit einer terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase-vermittelten dUTP nick end labeling (TUNEL)-Färbung und durch Analyse von drei unabhängigen Beobachtern bestätigt.

**[0265]** Die Zellzählungen wurden innerhalb von 30 Minuten nach der Färbung durchgeführt, und Fotografien wurden mit einem Zeiss Axioplan Epifluoreszenz-Mikroskop angefertigt. Wenigstens drei unabhängige Felder mit 100 Zellen wurden für jede Probe gezählt.

## Ergebnisse

## 1. Expression des c-erbB-2 Oberflächen-Rezeptors

**[0266]** Die durchflusszytometrische Analyse wurde verwendet, um die Oberflächenexpression des p185<sup>c-erbB-2</sup> Rezeptors auf humanen Tumorzellen zu bestimmen. Die Expression des c-erbB-2 Oberflächen-Rezeptors war am höchsten in SKBR3, gemäßigt in MCF7, gering bis gemäßigt in U373MG und nicht nachweisbar in U87MG. Die durchschnittliche Fluoreszenz der SKBR3 war 50 mal höher als die der Kontrolle, und die von MCF7, U373MG und U87MG waren 6,5, 2 bzw. einmal so hoch wie die der Kontrolle.

## 2. Inhibition der Proliferation

**[0267]** Die Behandlung mit CDR4D5 inhibierte die Tumorzellproliferation in einer Dosis-abhängigen Weise und die Oberflächendichte des p185<sup>c-erbB-2</sup> in umgekehrt-abhängiger Weise. CDR4D5 inhibierte die Proliferation

der erbB-2 nicht-exprimierenden U373MG Elternzellen nicht, und U373/T691 wurde zu 62% mit 1 µg mimetischen CDR4D5 inhibiert. Die Proliferation der MCF7 Zellen und SKBR3 Zellen wurde zu 43%–53% bzw. 39%–49% in einer Dosis-abhängigen Weise inhibiert ([Fig. 5](#)).

### 3. Strahlungs-Sensibilisierungseffekt des anti-185<sup>c-erbB-2</sup> mimetischen CDR4D5

**[0268]** Die Apoptose war 72 Stunden nach der Bestrahlung in allen Zellen maximal. Die Behandlung von U373MG Zellen mit mimetischem CDR4D5 führte zu 20–28% mehr Apoptose als in nicht-behandelten U373MG Zellen 48 Stunden und 72 Stunden nach der Bestrahlung. Die Wirkung der CDR4D5 Behandlung auf die Apoptose in U373MG Zellen war vergleichbar mit der, die mit trunkiertem neu erreicht wurde, einem inhibitorischen Rezeptor-Mutant, der die erbB-Signalgebung zerstört und eine erhöhte Apoptose in Antwort auf Bestrahlung induziert ([Fig. 6A](#)). Ein signifikanter Bestrahlungs-Sensibilisierungseffekt des CDR4D5 wurde 72 Stunden nach der Bestrahlung in MCF7 Zelllinien und SKBR3 Zelllinien beobachtet ([Fig. 6B](#)). Da die Sensibilität gegenüber apoptotischen Zelltod umgekehrt mit den Mengen an p185<sup>c-erbB-2</sup> Oberflächen-Rezeptor korreliert, sollte die Erhöhung der Menge an CDR4D5 entsprechend der Menge der CRB2 Oberflächen-Rezeptor-Expression den Effekt verbessern.

**[0269]** Dieses mimetische 4D5 ist ein kleines, Protease-resistentes Peptid mit einer Größe von etwa 1,5 KD, das spezifisch für den humanen p185<sup>c-erbB-2</sup> Rezeptor ist und weniger immunogen ist als der vollständig lange Antikörper. Der mimetische 4D5 veranschaulicht die Verwendung von Anti-Rezeptor-Mimetika in der Krebsdiagnose und Krebsbehandlung und erzeugte synergistische Effekte, die sich mit zytotoxischen Therapeutika wie z.B. Gammabestrahlung kombinieren lassen.

## Sequenz-Protokoll

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> Zusammensetzungen und Verfahren zur Behandlung von Tumoren

<130> upn3570

<140>

<141>

<150> 60/076,798

<151> 1998-03-04

<150> 09/111,681

<151> 1998-07-08

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> AMIDIERUNG

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Neue Sequenz

<400> 1

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

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)

<223> AMIDIERUNG

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Neue Sequenz

<400> 2

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

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)

<223> AMIDIERUNG

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Neue Sequenz

<400> 3

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

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> AMIDIERUNG

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Neue Sequenz

<400> 4

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

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> AMIDIERUNG

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Neue Sequenz

<400> 5

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

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)

<223> AMIDIERUNG

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Neue Sequenz

<400> 6

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

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)

<223> AMIDIERUNG

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Neue Sequenz

<400> 7

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

1

5

10

<210> 8  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)  
<223> AMIDIERUNG

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Neue Sequenz

<400> 8  
Phe Cys Asp Pro Pro Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val  
1 5 10

<210> 9  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Neue Sequenz

<400> 9  
Phe Cys Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val  
1 5 10

<210> 10  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Neue Sequenz

<400> 10  
Phe Cys Asp Gly Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val  
1 5 10

<210> 11

<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Neue Sequenz

<400> 11  
Phe Cys Asp Pro Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val  
1 5 10

<210> 12  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Neue Sequenz

<400> 12  
Phe Cys Pro Asp Gly Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val  
1 5 10

<210> 13  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Neue Sequenz

<400> 13  
Phe Cys Asp Pro Pro Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val  
1 5 10

<210> 14  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Neue Sequenz

<400> 14  
Phe Cys Asp Gly Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val

1

5

10

<210> 15  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Neue Sequenz

<400> 15  
 Phe Cys Asp Pro Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val  
 1 5 10

<210> 16  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Neue Sequenz

<400> 16  
 Phe Cys Asp Pro Pro Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val  
 1 5 10

### Patentansprüche

1. Verwendung eines Nukleinsäure Moleküls, Peptids oder Antikörpers in der Herstellung eines Arzneimittels für die kombinierte Behandlung eines Individuums mit einem erbB Protein vermittelten Tumor, die kombinierte Behandlung umfasst das Verabreichen des Arzneimittels an das Individuum in Kombination mit einer anti-Krebs Bestrahlung und/oder einem anti-Krebs chemotherapeutischen Mittel, wobei
  - i) das Nukleinsäure Molekül ein Peptid kodiert, das die Bildung von erbB Protein Dimeren verhindert, die erhöhte Tyrosinkinase Aktivität in einer Tumorzelle bilden,
  - ii) das Peptid die Bildung von erbB Protein Dimeren inhibiert, die erhöhte Tyrosinkinase Aktivität in einer Tumorzelle bilden, und
  - iii) der Antikörper die Bildung von erbB Protein Dimeren inhibiert, die eine erhöhte Tyrosinkinase Aktivität in einer Tumorzelle bilden.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das Individuum einen erbB Protein vermittelten Gehirntumor aufweist.
3. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die erbB Protein Dimere mindestens ein p185 Molekül aufweisen.
4. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die erbB Protein Dimere mindestens ein EGFR Molekül aufweisen.
5. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei der Tumor ein p185 vermittelter Tumor ist.

6. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei der Tumor ein EGFR vermittelter Tumor ist.
7. Verwendung gemäß Anspruch 6, wobei der Tumor ein durch einen mutanten EGFR vermittelter Tumor ist.
8. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das Peptid aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus SEQ ID NRN:1–5 und SEQ ID NR:10–13 besteht.
9. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das Peptid SEQ ID NR:1 ist.
10. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das Peptid SEQ ID NR:2 ist.
11. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das Peptid SEQ ID NR:3 ist.
12. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das Peptid SEQ ID NR:4 ist.
13. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das Peptid SEQ ID NR:5 ist.
14. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das Peptid SEQ ID NR:10 ist.
15. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das Peptid SEQ ID NR:11 ist.
16. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das Peptid SEQ ID NR:13 ist.
17. Verwendung eines Antikörpers oder eines Peptids, der/das die Kinaseaktivität zerstört, die mit multimeren Rezeptor Anordnungen assoziiert ist, umfassend ein erbB Protein in der Herstellung eines Arzneimittels, das in Kombination mit einer anti-Krebs Bestrahlung oder einem anti-Krebs chemotherapeutischen Mittel verabreicht wird, für die Behandlung eines Individuums, das einen Tumor aufweist, wobei der Tumor durch Tumorzellen gekennzeichnet ist, die multimere Rezeptor Anordnungen aufweisen, die ein erbB Protein umfassen, die Tyrosinkinase Aktivität, die mit einem transformierten Phänotyp assoziiert ist, bereitstellen.
18. Verwendung gemäß Anspruch 17, wobei der Tumor durch Tumorzellen gekennzeichnet ist, die:
  - a) erbB Homodimere, die mutante EGFR Homodimere oder p185 Homodimere sind; und/oder
  - b) erbB Heterodimere, die p185/EGFR Heterodimere, p185/mutante EGFR Heterodimere, p185/erbB3 Heterodimere, p185/erbB4 Heterodimere oder EGFR/mutante EGFR Heterodimere sind, aufweisen.
19. Verwendung gemäß Anspruch 17, wobei das Peptid oder der Antikörper die Bildung eines p185 Homodimers inhibiert.
20. Verwendung gemäß Anspruch 17, wobei das Peptid oder der Antikörper die Bildung eines EGFR Homodimers inhibiert.
21. Verwendung gemäß Anspruch 17, wobei das Peptid oder der Antikörper die Bildung eines Heterodimers aus p185 und EGFR inhibiert.
22. Verwendung gemäß Anspruch 17, wobei die Tumorzelle eine p53(+) Tumorzelle ist.
23. Verwendung gemäß Anspruch 17, wobei die Tumorzelle eine p53(–) Tumorzelle ist.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

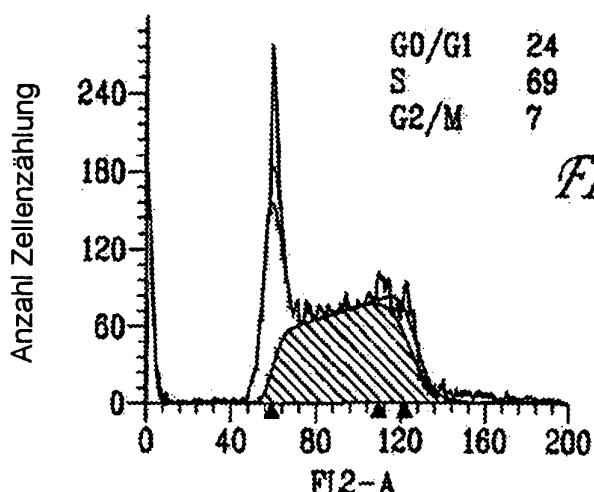


FIG. 1A

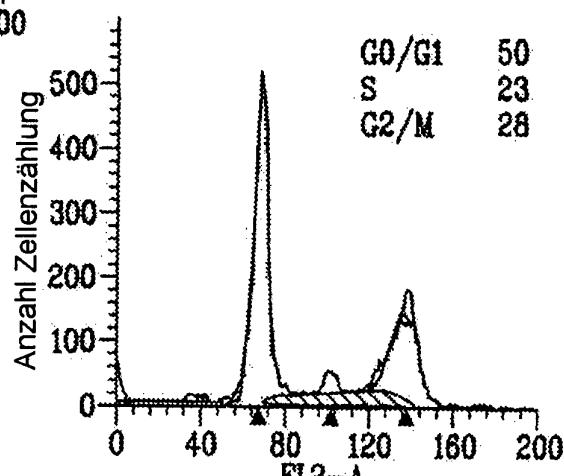


FIG. 1B

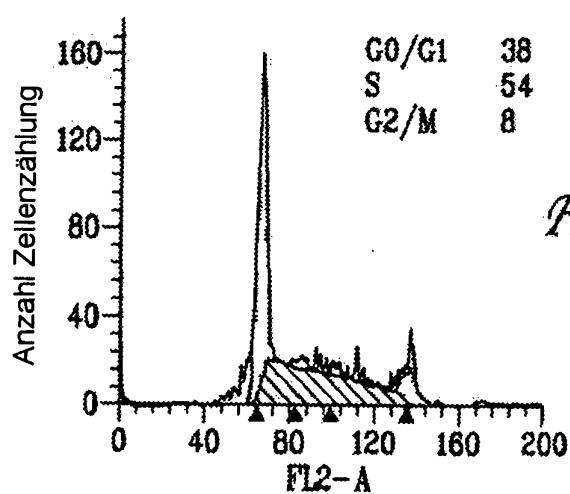


FIG. 1C

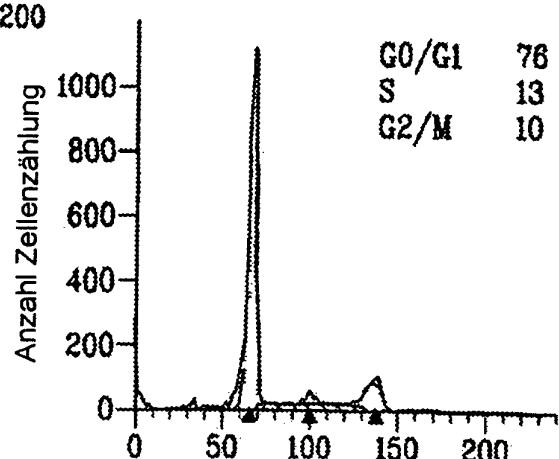


FIG. 1D

FIG. 2A

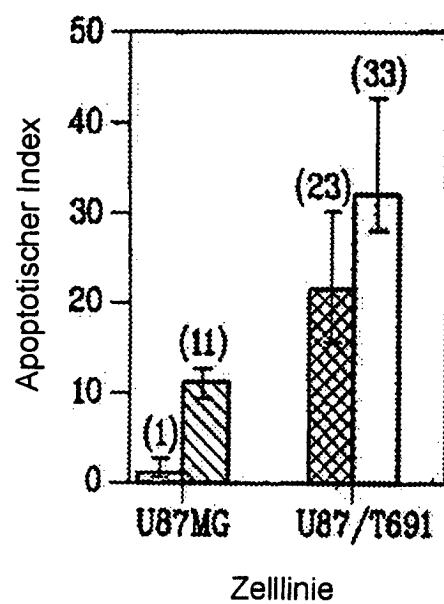
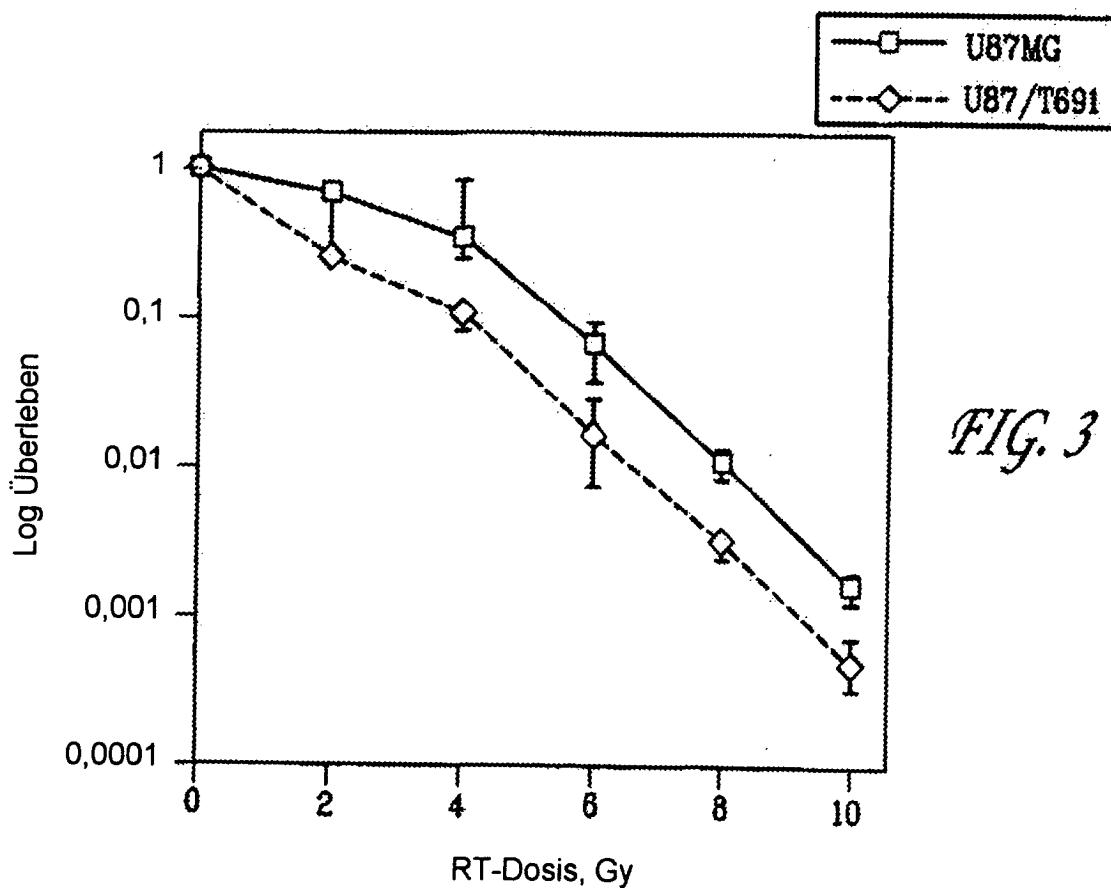
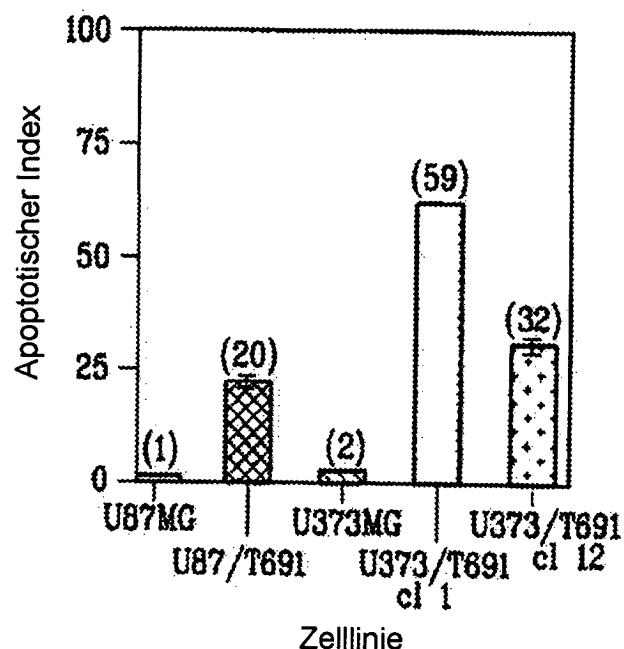


FIG. 2B



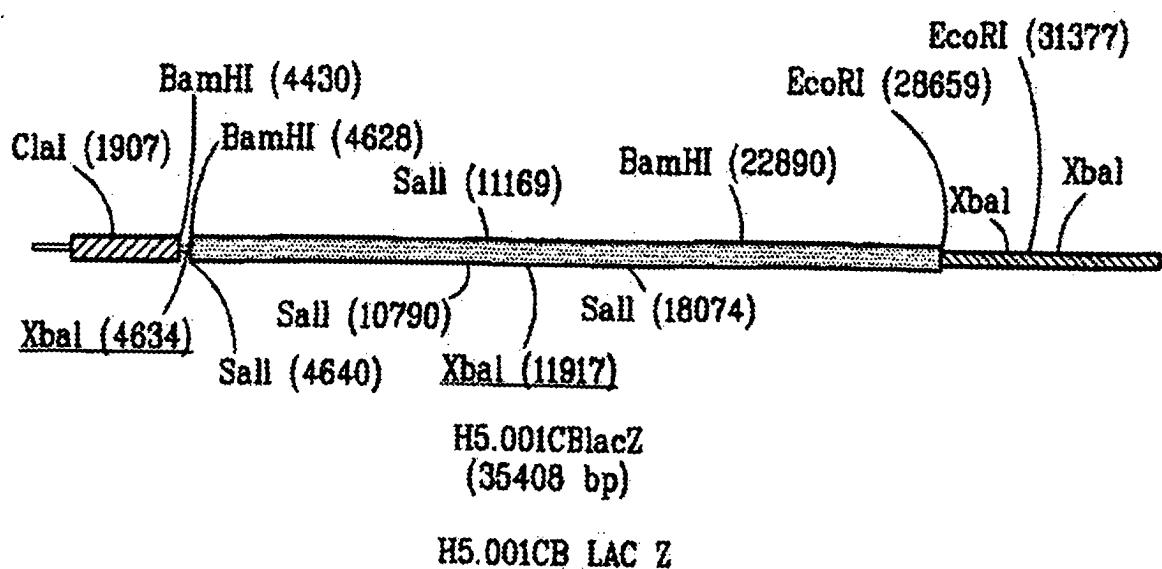


FIG. 4

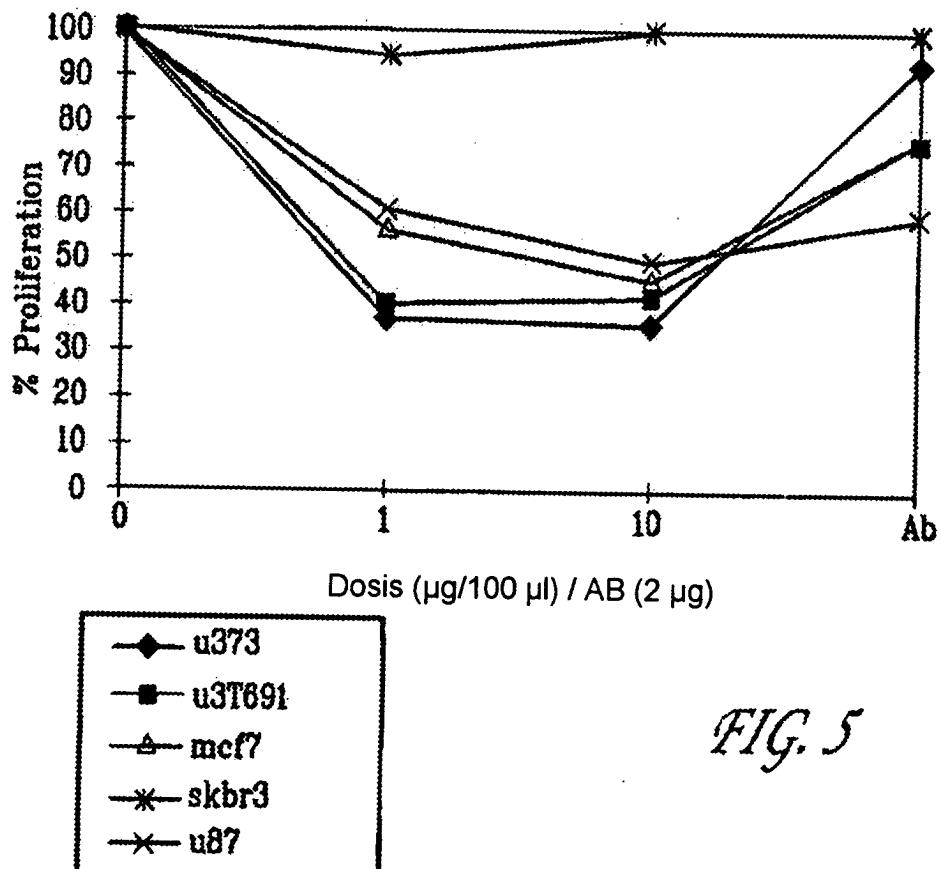


FIG. 5

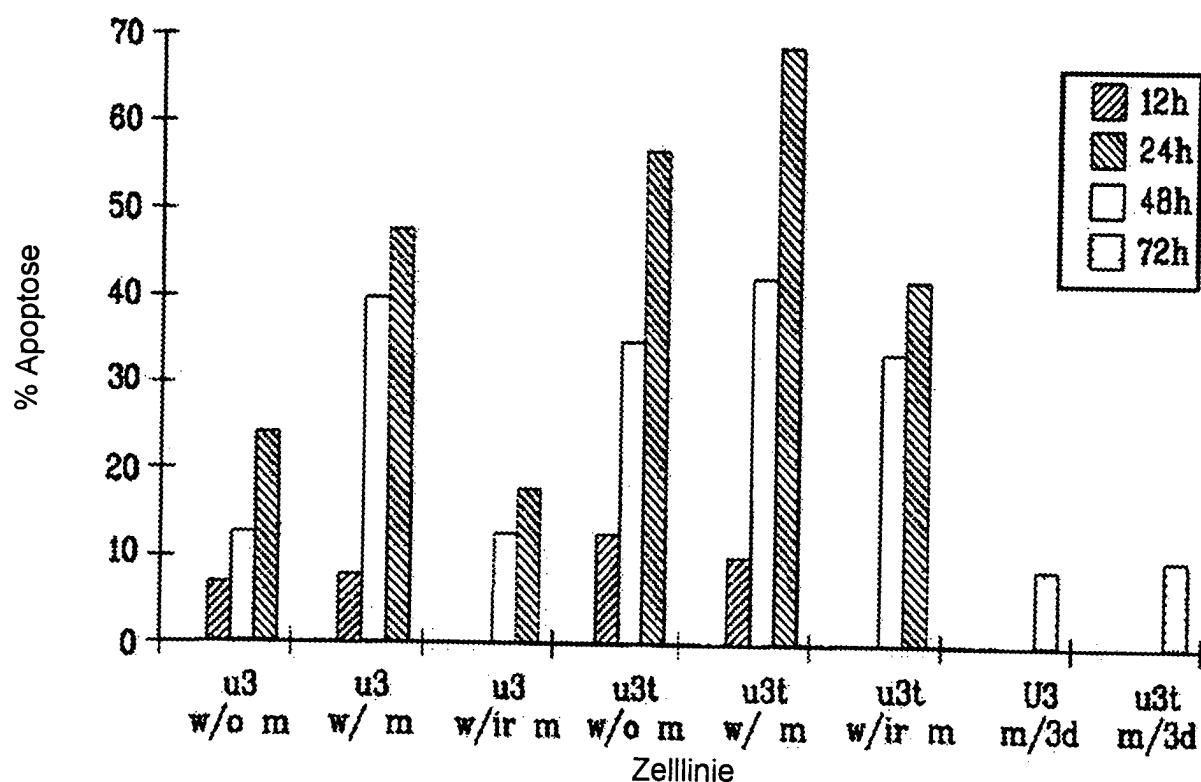


FIG. 6A

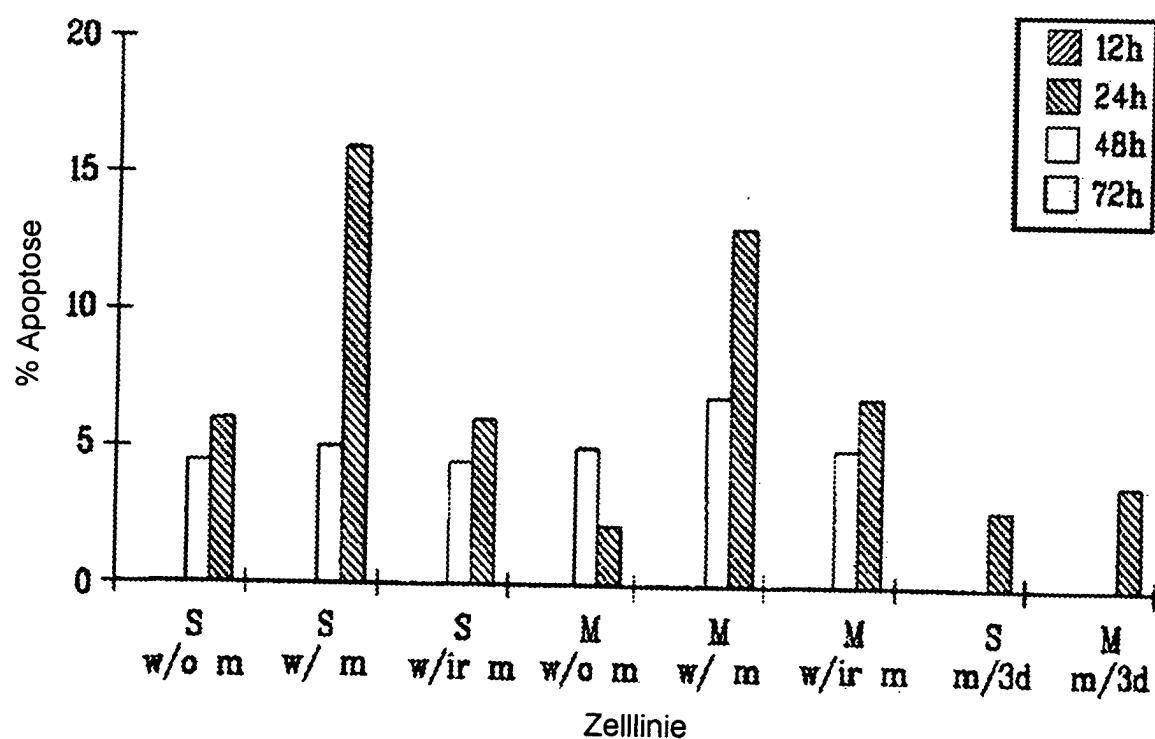


FIG. 6B