

Nuevas terapias en cáncer: Acción sobre la vía de transducción de señales, de una promesa a una realidad que se inicia

Dr. Jorge Gutiérrez

Departamento de Oncología

Al arsenal terapéutico oncológico, se han agregado en los últimos años, dos medicamentos nuevos, la herceptina para el cáncer de mama y el STI 271 para la leucemia mieloide crónica. Se trata de los dos primeros intentos exitosos de obtener un resultado eficaz mediante la manipulación de la vía de transducción de señales. Allí radica la importancia de su ingreso a la práctica corriente de oncología.

En primer lugar nos referiremos, brevemente, al mecanismo de acción de ambos medicamentos y los resultados clínicos obtenidos con su empleo y, en segundo lugar, haremos una explicación esquemática, de la vía de transducción de señales, señalando al mismo tiempo los distintos puntos de acción o blancos de terapias que se encuentran en desarrollo o que podrían serlo en el futuro.

Herceptina

Aproximadamente el 30% de los cáncer de mama tienen una amplificación o una sobre expresión del gen HER2/neu1. Los tumores que sobre expresan HER2/neu se asocian a una sobrevida menor2 y presentan mayor resistencia a la acción de la quimioterapia3.

Este receptor apareció, por varios motivos, como un blanco atractivo para una terapia basada en el uso de anticuerpos. En primer lugar, porque parece ser un elemento importante en el crecimiento tumoral. En segundo lugar, porque el gen se expresa, y en niveles muy bajos, sólo en algunas células epiteliales normales. De ese modo, se podía obtener un efecto importante sobre las células malignas, con un riesgo bajo de toxicidad.

Se desarrollaron diversos anticuerpos monoclonales dirigidos contra este receptor de superficie. El más activo de todos es el anticuerpo 4D5, cuya versión humanizada, la herceptina se encuentra incorporada a la práctica clínica. La forma de acción del anticuerpo no está clara pero parece estar en relación con una endocitosis acelerada del receptor, seguida de su degradación4.

Usado como agente único, en enfermas con cáncer metastásico y con múltiples quimioterapias previas, la herceptina ha producido 14% de respuestas y con una mediana de duración de 9 meses5. Algunas de estas respuestas se mantienen por largos períodos con enfermas que llevan más de dos años y medio de remisión completa mantenida6. Aún más importante ha sido el hecho que la herceptina, al combinarla con quimioterapia, incrementa en forma significativa la respuesta al tratamiento, alarga el tiempo libre de progresión de la enfermedad y prolonga la sobrevida7.

STI 271

El cromosoma Philadelphia, expresión de la translocación (9;22) característica de la leucemia mieloide crónica lleva a la unión del gen BCR con el gen ABL. Esta unión, a su vez da origen a un proteína de fusión bcr/abl la cual actúa como una tirosina kinasa activada⁸.

La función de las tirosina kinasas se efectúa uniéndose a la adenosin trifosfato (ATP) y transfiriendo fosfato del ATP a residuos de tirosinas, presentes en diversos substratos. En el caso del bcr/abl esta actividad fosforilativa, activa la cadena de eventos citoplasmáticos de la vía de transducción de señales produciendo el exceso de proliferación de las células mieloídes, característica de la leucemia mieloide crónica (Figura 1).

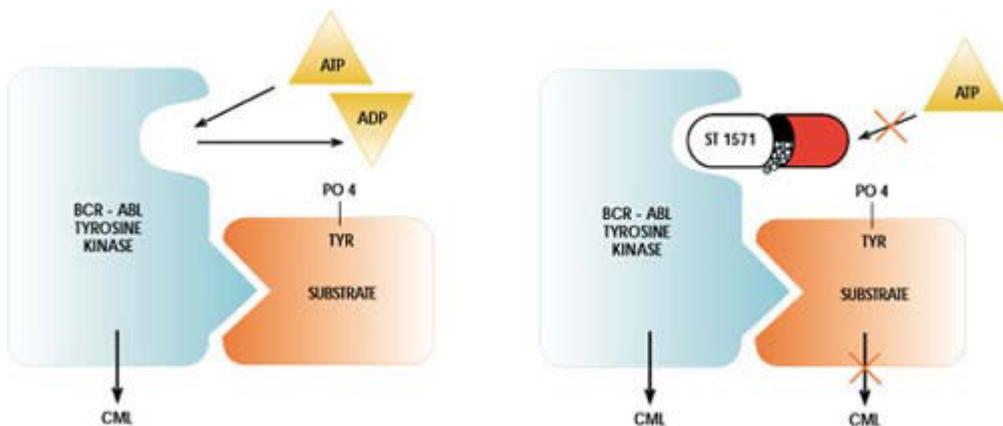


Figura 1

El hecho de haber demostrado, a través de la viabilidad de la existencia de las ratas nulas con respecto a ABL⁹, que la presencia de la actividad kinásica de abl no es indispensable para la vida, permitió elegir esta proteína de fusión como un blanco muy adecuado para una terapia basada en el bloqueo de su acción.

Luego de estudiar diversas moléculas se seleccionó el compuesto denominado STI 271 por ser el bloqueador más efectivo. Esta molécula bloquea la unión del ATP a la tirosina kinase de bcr/abl. De ese modo, ante la pérdida de la actividad tirosina kinase el substrato no puede ser fosforilado y desaparece la estimulación indebida de la proliferación celular¹⁰ (Figura 1).

Las células que no expresan el gen de fusión son insensibles a la acción de la droga y en cambio se ha demostrado su efectividad en el 100% de las células con la mutación¹¹.

Su efecto antitumoral se demostró primero en estudios experimentales y desde 1998 se conoce su efectividad en clínica. El uso del medicamento, por vía oral, en pacientes en fase crónica de la enfermedad, resistentes al uso de interferón, produjo un 100% de respuestas completas hematológicas, con respuestas que se mantienen por más de 8 a 10 meses, 45% de respuestas citogenéticas y con un 10% de desaparición del cromosoma Phi-Philadelphia. Además se pudo comprobar la escasa toxicidad del medicamento¹².

Posteriormente se ha expandido la indicación de la droga a la fase blástica de la leucemia mieloide crónica y también a leucemia aguda linfoblástica que expresan el cromosoma Philadelphia, ambas situaciones de mal pronóstico, especialmente la primera. En las crisis blásticas se obtuvo 55% de respuestas con 22% de respuestas

completas y en las leucemias linfoblásticas las cifras son 82 y 55% respectivamente¹³. Desafortunadamente las respuestas son de corta duración y probablemente, en estas situaciones la droga debería asociarse con otras terapias.

Definición de la vía de transducción de señales

Estos tratamientos que se han ido introduciendo en la práctica clínica tienen en común que se han elaborado luego de conocer la importancia que tiene en el crecimiento y multiplicación celular, la llamada vía de transducción de señales.

Probablemente uno de los avances más importantes en la comprensión de la biología del cáncer ha sido el reconocimiento que la desregulación de las vías normales de las señales del crecimiento provocan la transformación maligna de las células humanas y por lo tanto una acción tendiente a contrarrestar estas alteraciones puede tener una acción importante en el tratamiento del cáncer.

La transferencia de información desde el exterior de la célula hasta el núcleo y con el resultado de una eventual alteración en la síntesis del ADN se realiza mediante dos tipos generales de vía de señales (Figura 2). La primera es más bien simple y está representada por las hormonas.

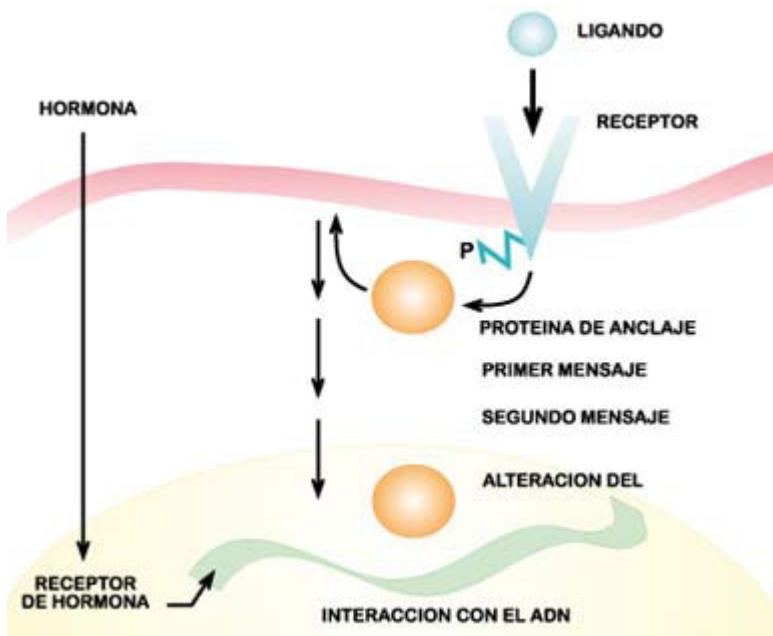


Figura 2

Cuando una hormona interactúa con una célula, difunde hacia el núcleo reaccionando con un receptor nuclear el cual a su vez interactúa directamente con reguladores de la síntesis de ADN. Sin embargo, la mayor parte de las señalizaciones dependen de una intrincada sucesión de eventos moleculares que recibe el nombre de vía de transducción de señales. En este proceso un ligando se une a un receptor de la superficie celular, el cual se encarga de transmitir la señal hacia el interior, habitualmente a través de la formación de hetero u homodímeros, lo cual provoca alteraciones moleculares intracelulares. Estas señales se transmiten entonces a través de una escalera de moléculas las cuales son activadas o desactivadas, en forma secuencial, llevando de este modo a una eventual alteración de la expresión del ADN y la respuesta celular.

Una de las vías de mayor importancia es aquella que es gatillada por los factores de crecimiento. Esta vía tiene como finalidad regular el crecimiento celular, la división celular, la apoptosis, la respuesta a los estímulos de estrés, el ciclo celular y la reparación celular.

Las etapas involucradas en la vía de transducción de señales son las siguientes:

1. Factores de crecimiento.
2. Receptores de factores de crecimiento.
3. Unión de los receptores a proteínas citoplasmáticas.
4. Activación de la proteína Ras.
5. Vía de señales de las proteína kinasas mitogénicamente activadas
6. Activación de los factores de transcripción

Factores de crecimiento (FC)

Uno de los mecanismos más evidentes por el cual se puede mantener una proliferación anormal de células es la presencia de factores de crecimiento que estimulen en forma permanente la multiplicación celular. En el hecho se ha demostrado la presencia de diversos factores de crecimiento cuya producción frecuentemente autocrina tiene importancia en la patogénesis de enfermedades malignas. De ese modo, las células malignas secretan un factor que interactúa con los receptores específicos para el factor y que están presentes en la mismas células.

Las células derivadas de distintos tumores malignos son capaces de secretar el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). El ejemplo mas conocido son los gliomas¹⁴. Otro factor que ha aparecido involucrado en este proceso es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Este último tiene especial importancia, por su participación en los procesos de angiogénesis, en tumores en los cuales el componente vascular es predominante como es el caso del sarcoma de Kaposi¹⁵ y del glioblastoma multiforme¹⁶. Un tercer ejemplo es el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF): Se ha demostrado la participación de genes de esta familia en la transformación maligna, entre ellos el gen INT-2, en patologías como cáncer gástrico, sarcoma de Kaposi y otros¹⁷.

Receptores de los factores de crecimiento

Los receptores de los factores de crecimiento comparten la capacidad de fosforilar proteínas en los residuos de tirosina y de ese modo activan la cascada de señales. Estas moléculas que reciben el nombre de receptores de proteínas tirosina kinasas son proteínas de transmembrana con un dominio extracelular, otro corto intra membranoso y finalmente la porción intracelular que posee el dominio catalítico tirosina kinasa (Figura 3).

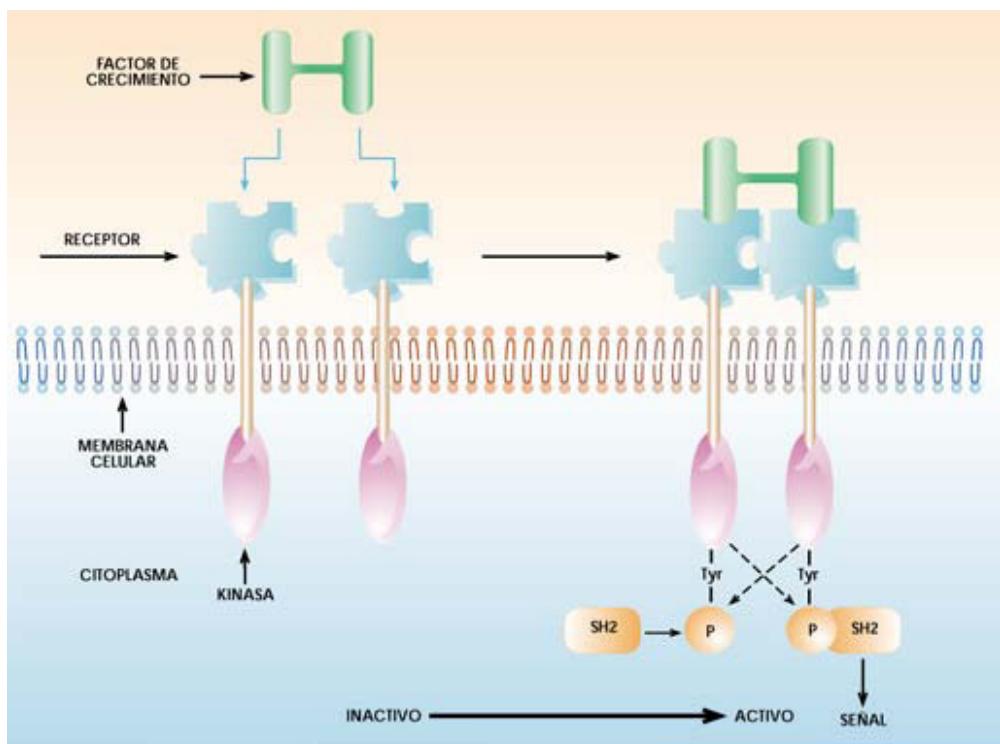


Figura 3

Al unirse el FC al receptor, se produce una alteración conformacional del dominio extracelular del receptor, lo que trae consigo la reunión (dimerización) de los receptores de tirosina kinasa (TK). La dimerización del receptor junta los dominios catalíticos de dos receptores adyacentes con el resultado que ambos se fosforilan (transfosforilación), lo que trae como consecuencia la propagación del estímulo. La importancia de la transfosforilación ha quedado demostrada por experimentos en los cuales receptores mutantes, que han perdido la capacidad de fosforilar, anulan la transmisión de las señales al dimerizar con receptores normales¹⁸.

En las células malignas, en cambio, se han encontrado receptores anormales de TK que “pueden sufrir dimerización en ausencia de la estimulación efectuada por un FC. Un ejemplo es c-ErbB-2, llamado también HER2/neu, que codifica un receptor de TK con una mutación en su región de transmembrana lo que permite la asociación de múltiples receptores proteicos en la ausencia de un ligando, generando de ese modo una activación continua y una señalización inapropiada. Un fenómeno similar se produce con la sobre expresión del gen¹⁹ (Figuras 4, 5). Ya hemos visto la importancia que este conocimiento ha adquirido en la terapia actual.

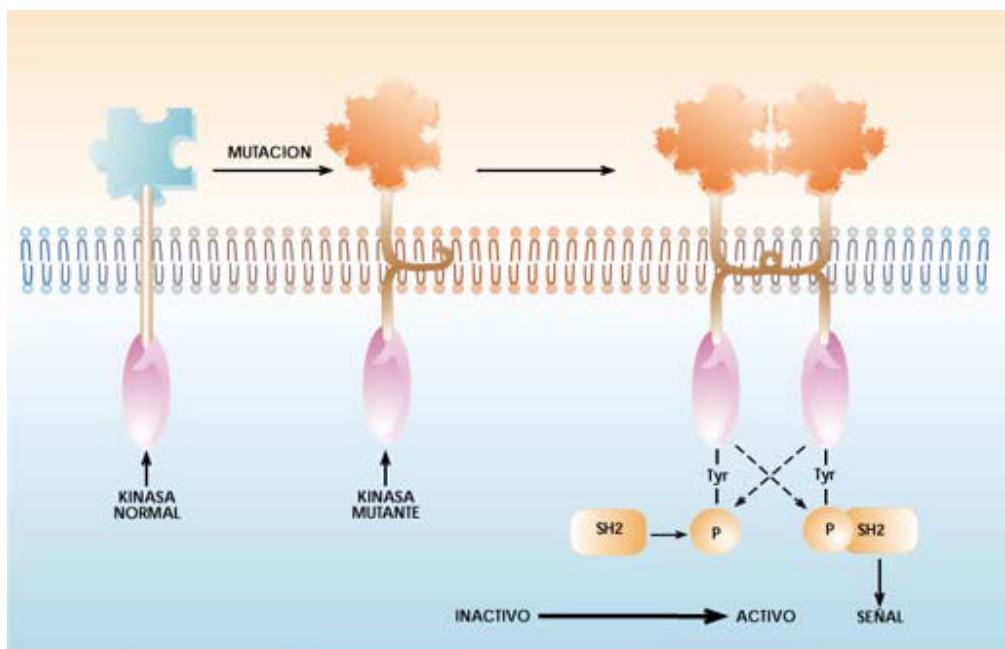


Figura 4

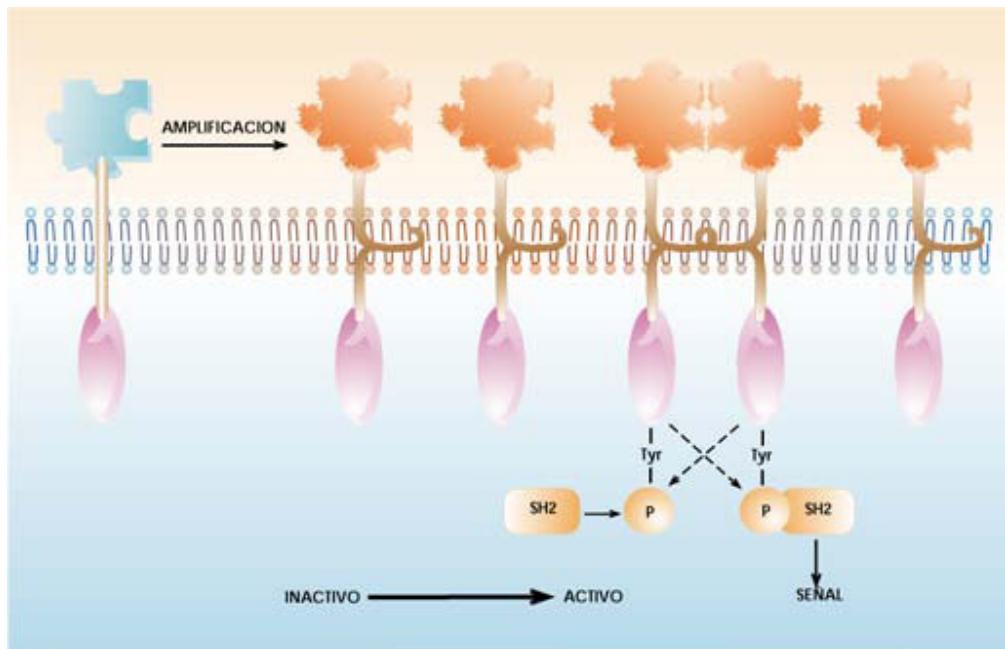


Figura 5

El receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF) es probablemente el receptor de superficie celular más estudiado. Forma parte de una familia de receptores, la misma a la cual pertenece también HER2/neu, que se conoce como erb-B o HER 1 al 4. ErbB-1 se une al EGF, mientras erb-B3 y erb-B4 se unen a un factor llamado factor de diferenciación neu (NDF). En cambio el ya señalado erb-B2 no tiene ligando conocido pero puede dimerizar con erb-B1 en su unión con EGF y con erb-B3 o Erb-b4 aumentando su afinidad con NDF²⁰.

Se han desarrollado moléculas para lograr la inhibición del receptor de EGF (anticuerpos monoclonales y compuestos contrasentido) ya que su sobre expresión se ha demostrado en la mayor parte de los cánceres, entre ellos el cáncer de mama²¹, ovario²², gástrico²³, colon²⁴, páncreas²⁵ y vejiga²⁶.

Entre las moléculas estudiadas destaca el anticuerpo monoclonal C225 (Cetuximab). Se

ha demostrado su efecto sinérgico con la radioterapia²⁷ y cisplatino²⁸ en el cáncer de cabeza y cuello. Las experiencias con el C225 han sido las mismas que se han apreciado con otros compuestos que modulan la vía de transducción de señales. Estos medicamentos por sí solos tienen una actividad pequeña pero son sinérgicos con otras terapias y con escasa toxicidad agregada.

Otra molécula de interés ha sido el Iressa o ZDE 1839, un inhibidor de tirosina kinasa, de uso oral. Se han completado 4 estudios fase I y II, con un total de 253 enfermos con una gran variedad de tumores: pulmón de células no pequeñas, ovario, mama, colorrectal, esófago, riñón, próstata y cabeza y cuello. En uno de los estudios, el 23% de los enfermos tuvieron respuesta o estabilización de su enfermedad por más de 4 meses. Las mejores respuestas se obtuvieron en el cáncer pulmonar y el nivel de toxicidad fue muy bajo²⁹. Los estudios de farmacocinética efectuado por medio de biopsias de piel antes y después del tratamiento, han permitido confirmar el bloqueo de la vía de transducción, mediado por la inhibición de tipo tirosina kinasa, al comprobar la disminución de la actividad de las MAPK (ver más adelante)³⁰. Se encuentran en marcha estudios en cáncer pulmonar de células no pequeñas, en los cuales se asocia Iressa a combinaciones de paclitaxel con carboplatino o gemcitabine con cisplatino³¹.

Hay otros receptores cuya alteración se ha demostrado importante. Entre ellos se puede señalar Ret: asociado con la neoplasia endocrina múltiple tipo 2A y 2B y con el cáncer medular familiar de la tiroides³². También destacan las alteraciones de Kit, Fms y Flt-3. Estos receptores de TK, que comparten estructuras similares son estimulados normalmente por sus respectivos ligandos: Stem cell factor (SCF), M-CSF y ligando Flt-3. Cada uno de estos receptores se encuentran mutados en una variedad de enfermedades malignas hematológicas y pueden contribuir a su etiología^{33,34}. De ese modo se constituyen también en potenciales blancos de una terapia.

Unión de los receptores a las proteínas citoplasmáticas

Se han identificado numerosas moléculas citoplasmáticas que se relacionan con las moléculas de señal de la superficie. Las más importantes son moléculas que poseen actividad de moléculas de unión mediante la presencia en ellas de dominios de unión del tipo SH2 y SH3³⁵.

Las moléculas que contienen uniones SH2 al unirse a los receptores de tirosina kinasas activados se fosforilan con lo cual se altera su actividad enzimática y se propaga la señal que había llegado a la superficie. En otras ocasiones, el cambio puede ser independiente de la fosforilación y consistir en una variación conformacional, pero que produce también un aumento de actividad enzimática³⁵. La unión de estas proteínas, que contiene SH2, a los receptores de proteína kinasa permiten acercar estas moléculas a sus propios substratos y de ese modo aumentan la eficacia de la propagación de la señal. Los dominios SH3 se encuentran por su parte tanto en las proteínas de señal como en las proteínas estructurales del citoesqueleto, produciendo, de esa forma, una conexión entre las señales celulares y las alteraciones de la estructura celular.

Activación de la proteína Ras

La propagación de la señal se hace, inicialmente, sobre la base de proteínas que están unidas a la superficie interna de la membrana celular. La mejor estudiada de estas proteínas ancladas a la superficie interna de la membrana celular es la señalización vía Ras.

Las proteínas Ras juegan un papel primordial en la continuación de la propagación de la señal. La acción de Ras se produce mediante un cambio entre una unión GTP, forma activa, y una unión GDP, forma inactiva. Las proteínas Ras tienen por si mismas una actividad GTP asa que convierte las uniones ras GTP en uniones Ras GDP inactivándose. Regulando este proceso se encuentran otras proteínas, como la proteína

SOS que forma parte de las proteínas que forman complejos con los receptores de tirosina quinasas y son ellas las que traen la señal hasta Ras.

Estas proteínas pueden intercambiar GTP libre por GDP unido a Ras y de ese modo ponen a Ras en su forma activa. Se han descrito diversas mutaciones de Ras que inhiben la actividad ATPasa intrínseca y de ese modo atrapan la molécula en su forma activada³⁷. Las mutaciones de Ras son muy frecuentes en distintos tipos de cáncer: páncreas, colon, gástrico, pulmón y tumores del SNC³⁸,

Ras presenta una característica que facilita su papel de blanco para las terapias y esta es que la proteína codificada por el gen mutado es sintetizada inicialmente como un precursor que requiere de un proceso bioquímico para obtener su actividad biológica. Se trata de la farnelización de un residuo de cisteína localizado en la porción terminal de la molécula. Este proceso es fundamental para que la proteína madura se inserte en la membrana celular y ejerza su función como pro-teína anclada. La inhibición de la farnelización permite inactivar Ras y puede tener un efecto sustancial sobre el crecimiento incontrolado del tumor³⁹. Se ha demostrado su efecto en animales y varios compuestos (Merk, BMS) se encuentran en estudios de fase II⁴⁰. Es importante hacer notar la ausencia de toxicidad señalada en los estudios experimentales. También es necesario recalcar que por la especial importancia de Ras en la cascada bioquímica su inhibición trae como efecto una neutralización de varios otros procesos que se encuentran más allá en el nivel de transducción. De ese modo, su efecto terapéutico puede ser más importante que la simple neutralización del gen sobre activado.

La activación de Ras, por su parte, causa la activación de Raf, proteína a la cual está físicamente unida. Esta asociación provee un vínculo crítico desde el receptor activado en la superficie por un factor de crecimiento, hacia la parte distal de la vía de activación⁴¹. En este paso actuarían también otras proteínas entre las cuales destacan las proteína quinasas C (PKC).

Las proteínas quinasas C han sido relacionadas con muchos aspectos de la oncogénesis incluyendo la apoptosis, angiogénesis, diferenciación y proliferación celular. La PKC es un miembro de la gran familia de las tirosina quinasas. Se ha demostrado que constituyen importantes mediadores intracelulares de una variedad de estímulos mitogénicos, incluidos los asociados con diversos factores de crecimiento.

Se han desarrollado diversos moduladores como el Bryostatin que es un potente inactivador de la PKC. Se encuentran en desarrollo estudios fase II en mieloma múltiple, LMC, cáncer renal y combinaciones con ATRA, 2CDA, cisplatino y paclitaxel⁴². Otros inhibidores son el UCN-01⁴³ y la Stausporin. El primero tiene un impacto mayor en el ciclo celular y en las quinasas dependientes de ciclinas. Se ha demostrado activo en modelos experimentales de: sarcomas, cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer renal y de mama. Están en marcha estudios fase I. También se han empleado moléculas contrasentido como el ISIS-3521⁴⁴ y se encuentran en marcha estudios fase I en cáncer de colon y ovario. En el caso de cáncer de colon ya hay estudios fase II.

Vía de señales de las proteínas quinasas mitogénicamente activadas (MAPK)

La coestimulación de Ras y Raf lleva a la activación de una cascada de quinasas reguladas extracelularmente y que son miembros de la llamada familia de las proteínas quinasas mitogénicamente activadas. A través de un complejo mecanismo bioquímico se va a transmitir la señal hasta los factores de transcripción⁴⁵.

Activación de los factores de transcripción

El paso final de la transducción de señales es la activación de los factores de transcripción. Se reserva este nombre para enzimas con actividad de ARN polimerasa II y otras proteínas que catalizan la transcripción de los genes. Los factores de

transcripción influencian los genes al unirse a secuencias específicas de reconocimiento en el ADN y que están situadas en la región promotora, en el inicio de los genes. Las mutaciones de estos factores, cuyo ejemplo más característico es c-myc, pueden causar una activación desregulada que lleve a la aparición de una transformación maligna⁴⁶.

El caso más conocido de terapia a través de una acción sobre factores de transcripción alterado es el de leucemia aguda promielocítica. En efecto la introducción de la terapia con ácido transretinoico (ATRA) permitió efectuar un tratamiento que logra la remisión completa de la leucemia, no por destrucción de células, sino que por la maduración de las células malignas, que se transforman en células normales⁴⁷.

Casi todos los casos de esta enfermedad están asociados a la translocación (15;17) (q21;q12) que trae consigo la fusión del receptor de ácido retinoico alfa con el gen PML. El resultado es la aparición de una proteína de fusión pml-rar alfa que retiene la propiedad de rar-alfa de unirse a los dominios de unión del ADN. Por su parte la función normal de PML se desconoce.

Un descubrimiento importante y reciente ha sido la comprobación que la proteína de fusión actúa como un represor de la transcripción⁴⁸, mientras que la proteína natural rar-alfa funciona como un activador. El tratamiento con dosis farmacológicas de ATRA sobrepasa este efecto adverso, liberando la represión de la transcripción y las células pueden volver a madurar normalmente.

Probablemente, el descubrimiento con más perspectivas, en los últimos años, en el campo de la investigación en leucemias agudas mieloides, ha sido la comprobación que las múltiples translocaciones cromosómicas, implicadas en la génesis de estos cuadros, actúan a través de un mecanismo común. La desregulación de los factores de transcripción, producidos por el reordenamiento de los genes respectivos, trae como consecuencia el hecho que en vez de reclutar, como es lo normal, acetona acetilasa, reclutan acetonas deacetilasas (Figura 6). La importancia del hecho radica en que al unirse a histonas acetiladas el factor de transcripción se une a un complejo activador de la transcripción y en cambio cuando lo hace con histonas deacetiladas se une a un complejo represor, frenando de ese modo la maduración normal de las células mieloides⁴⁹.



Este conocimiento abre el paso a la posibilidad de desarrollar una terapia dirigida contra la maquinaria represora de la transcripción, por ejemplo usando inhibidores de las histonas deacetilasas. Se trataría de una terapia activa en los distintos tipos de leucemia aguda mieloide, sin importar cual sea el tipo de translocación que se encuentre involucrada. Los primeros intentos, a nivel experimental, son prometedores⁵⁰ y los primeros estudios clínicos, empleando inhibidores como el butirato, ya están en marcha⁵¹.

Comentario final

Llama la atención, en los últimos años, la rapidez con la cual los conocimientos de ciencias básicas se han trasladado a la clínica. Los conocimientos adquiridos sobre la biología del cáncer están permitiendo obtener mecanismos más específicos de ataque con la consiguiente disminución de los efectos tóxicos. Lo que hemos diseñado es sólo

una parte de los nuevos caminos que se han abierto en el campo de los tratamientos oncológicos. Se ha avanzado también en el conocimiento y manipulación de aspectos tan importantes como el ciclo celular, la apoptosis, la angiogénesis y propagación tumoral. A pesar de estos avances, sin embargo, no se deben considerar como una solución que deje en la historia los tratamientos tradicionales. En todos los estudios se ha demostrado que su efecto requiere de la colaboración de otras terapias como la radiación, quimioterapia y moduladores inmunológicos. De todos modos, no cabe duda que estamos en los umbrales de una nueva época en el tratamiento del cáncer.

Bibliografía

1. Pietras R, Rendly B, Chazin V et al: *Antibody to HER2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells*. Oncogen 1994; 9: 1829.
2. Ravdin P, Chamles G: *The c-erbB2 proto-oncogen as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of other macromolecular markers, a review*. Gene 1995; 159: 19.
3. Gusterson B, Gelbert R, Gildhirsh A et al: *Prognostic importance of c-erbB2 expression in breast cancer*. J Clin Oncol 1992, 10: 1049.
4. Baselga J. *Preclinical effects of ant-HER2 monoclonal antibodies*. HER2 state of the art conference; 1999; 20.
5. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D et al: *Efficacy and safety of herceptin as a single agent in 222 women with HER2 overexpression who relapsed following chemotherapy for metastatic breast cancer*. Proc Am Soc Clin Oncol 1998; 17a (Abst).
6. Baselga J: comunicación personal.
7. Norton L, Slamon D, Leyland-Jones B et al: *Overall survival advantage to simultaneous chemotherapy plus humanized anti HER2 monoclonal antibody Herceptin in HER2 overexpression metastatic breast cancer*. Proc Am Soc Clin Oncol 1999; 18: 127? (Abst).
8. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ et al: *Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogen products*. Science 1990; 247: 1079.
9. Schwartzberg PL, Stall AM, Hardin JD et al: *Mice homozygous for abl^{ml1} mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations*. Cell 1991; 65: 1165.
10. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E et al: *Effects of a selective inhibitor of the ABL tyrosine kinase on the growth of BCR-ABL positive cells*. Nat Med 1996; 2: 561.
11. Deininger MW, Goldman JM, Lydon N et al: *The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells*. Blood 1997; 90: 3691.
12. Druker BJ, Talpaz M, Resta D et al: *Clinical efficacy and safety of an Abl specific tyrosine kinase inhibitor as targeted therapy for chronic myelogenous leukemia*. Blood 1999; 94: 368? (Abst).
13. Druker BJ, Kantarjian H, Sawyers CL et al: *Activity of an Abl specific tyrosine kinase inhibitor in patients with Bcr-Abl positive acute leukemia, including chronic myelogenous leukemia in blast crisis*. Blood 1999; 94: 697? (Abst).
14. Nister M, Claerson-Welsh L, Eriksson A et al: *Differential expression of platelet-derived growth receptors in human malignant glioma cell lines*. J Biol Chem 1991; 266: 167-55.

15. Windel K, Marve D, Weich HA: AIDS-associated Kaposi's sarcoma cells in culture express vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res* 1992; 83: 1167.
16. Kim K, Li B, Winer J et al: Inhibition of vascular endothelial growth factor induced angiogenesis suppresses tumor growth in vitro. *Nature* 1993; 362: 841.
16. Burgess WH, Maciag T: The heparin binding fibroblast growth factor family of proteins. *Ann Rev Biochem* 1989; 58: 575-606.
17. Burgess WH, Maciag T: The heparin binding fibroblast growth factor family of proteins. *Ann Rev Biochem* 1989; 58: 575-606.
18. Ueno H, Colbert H, Escobedo JA et al: Inhibition of PDGF beta receptor signal transduction by coexpression of a truncated receptor. *Science* 1991; 252: 844.
19. Peles E, Yarden Y: Neu and its ligand: from oncogen to neural factors. *Bioessays* 1993; 15: 815.
20. Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR et al: Erb-B2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* 1996; 15: 254-64.
21. Schroeder W, Biesterfeld S, Zillessen S et al: Epidermal growth factor receptor, immunohistochemical detection and clinical significance for treatment of primary breast cancer. *Anticancer Res* 1997; 17: 2799.
22. Meden H, Marx D, Raab T et al: EGF-R and overexpression of the oncogen c-erbB-2 in ovarian cancer immunohistochemical finding and prognostic value. *J Obstet Gynaecol* 1995, 21: 167.
23. Tokunaga A, Onda M, Okuda T et al: Clinical significance of epidermal growth factor, EGF receptor and c-erbB-2 in human gastric cancer. *Cancer* 1995; 75 (suppl): 1418.
24. Rajopai S, Huang S, Moskal TL et al: Epidermal growth factor expression in human colon and colon carcinomas: anti-sense epidermal growth factor receptor RNA down regulates the proliferation of human colon cancer cells. *Int J Cancer* 1995; 62: 661.
25. Uegaki K, Nio Y, Inoue Y et al: Clinicopathologic significance of epidermal growth factor and its receptor in human pancreatic cancer. *Anticancer Res* 1997; 17: 3841.
26. Sauter G, Haley J, Chew K et al: Epidermal growth factor receptor expression is associated with rapid proliferation in bladder cancer. *Int J Cancer* 1994; 57: 508.
27. Milas L, Mason K, Hunter N et al: In vivo enhancement of tumor radio-response by C225 antiepidermal growth factor receptor antibody. *Clin Cancer Res* 2000- 6: 701.
28. Baselga J, Pfiser C, Cooper MR et al: Phase I studies of antiepidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with Cisplatin. *J Clin Oncol* 2000; 18: 904.
29. Ferry D, Hammond L, Ranson M et al: Intermittent oral ZD1839 (Iressa), a novel epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI), shows evidence of good tolerability and activity. Final results from a phase I study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000; 19: 3? (Abst).
30. Baselga J, Herbst R, LoRusso P et al: Continuous administration of ZD1839 (Iressa), a novel oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI), in patients with five selected tumor types. Evidence of activity and good tolerability. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000; 19: 1778 (Abst).

31. Rowinsky E: *Epidermal growth factor (EGFR) tyrosine kinase as a target for antitumor therapy: experience with "Iressa" (ZD1839): Chemotherapy foundation symposium XVII innovative cancer therapy for to morrow; 2000: 72? (Abst).*
32. Goodfellow Pj, Wells SA Jr: *RET gene and its implication for cancer (review).* J Natl Cancer Inst 1995; 87: 1515.
33. Meierhoff G, Dehmel U, Gruss H-J et al: *Expression of FTL3 receptor and FLT3-ligand in human leukemia-lymphoma cell lines.* Leukemia 1995; 9: 1368.
34. Ridge SA, Worwood M, Oscier D et al: *FMS mutation in myelodisplastic, leukemic and normal subjects.* Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 1377.
35. Pawson T: *SH2 and SH3 domains in signal transduction.* Adv Cancer Res 1994; 64: 87-36.
36. Shoelson SE, Siravoja M, Williams KP et al: *Specific phosphopeptide binding regulates a conformational change in the Pi 3-kinase SH2 domain associated with enzyme activation.* EMBO J 1993; 12: 795.
37. Burgering BM, Bos JL: *regulation of Ras-mediated signaling. More than one way to skin a cat (review).* Trends Biochem Sci 1995; 20: 18.
38. Zachos G, Spandidos DA: *Expression of ras proto-oncogenes: regulation and implications in the development of human tumors.* Crit Rev Oncol-Hematol 1997, 26: 65.
39. Feig LA, Schafhausen B: *Signak transduction: the hunt for ras targets.* Nature 1995; 370: 527.
40. Gibbs JB, Kohl NE, Koblan KS et al: *Farnesyltransferase inhibitors and anti-Ras therapy* Breast Cancer Res Treat 1996; 38: 75.
41. Fabian JR, Daar JO, Morrison DK: *Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf1-kinase.* Mol Cell Biol 1993; 13: 7170.
42. Koutcher JA, Matei C, Zakian D et al: *In vivo metabolic and turner growth delay studies with paclixel and brysostatin-1 A PKC inhibitor, are sequence dependent.* Proc Am Assoc Cancer Res 1998; 39: 191
43. Akinga S, Gomi K, Marimoto M et al: *Antitumor activity of UCN-01, a selective inhibitor of protein kinase C in murine and human turner models.* Cancer Res 1991; 51: 4888 .
44. Stewart A: *Antisense against protein kinase C-alpha nRNA makes sense for cancer therapy?* Mol Med Today 1997; 3: 324.
45. Howe LR, Lewes SJ, Gómez N et al: *Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf.* Cell 1992; 71: 335.
46. Clearly ML: *transcription factors in human leukemia.* Cancer Sem 1992; 1992: 89.
47. Huang ME, Ye YC, Chen SR et al: *Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia.* Blood 1988; 72: 567.
48. Grignani F, Dematteis S, Nervi C et al: *Fusion proteins of the retinoid acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukemia.* Nature 1998; 391: 815.
49. Sobulo OM, Borrow, Tomek R et al: *MLL is fused to CBP, a histone acetyltransferase, in therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11; 16)(q23; p13.3).* Proc Natl Acad Sci USA 1997, 94: 8732.
50. Wang J, Saunthararajah Y, Redner RL et al: *Inhibitors of histone deacetylase relieve*

ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells.
Cancer Res 1999; 59: 2766.

51. Golub TD: *The genetics of AML: an update.* The American Society of Hematology. Education program Book. 1999: 102.