

암유전자 HER2/neu 수용체에 대한 단클론항체 및 Peptide Mimetic의 항종양 기전

연세대학교 의과대학 외과학교실 및 *생화학분자생물학교실

박병우 · 김경섭* · 김승일 · 이경식

=Abstract=

The Mechanisms of Antitumor Effect of Anti-p185^{HER2/neu} Monoclonal Antibody and Peptide Mimetic

Byeong-Woo Park, M.D., Kyung-Sup Kim, M.D.*, Seung-Il Kim, M.D. and Kyong Sik Lee, M.D.

Departments of Surgery and *Biochemistry-Molecular Biology,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Anti-p185^{HER2/neu} monoclonal antibody (mAb) that can induce phenotypic reversion and monoclonal antibodies specific for the p185^{HER2/neu} growth factor receptor that are able to diminish its kinase-signaling properties represent a specific advance in the therapy for p185^{HER2/neu}-expressing human cancers. With mAb treatment, down-regulation of p185^{HER2/neu} surface receptors and attenuation of the kinase-signaling properties have been observed and regarded as a basic phenomenon; however, the mechanisms for mAb-induced phenotypic reversion are not clear. **Methods:** We used human tumor-cell lines of SK-BR-3, T6-17, and U373MG. With immunoprecipitation and Western blotting, we investigated the changes in p185^{HER2/neu} receptor phosphorylation and the expression of signal-regulatory proteins (SIRPs) after mAb treatment. To identify the proteins interacting with Tat-binding protein-1 (TBP1), we used the Clontech Gal4 matchmaker two-hybrid system. **Results:** Minimal to moderate reduction in phosphotyrosine (pTyr) content was observed in SK-BR-3 and T6-17 cells with short-term (10~30 minutes) incubation after mAb treatment, but that did not alter total p185^{HER2/neu} receptor density. SIRPs phosphorylation after peptide treatment was increased. With mAb treatment, three proteins were shown to interact with TBP1, and all of the interacting proteins are subunits of proteasome 26S. Collectively, anti-p185^{HER2/neu} mAb or peptide down-regulates the surface receptors and attenuates the kinase signaling, which then both induces higher proteasome activity through increased TBP1 and increases SIRPs expression. **Conclusion:** Increased proteasomal activity may degrade abnormal proteins and increased SIRPs may regulate signal transduction toward the norm. Therefore, activation of a protein-degradation pathway and induction of signal-regulatory proteins may be possible mechanisms for the ultimate anti-tumor effects of the anti-p185^{HER2/neu} mAb or peptide.

Key Words: Anti-p185^{HER2/neu} mAb, Peptide mimetic, Signal-regulatory proteins (SIRPs), Proteasomal activity

중심 단어: 항 p185^{HER2/neu} 단클론항체, 펩티드 미메틱, 신호조절단백, 단백질분해효소 활성화도

서 론

사람의 암유전자 HER2/neu는 쥐에서 발견된 암유전자 neu의 상응암유전자(1)로 유방암이나 난소암조직에서 30% 정도 과발현되고 위암, 장암, 비소세포폐암 및 췌장암 등에서도 과발현되는 것으로 알려져 있으며 불량한 임상적 경과를 취하는 것으로 보고(2,3)되고 있다.

이러한 암유전자의 발현이 불량한 예후를 초래하는 기전은 아직 밝혀지지는 않았지만, 세포주 및 동물 모델의 실험에서 p185^{HER2/neu} 수용체의 과발현은 tumorigenicity 및 종양침윤도(tumor invasiveness)의 증가와 관련이 있고, 종양 전이능의 증가 및 호르몬 또는 항암약제에 대한 감수성의 변화를 유도하는 것으로 보고되었다.(4)

암유전자 neu에 의해 변형된 암세포는 그 표현형(phenotype)을 유지하기 위해서는 지속적인 p185^{neu} 암유전자수용체의 발현이 필요하고(5) 이 암세포에 anti-p185^{neu} 단클론항체를 처치하면 표현형의 역전이 in vitro 및 in vivo 실험에서 보고되어 왔다.(6,7) 더우기 여러 subdomain들에 대한 단클론항체들을 동시에 사용함으로써 p185^{neu} 수용체 과발현 종양성장을 상승적으로 억제하는 효과를 동물실험을 통해 보고하기도 하였다.(8) 따라서 사람의 p185^{HER2/neu}와 반응하는 여러 murine mAb가 개발되었으나 여러 가지 부작용 - human anti-mouse antibody response(9)로 야기되는 치료효과의 감소, allergic response 또는 anaphylaxis(10) - 의 문제 때문에 임상적용이 어려웠다. 그러나 CDR grafting technique을 이용하여 이 murine mAb (4D5)를 humanized (HERCEPTIN)하여(11) 1998년 FDA의 공인을 획득하기에 이르렀고 전이성 유방암 환자의 치료를 위해 임상에 사용할 수 있게 되었다. 그러나 이러한 mAb는 대량생산이 어렵고, 그 분자량이 커 종양의 무혈관 부위(avascular regions)에 침투하는 데 장애를 받을 수 있는 문제는 여전히 남아 있다.(12) 따라서 항원성이 적은 분자량이 작은 단클론항체를 만들기 위한 여러 노력들이 진행되고 있고 그 일환으로 단클론항체와 유사한 mimetic peptide를 개발하여 그 임상적용 가능성을 연구하여 임상적 적용가능성을 보고하기도 하였다.(13)

이러한 단클론항체의 항종양효과에 대한 기전은

아직 완전히 밝혀지지는 않았지만 기본적으로 kinase complex(복합체)의 장애와 암유전자수용체의 하향조절(down-modulation)의 결과로 여겨진다.(6-8)

저자들은 항 p185^{HER2/neu} 단클론항체 또는 mimetic peptide 처치 후 특이적으로 증가하는 유전자와 단백질질을 조사하여 이러한 수용체에 대한 단클론항체의 항종양 기전을 밝히고자 하였다.

실험재료 및 방법

1) Cell line (세포주)

p185^{HER2/neu} 암유전자 수용체가 과발현 된 사람 유방암세포주 SK-BR-3, 사람 뇌종양세포주 U373MG, NIH3T3 세포에 사람 암유전자 HER2/neu를 과발현시킨 T6-17세포주 및 음성대조군으로 p185^{HER2/neu} 발현이 없는 사람 뇌종양세포주 U87MG세포주를 사용하였다. 이들 세포주는 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine 및 1% penicilline/streptomycin를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium을 이용하여 37°C, 95% humidity, and 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하면서 유지하였다.

2) Receptor phosphorylation, immunoprecipitation and Western blotting (수용체인산화, 면역침전법 및 Western blotting)

각각 2×10^7 개 T6-17 암세포 및 SK-BR-3 암세포를 100mm dish에 분주하고 밤새 배양하고 다음날 20 ug/ml의 peptide(13)를 처치하고 37°C에서 지정된 시간 동안 반응시킨 후 배양액을 신속히 제거하고 ice-cold 세척액(PBS with 0.4 mM Na₃VO₄ and 5 mM NaF)으로 2회 세척하였다. PI/RIPA buffer를 1ml 첨가하여 4°C에서 30분 동안 반응시켜 whole cell extracts를 추출하였다. 단백질농도를 보정한 후 항 p185^{HER2/neu} 항체 Ab-4 (Lab Vision, Union City, CA)와 반응시켜 세포표면 수용체를 면역침전시켰고(IP) 이것을 SDS-PAGE에 전기영동시켰고 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 단백질인산화(protein phosphorylation)는 anti-phosphotyrosine mAb PY-20 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)로 Western blot하여 ECL detection system (Amersham)을 이용하여 측정하였다. 이 membrane을 deprobing한 후 rhumAb4D5 (Genentech, USA)로 reprobing하여 세포표면수용체를 검사하였다.

3) Immunoprecipitation, Coimmunoprecipitation and Western blotting for SIRPs

100만 개의 종양세포를 100mm dish에 분주하고 밤새 배양한 후 peptide를 25ug/ml의 농도로 첨가하고 37°C 세포배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 ice-cold PBS (phosphate buffered saline)으로 2회 세척하고 PI/RIIPA buffer를 1ml 첨가하여 4°C에서 30분 동안 처치하여 whole cell extracts를 추출하였다. 단백질농도를 보정한 후 1000 ug의 cell extract를 3 ug의 carboxyl-terminal SHP2 polyclonal antibody (Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA) 또는 anti-SHPS-1 polyclonal antibody와 함께 배양하였다. 이 immunoprecipitates (면역침전물)을 SDS-PAGE에 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 transfer하였고 단백질산화(protein phosphorylation)는 anti-phosphotyrosine mAb PY-20 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)로 Western blot하여 측정하였다. 이 membrane을 deprobing 한 후 polyclonal Ab anti-SIRP@1 단클론항체로 reprobing하여 SIRP의 SHP2와의 관련성을 검사하였다.

4) Protein-protein interaction and in vitro binding assay

B104-1-1 세포주에 anti-neu 항체 처치 후 mRNA

differential display로 TBP1 유전자의 변화된 발현이 관찰되었고 이 유전자를 SKBR3와 U87MG 세포주에 전이(transfection)한 경우 세포성장이 억제됨이 관찰되었다.(14) 따라서 이 TBP1과 상호결합하는 단백을 찾기위해 yeast two-hybrid system을 이용하였다.

Clontech Gal4 Matchmaker two-hybrid system을 이용하여 이용자사용법(user's manual)에 따라 검색과정(screening procedure)을 수행하였다. 요약하면 full length sequence를 이용하여 bait construct pAS2-1-FTBP1과 restriction enzyme BamHI-XhoI로 subcloning한 pAS2-1-NTBP1을 제작하였다. HeLa cell library를 yeast strain HF7c에서 screening하였다. 3 AT를 5 mM 농도로 사용하여 위양성을 방지하고자 하였다. transformation 7일 후 filter-lift assay를 시행하였고 균주 HB101을 이용하여 plasmid를 추출하고 반응을 확인하기 위해 yeast에 retransformation하였다. 최종 screening에서 확인된 clones을 DNA sequencing하였다.

In vitro binding assay: pGEX-5X plasmids (Pharmacia)를 이용하여 GST construct를 만들어 세균주에 발현시킨 다음 glutathione sepharose beads로 분리하였다(이 과정은 kitwp조자의 사용자설명서를 따랐다). 발현단백은 SDS-PAGE analysis에 의해 확인하였고 p27, p40, p42 단백질이 분리되었으며 TNT in vitro translation (IVT) system (Promega)에서 radioactively labeled되었다. Glutathione sepharose beads와 같

Fig. 1. Effects on phosphorylation of p185^{HER2/neu} receptors by mimetic peptide treatment. Comparison of erbB receptor phosphorylation after incubation with peptide (AHNP). Peptide mimetic (20 mg/ml) was incubated with SK-BR-3 human breast cancer cells containing elevated p185^{HER2/neu} and EGFR (A) or T6-17 fibroblasts overexpressing p185^{HER2/neu} (B) for the indicated time periods after which cell lysates were immunoprecipitated with an anti-HER2/neu mAb (Ab-4, Lab Vision, Union City, CA), resolved by 6% SDS-PAGE followed by western blotting with either antiphosphotyrosine (PY-20; upper panels) or an independent anti-HER2/neu antibody (Herceptin, Genentech; lower panels). Minimal to moderate reduction in phosphotyrosine (pTyr) content was observed in both primary cells (A) and in fibroblasts (B) with short-term (10~30 min) incubation with AHNP, which did not alter total p185^{HER2/neu} receptor density (lower panels).

은 양의 GST 또는 GST fusion protein을 IVT 생성물과 함께 300 ml의 binding buffer를 첨가한 후 상온에서 2시간 동안 반응하였다. 반응 후 beads는 침전시켜 binding buffer로 4회 세척한 후 SDS-PAGE를 시행하고 autoradiography를 시행하였다.

결 과

1) Down-regulation of p185^{HER2/neu} receptor phosphorylation by peptide treatment

HER2/neu 수용체 과발현 SK-BR-3 세포(Fig. 1A) 및 T6-17 세포(Fig. 1B)에 peptide를 각각 지정된 시간동안 반응시킨 후 peptide의 p185^{HER2/neu} 수용체 인산화에 대한 영향을 조사하였다. p185^{HER2/neu} 수용체 pTyr은 단기간(10~30분) peptide 처치 후 감소하였으나 장시간 처치한 경우 유의한 감소는 없었다. 이는 mimetic peptide역시 수용체 pTyr의 감소를 통하여 활성도를 나타낼 수 있음을 시사하였다.

2) SIRP activation and differential binding to SHP2 by peptide treatment

단클론항체 또는 mimetic peptide 처치 후 Receptor Tyrosine Kinase (RTK) signaling modulation에 SIRPs activation 이 관여하는 지 알아보기 위하여 SIRPs phosphorylation assay 를 시행하였다. Peptide 처치 후 SK-BR-3 세포주에서는 SIRP 인산화의 변화는 미미하게 증가하였으나 U373MG 세포주에서 현저한 SIRP 인산화의 증가를 보였다(Fig 2A). anti-SIRP 항체로 reprobing 하였을 때 SHPTP2 항체에 의해 SIRPs (-90~120 kd)의 doublet이 관찰되었다. 인산화된 SIRP의 SHP2에 결합은 peptide 처치군과 비처치군에서 차이가 없었으나 작은 분자량의 SIRP의 SHP2에의 결합은 단클론항체 또는 peptide1 처치 후 유의하게 증가하였다(Fig 2B).

3) Protein-protein interaction and in vitro binding assay with TBPI

HeLa cell cDNA library와 yeast two-hybrid system을 이용하여 TBPI 단백질과 상호작용하는 3가지 단백질 - p27 (15), p40 (16) 및 p42(15,17)를 확인하였다(Fig 3). 이들 p27과 p42 단백질은 ubiquitinated cell degradation에 관여하는 proteasome 26S의 modulator의 구성

Fig. 2. SIRP Activation and differential binding to SHP2 by mimetic peptide. To examine whether the SIRPs activation involve in the modulation of RTK signaling by mimetic peptide or mAb, we measured SIRPs phosphorylation by coimmunoprecipitate SIRPs with anti-SHP2 antibody. Peptide treatment increased SIRP phosphorylation in U373MG cells, although there is minimal increase in SK-BR-3 cells (A). Reprobing the blot with anti-SIRP antibody revealed doublet of SIRPs (-90~120 kD) were pulled down by SHPTP2 antibody. Binding of the phosphorylated form of SIRP (upper band) to SHP2 was comparable in treated and non-treated cells. However, the binding of lower molecular size SIRP to SHP2 was significantly elevated by peptide treatment (B).

단위이고 p40와 p42단백은 이 proteasome의 활성을 조절하는 regulatory proteasome PA700의 구성단위이다. 또 TBPI 단백질 역시 proteasome 26S modulator 및 PA700의 구성단위이다. 따라서 anti-p185^{neu} 항체 처치 후 발현이 변화된 TBPI 유전자는 proteasome 활성도에 변화를 초래하여 세포표면 수용체에 영향을 주어 암세포의 성장을 억제함을 시사하였다.

고 찰

p185^{HER2/neu} 수용체를 과발현하는 종양은 고도 악성종양의 표현형으로 조기재발 등 불량한 예후와 관계있다고 알려져 있다.(2,3) 세포주 및 동물 모델의 실험에서 p185^{HER2/neu} 수용체의 과발현은 tumorigenicity 및 종양침윤도(tumor invasiveness)의 증가와 관련이 있고, 종양의 전이능의 증가 및 호르몬 또는 항암약제에 대한 감수성의 변화를 유도하는 것으로

Fig. 3. TBP1-p27, -p40, and -p42 interaction in vitro. GST fusion proteins, GST-FTBP1, GST-NTBP1, and GST itself, were synthesized in bacteria. Full length p27, p40, and p42 proteins (as indicated under each figure), were in vitro translated and labeled with ³⁵S-cysteine. The GST fusion proteins were loaded on glutathione sepharose beads and mixed with in vitro translation products, followed by precipitation, washing and SDS-PAGE. p27 was precipitated by GST-FTBP1, but not by GST-NTBP1 or GST alone. Both p40 and p42 were precipitated by GST-FTBP1 and by GST-NTBP1, but not by GST alone.

보고되었다.(4)

p185^{neu} 단클론항체(6-8) 및 p185^{HER2/neu} (HERCEPTIN) 단클론항체(11) 및 peptide(13)가 동물실험에서 항종양효과가 있음을 보여왔으나 이러한 단클론항체나 mimetic peptide의 항종양효과의 기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았으며 부분적으로 수용체의 하향조절과 kinase complex의 무력화(disabling)의 결과가 관련있는 것으로 알려져 있다.(6-8) 본 연구에서도 peptide 처치 후 수용체 pTyr 감소(Fig. 1)를 보인 것은 mimetic peptide 역시 수용체 특이적으로 작용하고 수용체의 하향조절을 통한 tyrosine kinase 억제가 주 작용기전임을 시사한다.

Signal-Regulatory proteins (SIRPs, or SHPS-1, 신호 조절단백)은 막당단백(membrane glycoproteins) 군으로 adaptor/effector SHP2의 putative substrates인 데, 여러 가지 receptor kinase의 활성화를 조절하는 것으로 알려져 있고,(18,19) 또 성장호르몬수용체를 포함한 여러 cytokine receptors를 위한 signaling molecule로도 알려져 있다.(20) 가장 잘 알려진 형태인 SIRP@1은 여러 RTKs - EGFR, PDGF receptors, insulin receptor - 신호전달에 negative regulators로 여겨지고

있고 인산화를 통하여 기능을 하게 되며 SHP2와 연관된다.(18,19) Tyrosine 인산화는 SIRPs 기능과 관련이 있고 온전한(intact) SIRP는 EGF 또는 insulin에 의한 신호전달을 억제한다.(19) 사람 neuroglioblastoma에서 활성화된 erbB 수용체복합체의 무력화(disabling)는 SIRP 기능을 활성화시키고 이는 transformation과 유전자손상에 대한 감수성을 조절한다(personal communication with Wu et al). 이러한 결과는 본 연구의 결과 보인 mimetic peptide 처치 후 SIRP 인산화의 증가와 SIRP의 SHP2와의 결합의 증가(Fig. 2)를 지지하는 것으로 수용체에 대한 항체의 처치로 RTKs의 무력화를 유도하는 경우 SIRP의 활성화를 통해 세포성장을 조절하는 기전을 시사한다.

박등은 B104-1-1 세포주에 anti-neu 항체 처치 후 mRNA differential display로 TBP1 유전자의 변화된 발현을 관찰하였고 이 유전자를 SKBR3와 U87MG 세포주에 전이(transfection)한 경우 세포성장이 억제됨을 보고하였다.(14) 이 TBP1은 HIV tat protein에 결합하는 단백질로 발견되어, 과발현하는 경우 tat의 하향조절에 관여하는 것으로 알려져 있다.(21) 특히 Nakamura등은 쥐의 TBP1의 전체를(full length of mu-

rine form of TBP1) 분리하여 그 기능이 tat-mediated transactivation을 억제하는 것임을 증명하였다.(22) 이상의 결과를 보아 TBP1단백은 전사(transcription)를 억제하는 역할을 하는 것으로 여겨진다. 본 연구에서 이 TBP1단백은 p27,(15) p40,(16) p42(15,17)와 상호결합하는 것이 관찰되었는데(Fig. 3), p40와 p42단백은 단백질분해에 관여하는 proteasome의 활성을 조절하는 regulatory proteasome PA700의 구성단위이고, p27과 p42는 proteasome 26 S의 modulator의 구성단위로 PA700와 결합하여 proteasome의 활성을 조절하는데 관여한다. TBP1 단백질 역시 proteasome 26S의 조절자(modulator) 및 PA700의 구성단위로 proteasome의 활성조절에 관여하는 것으로 여겨진다.

원시핵세포나 성숙핵세포 모두 세포내 단백질을 제거하는(degrading) 효율적인 체계를 지니고 있는데, ATP-dependent proteases가 이러한 비정상적인 단백질이나 생리적으로 중요한 단백질의 제거에 중요한 역할을 한다.(23) 성숙핵세포의 경우 선택적 단백질분해는 더 복잡한 과정을 통해 이루어지는 데, 26S proteasome이 ubiquitin(Ub)-lysosome conjugates를 제거하게 된다.(24) proteasome은 단백질분해와 관련된 여러 가지 세포내 과정(processes) - 여러 가지 세포내 단백질의 회전(turnover),(25) 비정상 단백질의 빠른 제거,(26) 세포주기 와 전사에 중요한 조절단백량의 일시적 감소,(27,28) 전사인자 NF- κ B의 단백질분해활성,(29) 및 MHC class I 단백질에 의한 항원의 processing(30) -에 중요한 역할을 수행한다. 따라서 p185^{neu} 과발현 B104-1-1세포주에 anti-p185^{neu} 단클론항체 처치 후 선택적으로 발현이 증가하는 TBP1은 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 proteasome의 활성을 조절하는 PA700 및 modulator complexes의 구성단위인 p27, p40 및 p42와 결합하여 proteasome을 활성화시키으로써 세포내 단백을 조절하여 종양세포의 증식을 억제하는 것으로 사료된다.

결 론

p185^{HER2/neu} 과발현 종양에 단클론항체 또는 mimetic peptide를 처치하는 경우 세포표면 수용체의 감소와 RTK pathway를 억제하는 동시에 signal-regulatory protein (SIRPs)의 활성화를 통해 신호전달을 조절하고, TBP1 발현의 증가를 통해 proteasome의 활

성을 증가시켜 종양세포의 성장을 억제에 관여하는 것으로 사료된다.

향후 지속적인 기전의 연구를 통하여 암유전자발현에 따른 종양의 생물학적 특성을 이해함으로써 임상적 적용이 가능한 새로운 치료법과 치료제의 개발이 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 1984;312:513-516.
- 2) Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-182.
- 3) Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-712.
- 4) Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, Beryt M, Pietras RJ, Slamon DJ. The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 1997;15:537-547.
- 5) Dougall WC, Qian X, Peterson NC, Miller MJ, Samanta A, Greene MII. The neu-oncogene: signal transduction pathways, transformation mechanisms and evolving therapies. *Oncogene* 1994;9:2109-2123.
- 6) Drebin JA, Link VC, Stern DF, Weinberg RA, Greene MI. Down-modulation of an oncogene protein product and reversion of the transformed phenotype by monoclonal antibodies. *Cell* 1985;41:697-706.
- 7) Drebin JA, Link VC, Weinberg RA, Greene MII. Inhibition of tumor growth by a monoclonal antibody reactive with an oncogene-encoded tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:9129-9133.
- 8) Drebin JA, Link VC, Greene MI. Monoclonal antibodies reactive with distinct domains of the neu oncogene-encoded p185 molecule exert synergistic anti-tumor effects in vivo. *Oncogene* 1988;2:273-277.
- 9) Schroff RW, Foon KA, Beatty SM, Oldham RK, Morgan AC Jr. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res* 1985;45:879-885.
- 10) Isaacs JD. The antiglobulin response to therapeutic antibodies. *Semin Immunol* 1990;2:449-456.
- 11) Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendel-

- sohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 1998;58:2825-2831
- 12) Jain RK. Delivery of novel therapeutic agents in tumors: physiological barriers and strategies. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:570-576.
 - 13) Park BW, Zhang HT, Wu C, Berezov A, Zhang X, Dua R, et al. Rationally designed anti-HER2/neu peptide mimetic disables P185HER2/neu tyrosine kinases in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 2000;18:194-198.
 - 14) Park BW, O'Rourke DM, Wang Q, Davis JG, Post A, Qian X, et al. Induction of the Tat-binding protein 1 gene accompanies the disabling of oncogenic erbB receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6434-6438.
 - 15) DeMartino GN, Proske RJ, Moomaw CR, Strong AA, Song X, Hisamatsu H, Tanaka K, Slaughter CA. Identification, purification, and characterization of a PA700-dependent activator of the proteasome. *J Biol Chem* 1996;271:3112-3118.
 - 16) Tsurumi C, DeMartino GN, Slaughter CA, Shimbara N, Tanaka K. cDNA cloning of p40, a regulatory subunit of the human 26S proteasome, and a homolog of the Mov-34 gene product. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;210:600-608.
 - 17) Bauer VW, Swaffield JC, Johnston SA, Andrews MT. CADp44: a novel regulatory subunit of the 26S proteasome and the mammalian homolog of yeast Sug2p. *Gene* 1996;181:63-69.
 - 18) Kharitonov A, Chen Z, Sures I, Wang H, Schilling J, Ullrich A. A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors. *Nature* 1997;386:181-186.
 - 19) Takada T, Matozaki T, Takeda H, Fukunaga K, Noguchi T, Fujioka Y, et al. Roles of the complex formation of SHPS-1 with SHP-2 in insulin-stimulated mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 1998;273:9234-9242.
 - 20) Stofega MR, Wang H, Ullrich A, Carter-Su C. Growth hormone regulation of SIRP and SHP-2 tyrosyl phosphorylation and association. *J Biol Chem* 1998;273:7112-7117.
 - 21) Nelbock P, Dillon PJ, Perkins A, Rosen CA. A cDNA for a protein that interacts with the human immunodeficiency virus Tat transactivator. *Science* 1990;248:1650-1653.
 - 22) Nakamura T, Tanaka T, Takagi H, Sato M. Cloning and heterogeneous in vivo expression of Tat binding protein-1 (TBP-1) in the mouse. *Biochim Biophys Acta* 1998;1399:93-100.
 - 23) Maurizi MR. Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia* 1992;48:178-201.
 - 24) Hough R, Pratt G, Rechsteiner M. Ubiquitin-lysosome conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J Biol Chem* 1986;261:2400-2408.
 - 25) Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994;78:761-771.
 - 26) DeMartino GN, McCullough ML, Reckelhoff JF, Croall DE, Ciechanover A, McGuire MJ. ATP-stimulated degradation of endogenous proteins in cell-free extracts of BHK 21/C13 fibroblasts. A key role for the proteinase, macropain, in the ubiquitin-dependent degradation of short-lived proteins. *Biochim Biophys Acta* 1991;1073:299-308.
 - 27) Murray A. Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell* 1995;81:149-152.
 - 28) Chen P, Hochstrasser M. Biogenesis, structure and function of the yeast 20 S proteasome. *EMBO J* 1995;14:2620-2630.
 - 29) Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 1994;78:773-785.
 - 30) Goldberg AL, Rock KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 1992;357:375-379.