

ANÀLISI DE LA VEHICULITZACIÓ DE COMPOSTOS METÀL·LICS COM A AGENTS ANTITUMORALS I DE LA FAMÍLIA HER-EGF EN LA RESISTÈNCIA ALS TRACTAMENTS ONCOLÒGICS

Dolors Carrion i Salip

Dipòsit legal: Gi. 2009-2014

<http://hdl.handle.net/10803/284585>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Anàlisi de la vehiculització de compostos metàl·lics com a agents antitumorals i de la família HER-EGF en la resistència als tractaments oncològics

**Anàlisi de la vehiculització
de compostos metàl·lics
com a agents antitumorals
i de la família HER-EGF en la
resistència als tractaments
oncològics**

Dolors Carrion i Salip 2014

Programa de Doctorat de Ciències Experimentals
i Sostenibilitat de la Universitat de Girona

Dirigida pel Dr. Rafael de Llorens Duran
i la Dra Anna Massaguer Vall-Ilovera

Memòria presentada per optar al títol de doctora
per la Universitat de Girona



Rafael de Llorens i Duran i Anna Massaguer i Vall-llovera, professors titulars de la Universitat de Girona

CERTIFIQUEN

Que el treball titulat “Anàlisi de la vehiculització de compostos metàl·lics com a agents antitumorals i de la família HER-EGF en la resistència als tractaments oncològics”, que presenta la Dolors Carrión i Salip per a l’obtenció del títol de Doctora per la Universitat de Girona, ha estat realitzat sota la nostra direcció.

Vist-i-plau

El director de Tesi

Vist-i-plau

La directora de Tesi

Dr Rafael de Llorens i Duran

**Dra Anna Massaguer
i Vall-llovera**

Dedicatòria

Ara que el període de doctorat ha arribat a la seva fi, em fa molta il·lusió poder donar les gràcies a totes aquelles persones que m'heu ajudat i m'heu fet costat durant tots aquests anys. És una tasca difícil, però, perquè sou molts els que heu estat al meu costat donant-me la mà i estirant-me-la fort per continuar endavant quan ho he necessitat, i no em voldria deixar a ningú. Aquestes línies estan dedicades a tots vosaltres.

En primer lloc, et vull agrair, Rafa, que em donessis l'oportunitat d'entrar a treballar en el grup de Bioquímica del Càncer i l'ajuda que m'has donat durant tot el temps que he estat al vostre laboratori. A tu, Anna, gràcies per haver-me anat guiant en el món de la recerca i per la teva implicació i dedicació en la correcció de tots els resultats que hem anat obtenint. Sense tu, arribar al final d'aquest camí no hagués estat possible.

Gràcies, Rosa, pels teus consells en els moments de dubte i pel teu suport quan l'he necessitat. A en Javier, la Cristina, la Teresa i la Glòria de l'IdibGi, us agraeixo molt la vostra col·laboració en moments clau de la meva recerca. També vull donar un agraïment molt especial a la Virtudes, en Vicente i la Flavia: moltes gràcies per la síntesi dels compostos que hem estat estudiant durant tant de temps, per haver-me fet sentir tant bé cada vegada que ens hem trobat i que us he necessitat, i per la vostra col·laboració en la correcció de la part química d'aquesta tesi.

Fer la tesi a Girona m'ha permès conèixer i estar envoltada d'un munt de gent meravellosa que m'han ajudat a somriure davant dels problemes del laboratori i que m'han fet més fàcil suportar el puja i baixa anímic de tots aquests anys.

Que m'adoptessin a EECC₂ ha estat una de les millors coses que m'ha passat mentre he estat a la UdG: barbarismes escrits darrera una porta, decoració nadalenca assassina, tardes de divendres poc productives al laboratori però molt productives en salut (considerant que riure és una font de salut inqüestionable)... Gràcies, gràcies i mil gràcies: a en David, la Clara, la Cris, la Gatxi, l'Imma, la Montse i la Sara, per haver fet que, compartir un espai petitó com era EECC₂, fos un verdader plaer. Més tard, EECC₂ s'ha reconvertit en Espais BQ. Ha sigut tot un canvi que no he pogut disfrutar gaire, però el temps que he passat en aquest nou espai amb els companys de BQ105 i BQ107, també ha estat molt especial: Anna V, Clara, Cris, David, Glòria, Imma, Mariona, Marta G, Montse, Santi, Txell i Vero. Gràcies per aquest temps, potser curt, però tan intens i divertit; gràcies per tots aquests moments. També vull expressar el meu agraïment a totes les companyes del laboratori de BQ105. Treballar amb vosaltres, Ari, Ariadna, Clara, Cris, Esther, Emilie, Marta G, Marta P, Sònia, Sílvia i Txell, compartint pipetes, rialles, westerns, xerrades, campanes, cultius, brigades de neteja... ha sigut molt enriquidor i agradable i ha fet molt més fàcil el dia a dia al laboratori. Amb algunes de vosaltres, però, he compartit moltes més coses que les experiències i anècdotes d'un despatx o d'un laboratori: esmorzars, sortides, berenars, sentiments... Clara, Mari Cris, Montse, Marta P i Sònia: gràcies per ser com sou, per la vostra amistat i per haver-me fet sentir tan bé al vostre costat.

El dia a dia a la uni, però, no només ha estat fantàstic a EECC₂, espais BQ i al Lab105. La resta de becaris, professors i companys amb qui hem compartit els passadissos, els laboratoris, els dinars, la UdG.doc i moltes altres activitats, es mereixen un reconeixement enorme. Aquí, podria fer una llista immensa i m'agradaria no deixar-me a ningú, però només us anomenaré a uns quants tot i que vull que sapiguen que tots heu estat (i continueu estan) molt presents en la meua vida: Maria R, Marçal, Olga, Pau, Roger Verdaguer, Anna F, Estela, Eva B,

Eva T, Isabel, Marc Y, Jess, Pere, Roger Vilà, Àlex nen, Arantxa, Ari V, Joan C, Imma N, Marc L, Mireia F, Mireia L, Núria P, Olaya, Rosalia, Tri, Àlex nena, David D, Luis, Vicky, Roser M, Albert, Benito, Gemma, Helena, M^a Helena, Joan N, Josep, Lolo, Meri, Miquel, Mireia P, Sergi... Tots vosaltres amb els tupperes, sortides nocturnes, samarretes taronges, regals de fi d'etapa, xiruques, sopars, pancartes i moltes coses més, m'arrenqueu un somriure cada vegada que ho recordo. Moltes gràcies!

A fora de la uni, també he tingut sempre a molta gent amb qui hi puc comptar, que m'acompanyen pas a pas en el meu camí i a qui vull agrair tot el que hem compartit durant aquest temps. Als meus amics de Figueres, Fortià i companys de farmàcia: Àlex, Lídia, Manel, Montse, Narcís, Àgnès, David, Clara, Nadina, Sílvia, Isaac, Maica, Anna J, Bet, Miquel, Montse S, Núria, Roser, Ari, Cristian C, Judit, Jordi, Montse S, Núria S, Noé, Sumi, Xavi F, Xavi R, Cristian L... i, en especial, a l'Isaac, pel disseny de la portada i de l'interior de la tesi, a en Joan (o en Xan) per convidar-me a formar part d'un projecte que m'omple i em dóna tant com és "Els Xanqueta", i a la Gemma, per tots aquests anys d'amistat compartida i per tantes xerrades i rialles inacabables. Gràcies.

I finalment, a tota la gent més propera. Gràcies a tots els què, poc a poc, heu anat entrant a formar part de la meua família: Laura, Berta, Núria, M^a Rosa, Irene, Pol, Montse, Pere, Gerard, Júlia, Albert, Maria, Laura i Jordi. Gràcies per estar al meu costat i per tots els moments d'alegria que em doneu. A vosaltres, papes, i a en Gerard (el meu germanet preferit) que mai m'heu deixat de fer costat en tot aquest camí, obsequiant-me sempre d'una confiança inqüestionable i animant-me en cada decisió que semblava que prenia, valorant-ne pros i contres i demostrant-me, sempre, el vostre suport i estima. I a tu, Francesc: el meu amic i company, no només de pis, sinó de moltes altres coses, de gairebé tot. Gràcies per estar sempre amb mi (malgrat que a vegades

pugui costar estar-hi), agafar-me la mà quan saps que necessito sentir-la agafada, compartir amb mi tantes rialles, eixugar-me tantes llàgrimes i donar-me el teu suport incondicional durant tot aquest temps. Amb tu i per tu, sempre. Gràcies.

Agraïments

Vull agrair al Ministerio de Educación y Ciencia que em concedissin la beca predoctoral FPU (beca AP2007-01953). També vull agrair a l'Institut de Salut Carlos III (beques RD06/0020/0041, RD06/0020/0028), a la Universitat de Girona (beca PUG2007A/10) i a la Generalitat de Catalunya (beca 2009SGR208) que ens concedissin fons per a la realització d'aquest projecte.

Publicacions derivades de la tesi

La recerca científica realitzada al llarg d'aquesta Tesi Doctoral ha derivat en cinc publicacions científiques. En la tesi es presenten els resultats recollits en els dos primers articles, juntament amb un article que està en fase de preparació.

1. Barragán F, Carrion-Salip D, Gómez-Pinto I, González-Cantó A, Sadler PJ, de Llorens R, Moreno V, González C, Massaguer A, Marchán V. Somatostatin subtype-2 receptor-targeted metal-based anticancer complexes. *Bioconjug Chem.* 2012 Sep 19;23(9):1838-55. IP: 4.58
2. Carrion-Salip D, Panosa C, Menendez JA, Puig T, Oliveras G, Pandiella A, De Llorens R, Massaguer A. Androgen-independent prostate cancer cells circumvent EGFR inhibition by overexpression of alternative HER receptors and ligands. *Int J Oncol.* 2012 Sep;41(3):1128-38. IP: 2.657
3. Oliveras-Ferraros C; Massaguer Vall-Llovera A; Vazquez-Martin A; Carrion-Salip D; Queralt B; Cufí S; Martin-Castillo B; Bosch-Barrera J; Brunet J; De Llorens R and Menendez JA. Transcriptional upregulation of HER2 expression in the absence of HER2 gene amplification results in cetuximab resistance that is reversed by trastuzumab treatment. *Oncol Rep.* 2012 Jun;27(6):1887-92. IP: 2.297

4. Oliveras-Ferraros C, Massaguer Vall-Llovera A, Carrion-Salip D, Vazquez-Martin A, Cufí S, Queralt B, Martin-Castillo B, Brunet J, de Llorens R, Menendez JA. Evolution of the predictive markers amphiregulin and epiregulin mRNAs during long-term cetuximab treatment of KRAS wild-type tumor cells. *Invest New Drugs*. 2012 Apr;30(2):846-52. IP: 3.498

5. Grau-Campistany A, Massaguer A, Carrion-Salip D, Barragán F, Artigas G, López-Senín P, Moreno V, Marchán V. Conjugation of a Ru(II) Arene Complex to Neomycin or to Guanidinoneomycin Leads to Compounds with Differential Cytotoxicities and Accumulation between Cancer and Normal Cells. *Mol Pharmacol*. 2013 May 6;10(5):1964-76. IP: 4.411

Tots els articles els podreu trobar adjuntats al final de la tesi, a l'Annex 1.

Abreviatures

ADT	<i>androgen deprivation therapy</i>
AIPC	<i>androgen-independent prostate càncer</i>
AMF	<i>amphiregulin</i>
AR	<i>androgen receptor</i>
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>
bcl-2	<i>b-cell lymphoma 2</i>
BTC	<i>betacellulin</i>
CPT	<i>camptothecin</i>
CRPC	<i>castration-resistant prostate càncer</i>
Ct	<i>threshold cycle</i>
Ctr1	receptor de coure
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>
DNA-PK	<i>DNA- protein kinase</i>
DOTA	<i>1,4,7,10-tetraazaciclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid</i>
DOX	<i>doxorubicin</i>
DTPA	<i>diethylenetriaminepentaacetic acid</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR/HER1	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EMA	<i>European medicines evaluation agency</i>

EPG	<i>epigen</i>
EPR	<i>epiregulin</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
FDA	<i>food and drug administration</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
FR	<i>folate receptor</i>
GBM	<i>glioblastoma multiforme</i>
GSH	<i>glutathione</i>
GH	<i>growth hormone</i>
HB-EGF	<i>heparin-binding epidermal growth factor</i>
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
HER2/ErbB2/Neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HER3/ErbB3	<i>human epidermal growth factor receptor 3</i>
HER4/ErbB4	<i>human epidermal growth factor receptor 4</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HGFR	<i>hepatocyte growth factor receptor</i>
HMG	<i>high mobility group</i>
HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>
HRPC	<i>hormone-resistant prostate cancer</i>
IC_{50}	<i>inhibitory concentration 50</i>
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma - mass spectrometry</i>
Ig	<i>immunoglobulin</i>

IGF	<i>insulin growth factor</i>
IGFR	<i>insulin growth factor receptor</i>
IL-2	<i>interleukin-2</i>
INF- α	<i>interferon-α</i>
LH-RH	<i>luteinizing hormone- releasing hormone</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MMR	<i>mismatch repair</i>
MTT	<i>3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenil-tetrazolium bromide</i>
MTX	<i>methotrexate</i>
NER	<i>nucleotide excision repair</i>
NRG	<i>neuregulin</i>
NSCLC	<i>non-small cell lung carcinoma</i>
OCT	<i>octreotide</i>
PCa	<i>prostate cancer</i>
PCFT	<i>proton-coupled folate transportar</i>
PDFGR $\alpha\beta$	<i>platelet-derived growth factor receptor $\alpha\beta$</i>
PEG	<i>polietilenglicol</i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PKB	<i>protein kinase B</i>
pRB	<i>retinoblastoma protein</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PTX	<i>paclitaxel</i>

RFC	<i>reduced folate carrier</i>
SERM	<i>selective estrogen receptor modulator</i>
SST/ SMS	<i>somatostatin</i>
SSTR	<i>somatostatin receptor</i>
TBP	<i>TATA binding protein</i>
TGF- α	<i>tumor growth factor α</i>
TKI	<i>tyrosine kinase inhibitors</i>
TORC1	<i>target of rapamycin complex 1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
WHO	<i>World Human Organization</i>

Índex de figures

	Pàgina
Figura 1.1	17
Figura 1.2	29
Figura 1.3	31
Figura 1.4	36
Figura 1.5	37
Figura 1.6	40
Figura 1.7	43
Figura 1.8	45
Figura 1.9	47
Figura 1.10	48
Figura 1.11	50
Figura 1.12	52
Figura 1.13	59
Figura 1.14	64
Figura 3.1	76
Figura 3.2	77
Figura 3.3	78
Figura 3.4	79
Figura 3.5	91
Figura 4.1	106
Figura 4.2	107
Figura 4.3	107
Figura 4.4	108
Figura 4.5	109
Figura 4.6	111
Figura 4.7	112
Figura 4.8	113
Figura 4.9	114
Figura 4.10	115
Figura 4.11	118
Figura 4.12	119

Figura 4.13	120
Figura 4.14	121
Figura 4.15	122
Figura 4.16	124
Figura 4.17	126
Figura 4.18	127
Figura 4.19	130
Figura 4.20	132
Figura 4.21	133
Figura 4.22	135
Figura 4.23	136
Figura 4.24	137
Figura 4.25	139
Figura 4.26	140
Figura 4.27	141
Figura 4.28	142
Figura 4.29	144
Figura 4.30	145
Figura 4.31	148
Figura 4.32	150
Figura 4.33	152
Figura 4.34	153

Índex de taules

	Pàgina
Taula 1.1	23-25
Taula 1.2	44
Taula 4.1	116
Taula 4.2	128

Índex de continguts

Dedicatòria	i
Publicacions derivades de la tesi.....	v
Abreviatures	vii
Index de figures.....	xi
Index de taules.....	xiii
Index de continguts.....	xv
Resum.....	1
Resumen	5
Summary.....	9
1. Introducció	13
1.1 El càncer.....	15
1.2 El tractament oncològic.....	17
1.2.1 El tractament quirúrgic del càncer	18
1.2.2 La radioteràpia oncològica	18
1.2.3 La teràpia farmacològica antineoplàstica.....	19
1.3 La vehiculització de fàrmacs en el tractament oncològic	27
1.3.1 Els compostos metàl·lics com a fàrmacs antitumorals.....	27
1.3.2 Molècules vehiculitzadores de fàrmacs antitumorals	39
1.4 La família HER-EGF en la resistència als tractaments oncològics	49

1.4.1	La família HER-EGF	49
1.4.2	Teràpies dirigides a inhibir la família HER-EGF en el tractament oncològic	53
1.4.3	Resistència a les teràpies dirigides a inhibir la família HER-EGF	56
1.4.4	El càncer de pròstata	62
2.	Hipòtesi i objectius	67
3.	Materials i mètodes	73
3.1	Vehiculització de compostos metàl·lics com a nova estratègia antitumoral	75
3.1.1	Vehiculització de compostos metàl·lics de Pt(II), Ru(II) i Os(II) a través de la unió a anàlegs de l'octreotide	75
3.1.2	Vehiculització de compostos metàl·lics de Pt(IV) a través de la unió a anàlegs de folat	90
3.2	Resistència de les cèl·lules tumorals de càncer de pròstata a les teràpies dirigides a inhibir la família HER-EGF	94
4.	Resultats	103
4.1	Vehiculització de compostos metàl·lics com a nova estratègia antitumoral	105
4.1.1	Vehiculització de compostos metàl·lics de Pt(II), Ru(II) i Os(II) a través de la unió a anàlegs de l'octreotide	105
4.1.2	Vehiculització de compostos metàl·lics de Pt(IV) a través de la unió a anàlegs de folat	134
4.2	Resistència de les cèl·lules tumorals de càncer de pròstata a les teràpies dirigides a inhibir la família HER-EGF	138
5.	Discussió.....	155
5.1	Vehiculització de compostos metàl·lics com a nova estratègia antitumoral	157

5.1.1 Vehiculització de compostos metàl·lics de Pt(II), Ru(II) i Os(II) a través de la unió a anàlegs de l'octreotide	157
5.1.2 Vehiculització de compostos metàl·lics de Pt(IV) a través de la unió a anàlegs de folat.....	170
5.2 Resistència de les cèl·lules tumorals de càncer de pròstata a les teràpies dirigides a inhibir la família HER-EGF.....	175
6. Conclusions.....	183
7. Bibliografia	189
8. Annex 1	225

Resum

En l'actualitat, la teràpia farmacològica antineoplàstica és un dels pilars del tractament oncològic. Tot i això, molts dels agents quimioterapèutics tenen un ús limitat com a conseqüència dels efectes adversos que produeixen i de les resistències que desenvolupen les cèl·lules tumorals a aquests tractaments. Això ha provocat que en els darrers anys s'hagi estat treballant extensament amb l'objectiu de conèixer millor i poder minimitzar aquestes limitacions. Una de les estratègies que s'ha desenvolupat per millorar la selectivitat per les cèl·lules tumorals, incrementar la concentració de fàrmac al seu interior i disminuir els efectes adversos en els pacients, es basa en unir fàrmacs amb activitat antitumoral a agents vehiculitzadors que tenen els seus receptors sobreexpressats en aquests tipus cel·lulars. En aquest context, la primera part d'aquesta tesi s'ha basat en sintetitzar i caracteritzar conjugats formats per complexes metàl·lics amb potencial activitat antitumoral i molècules vehiculitzadores, en concret, anàlegs de l'octreotide o del folat.

Pel què fa als conjugats constituïts per un anàleg de l'octreotide, s'ha estudiat la seva solubilitat, estabilitat i capacitat d'unió al DNA i s'ha avaluat la seva activitat biològica. Els resultats han demostrat que la majoria d'aquests conjugats tenen la capacitat d'unir-se al DNA però que només cinc dels set conjugats analitzats presenten unes propietats de solubilitat i estabilitat que permeten la seva posterior aplicació en cultius cel·lulars. D'altra banda, l'estudi de l'activitat citotòxica d'aquests compostos ha posat de manifest que la unió entre el pèptid vehiculitzador i el complex metàl·lic comporta una pèrdua de l'activitat inicial del complex i ha demostrat, a més, que cal que els complexos

metàl·lics tinguin una elevada activitat citotòxica per tal que els conjugats siguin actius. De fet, només un dels conjugats analitzats, el conjugat conformat per un complex de ruteni **Cj7**, presenta una bona activitat antitumoral. Aquest conjugat, però, no té capacitat d'interaccionar amb el DNA, la qual cosa indica que actua a través d'un altre mecanisme d'acció. També s'ha comprovat que l'anàleg de l'octreotide utilitzat d'agent vehiculitzador internalitza en les cèl·lules tumorals seguint una cinètica paral·lela a la de l'octreotide però que s'acumula menys al seu interior, fet que s'ha relacionat amb la menor afinitat que presenta pels receptors de la somatostatina. La idoneïtat de l'anàleg d'octreotide com a agent vehiculitzador s'ha confirmat en observar que l'acumulació de ruteni a l'interior de les cèl·lules és més elevada pel conjugat **Cj7** que pel complex metàl·lic sense conjuguar, mostrant que la unió al pèptid provoca un efecte positiu en la internalització del complex metàl·lic. També s'ha caracteritzat la localització intracel·lular d'aquest pèptid, indicant que principalment s'acumula al citoplasma de la cèl·lula però que arriba al nucli en una petita proporció, fet que l'avalua com a portador biològic d'agents antitumorals dirigits a molècules del citosol i del nucli cel·lulars. Finalment, l'anàlisi de l'activitat del conjugat **Cj7** en línies cel·lulars amb diferents nivells d'expressió del receptor d'octreotide ha demostrat que l'efecte citotòxic del conjugat és directament proporcional a l'expressió del seu receptor, la qual cosa indica que el pèptid confereix selectivitat d'acció al complex de ruteni.

Pel que fa al conjugat constituït per un anàleg de l'àcid fòlic, el seu efecte com a agent vehiculitzador s'ha analitzat unint-lo a un derivat del picoplatí a través d'una molècula de polietilenglicol. De nou, s'ha vist que aquesta unió provoca una pèrdua de l'activitat citotòxica del complex metàl·lic, el qual intrínscament presentava una activitat citotòxica moderada. Aquest fet reforça la importància d'utilitzar complexos metàl·lics amb una elevada activitat citotòxica inicial per

tal que el conjugat sintetitzat també sigui actiu. La disminució en l'activitat detectada pel conjugat, també s'ha atribuït a la molècula de polietilenglicol utilitzada per tal de millorar la solubilitat del conjugat final, ja que pot haver limitat l'alliberació del complex metàl·lic. Aquest resultat ha indicat que explorar noves molècules enllaçadores també és important per tal de millorar l'activitat d'aquests tipus de conjugats.

Per altra banda, actualment hi ha un gran interès en conèixer els mecanismes a través dels quals les cèl·lules tumorals esdevenen resistents als agents antitumorals. La segona part d'aquesta tesi s'ha centrat en l'estudi dels mecanismes de resistència a les teràpies dirigides a inhibir els receptors de la família del factor de creixement epidèrmic (HER-EGF), la qual té un paper molt rellevant en la patogènia de molts tumors i actualment és una important diana en les teràpies antitumorals. En concret, s'ha estudiat si el mecanisme de resistència basat en la sobreexpressió i activació de components de la via HER-EGF alternatiu a l'inhibit, està involucrat en la resistència de les cèl·lules de càncer de pròstata a aquests tractaments. Amb aquesta finalitat, inicialment s'ha analitzat la importància de la via HER-EGF en el manteniment del creixement i la proliferació cel·lulars en dues línies cel·lulars de càncer de pròstata androgen-independents, les DU-145 i les PC-3, demostrant que expressen diversos receptors i lligands d'aquesta via i que poden créixer de forma autònoma en un medi de cultiu amb un aport molt reduït de factors de creixement exògens. A continuació, s'ha demostrat que la sensibilitat de les dues línies cel·lulars a tres inhibidors del EGFR (cetuximab, gefitinib i erlotinib) és dependent de l'expressió del gen de la PTEN, ja que han resultat ser més sensibles les cèl·lules DU-145, que expressen aquest gen, que les cèl·lules PC-3, que no l'expressen. El tractament amb aquests fàrmacs també ha apuntat que les cèl·lules DU-145 i PC-3 adapten l'expressió dels receptors i lligands de la via

HER-EGF després de bloquejar el receptor EGFR durant un període curt de temps; aquesta resposta també és dependent de l'expressió del gen de la PTEN, fet que indica que la sobreexpressió de receptors i lligands d'aquesta via es troba atenuada quan les vies de senyalització que s'activen a través de l'EGFR estan constitutivament activades. Finalment, el desenvolupament d'una línia DU-145 resistent a l'erlotinib ha demostrat que en la resistència hi té un paper molt important el receptor HER3, que és capaç d'activar aquesta via per tal de mantenir la proliferació cel·lular quan el receptor EGFR està inhibit. Aquests resultats indiquen que la inhibició dual dels receptors HER3 i EGFR podria millorar l'eficàcia de les teràpies actuals dirigides contra la família HER-EGF en el càncer de pròstata.

En definitiva, els resultats obtinguts en aquesta tesi han proporcionat coneixements que permeten millorar la selectivitat dels agents quimioterapèutics basats en metalls de transició i establir un mecanisme involucrat en les resistències als inhibidors del EGFR en el càncer de pròstata, fets que contribueixen a trobar alternatives terapèutiques més eficients pel tractament del càncer.

Resumen

Actualmente, la terapia farmacológica antineoplásica es uno de los pilares en el tratamiento oncológico. Sin embargo, muchos de los agentes quimioterapéuticos tienen un uso limitado como consecuencia de los efectos secundarios que producen y de las resistencias que desarrollan las células tumorales a estos tratamientos. En los últimos años se ha estado trabajando extensamente con el objetivo de conocer mejor y poder minimizar estas limitaciones. En este sentido, una de las estrategias desarrollada para mejorar la selectividad hacia las células tumorales, incrementar la concentración de fármaco en su interior y disminuir los efectos adversos en los pacientes, se basa en unir fármacos con actividad antitumoral a agentes vehiculizadores que tienen sus receptores sobreexpresados en estos tipos celulares. En este contexto, la primera parte de esta tesis se ha basado en sintetizar y caracterizar conjugados formados por complejos metálicos con potencial actividad antitumoral y moléculas vehiculizadoras, en concreto, análogos del octreotide o del folato.

En cuanto a los conjugados constituidos por un análogo del octreotide, se ha estudiado su solubilidad, estabilidad y capacidad de unión al DNA y se ha evaluado su actividad biológica. Los resultados han demostrado que la mayoría de estos conjugados tienen la capacidad de unirse al DNA pero que sólo cinco de los siete conjugados analizados presentan unas propiedades de solubilidad y estabilidad que permiten su posterior aplicación en cultivos celulares. Por otra parte, el estudio de la actividad citotóxica de estos compuestos ha puesto de manifiesto que la unión entre el péptido vehiculizador y el complejo metálico

conlleva una pérdida en la actividad inicial del complejo y ha demostrado que estos complejos metálicos deben ser muy activos para que los conjugados también sean activos. Así, sólo uno de los conjugados analizados, el conjugado conformado por el complejo de rutenio **Cj7**, presenta una buena actividad antitumoral. Este conjugado, sin embargo, no tiene capacidad de interactuar con el ADN, lo que indica que realiza su actividad a través de otro mecanismo de acción. También se ha comprobado que el análogo de octreotide utilizado de agente vehiculizador internaliza en las células tumorales siguiendo una cinética paralela a la del octreotide, pero con una menor acumulación dentro de la célula debido a su menor afinidad por los receptores SSTR. La idoneidad de dicho análogo como molécula vehiculizadora se ha confirmado observando que la acumulación de rutenio en el interior de las células es más elevada por el conjugado **Cj7** que por el complejo metálico sin conjugar, señalando que la unión al péptido provoca un efecto positivo en la internalización del complejo metálico. También se ha caracterizado la localización intracelular de este péptido, demostrando que principalmente se acumula en el citoplasma de la célula pero que llega al núcleo en una pequeña proporción, lo que le avala como portador biológico de agentes antitumorales dirigidos a moléculas del citosol y el núcleo celulares. Finalmente, el análisis de la actividad del conjugado **Cj7** en líneas celulares con diferentes niveles de expresión del receptor de octreotide ha demostrado que el efecto citotóxico del conjugado es directamente proporcional a la expresión de su receptor, lo que indica que el péptido confiere selectividad de acción al complejo de rutenio.

En cuanto al conjugado formado por un análogo del ácido fólico, su efecto como agente vehiculizador se ha analizado uniéndolo a un derivado del picoplatino a través de una molécula de polietilenglicol. De nuevo, se ha observado que esta unión provoca una pérdida de la actividad citotóxica del

complejo metálico, el cual intrínsecamente presentaba una actividad citotóxica moderada. Este hecho refuerza la importancia de utilizar complejos metálicos con una elevada actividad citotóxica inicial para que el conjugado sintetizado también sea activo. La disminución en la actividad detectada en el conjugado también se ha atribuido a la molécula de polietilenglicol utilizada para mejorar la solubilidad del conjugado final, ya que puede haber limitado la liberación del complejo metálico. Este resultado indicó que explorar nuevas moléculas enlazadoras también es importante para mejorar la actividad de estos tipos de conjugados.

Por otra parte, actualmente también hay un gran interés en conocer los mecanismos que permiten a las células tumorales desarrollar resistencias a los agentes antitumorales. La segunda parte de esta tesis se ha centrado en el estudio de los mecanismos de resistencia hacia las terapias dirigidas a inhibir los receptores de la familia del factor de crecimiento epidérmico (HER-EGF), la cual tiene un papel muy relevante en la patogenia de muchos tumores y actualmente es una importante diana en las terapias antitumorales. En concreto, se ha estudiado si el mecanismo de resistencia basado en la sobreexpresión y activación de componentes de la vía HER-EGF alternativos al inhibido, está involucrado en la resistencia de las células de cáncer de próstata a estos tratamientos. Con este fin, inicialmente se ha analizado la importancia de la vía HER-EGF en el mantenimiento del crecimiento y la proliferación celulares en dos líneas celulares de cáncer de próstata andrógeno-independientes, las DU-145 y las PC-3, demostrando que expresan varios receptores y ligandos de esta vía y que pueden crecer de forma autónoma en un medio de cultivo con un aporte muy reducido de factores de crecimiento exógenos. A continuación, se ha indicado que la sensibilidad de las dos líneas

celulares a tres inhibidores del EGFR (cetuximab, gefitinib y erlotinib) es dependiente de la expresión del gen de la PTEN, ya que han resultado ser más sensibles las células DU-145, que expresan este gen, que las células PC-3, que no la expresan. El tratamiento con estos fármacos también ha apuntado que las células DU-145 y PC-3 adaptan la expresión de los receptores y ligandos de la vía HER-EGF después de bloquear el receptor EGFR durante un periodo corto de tiempo; esta respuesta también es dependiente de la expresión del gen de la PTEN, lo que indica que la sobreexpresión de receptores y ligandos de esta vía se encuentra atenuada cuando las vías de señalización iniciadas por el EGFR están constitutivamente activadas. Finalmente, mediante una línea DU-145 resistente al erlotinib se ha visto que en la resistencia tiene un papel muy importante el receptor HER3, que es capaz de activar esta vía para mantener la proliferación celular cuando el receptor EGFR está inhibido. Estos resultados indican que la inhibición dual de los receptores HER3 y EGFR podría mejorar la eficacia clínica de las terapias actuales dirigidas a inhibir la familia HER-EGF en el cáncer de próstata.

En definitiva, los resultados obtenidos en esta tesis han proporcionado conocimientos que permiten mejorar la selectividad de agentes quimioterapéuticos basados en metales de transición y establecer un mecanismo involucrado en las resistencias a los inhibidores del EGFR en el cáncer de próstata, lo que contribuye a encontrar alternativas terapéuticas más eficientes para el tratamiento del cáncer.

Summary

At present, anti-cancer drug therapy is a mainstay of cancer treatment. However, many chemotherapeutic agents are limited by their toxic side effects and tumor cell resistance. Extensive work has recently been done to understand and minimize these limitations. The synthesis of receptor-targeted cytotoxic peptide conjugates is one of the strategies developed to increase the efficacy of chemotherapeutic agents and reduce toxic side effects. The first part of the thesis describes the synthesis and characterization of several metal-peptide conjugates with antitumor potential using octreotide or folate analogs as targeting molecules.

In a study of metal-peptide conjugates of octreotide or one of its analogs, we have looked at their solubility, stability, DNA-binding ability and biological activity. The results show that while most of these conjugates can bind DNA, only five have solubility and stability properties that allow their subsequent application in cell cultures. Moreover, the study of cytotoxic activity has shown that the binding between the peptide and the metal complex leads to a loss of initial activity of the complex and demonstrates the need to use metal complexes with high cytotoxic activity to develop peptide-conjugates with active biological properties. In fact, only one of the analyzed conjugates, the one consisting of a ruthenium complex (conjugate **Cj7**), shows good cytotoxic activity. However, this conjugate was unable to interact with DNA, indicating that it carries out its activity through a different mechanism of action. In addition, one of octreotide analogs seems to internalize inside the tumor cell

with a parallel kinetics of octreotide, although with a lower capacity due to its lower affinity to somatostatin receptors. These results were confirmed by observing that the ruthenium accumulation inside cells is higher for the conjugate **Cj7** than for the metal complex, demonstrating that the peptide binding has a positive effect on the internalization of the metal complex. We have also characterized the intracellular localization of the peptide demonstrating that it mainly accumulates in the cytoplasm of the cell but a small proportion reaches the nucleus, which endorses it as a biological carrier of antitumor agents targeting cytosol molecules and cell nuclei. Finally, the analysis of the activity of conjugate **Cj7** in cell lines with different levels of octreotide receptor expression has shown that the cytotoxic effect of the conjugate is directly proportional to the expression of its receptor, which indicates that the peptide confers selectivity of action on the ruthenium complex.

The folic acid conjugate has been synthesized by binding an analog of the picoplatin complex to the folic acid through a polyethylene glycol molecule. Again, the binding causes a loss of the already moderate cytotoxic activity of the metal complex. This emphasizes the importance of using metal complexes with high cytotoxic activity to obtain active conjugates. The decrease in the activity detected by the conjugate has also been attributed to the polyethylene glycol molecule used to improve the solubility of the conjugate, because it may have limited the release of the metal complex. This result demonstrates the importance of exploring new linker molecules to enhance the activity of these types of conjugates.

Furthermore, there is currently great interest in learning about the mechanisms through which tumor cells become resistant to chemotherapeutic drugs. The second part of this thesis focuses on the study of therapy resistance mechanisms aimed at inhibiting the receptors of the epidermal growth factor (HER-EGF) family, which plays a very important role in the pathogenesis of many tumors and is an important target for anticancer therapies. In particular, we studied whether the resistance mechanism based on overexpression and activation of alternative HER-pathway components is involved in inhibiting the EGFR in prostate cancer. Initially, we analyzed the role of the HER-EGF pathway in maintaining growth and cell proliferation in two androgen-independent prostate cancer cell lines, DU-145 and PC-3. We demonstrated that both cell lines express several HER receptors and ligands and can grow in a medium with a very low concentration of exogenous growth factors. Then, we showed that the sensitivity of both cell lines to three EGFR inhibitors (cetuximab, gefitinib and erlotinib) is dependent on the expression of the PTEN gene, as the DU-145 cells, which express this gene, are more sensitive than the PC-3 cells, which do not. Treatment with these drugs also reveals that both cell lines adapt HER receptor and ligand expression after blocking the EGFR for a short period of time; this response is also PTEN-gene expression dependent, suggesting that overexpression of HER receptors and ligands is reduced when the signaling pathways activated by EGFR are constitutively activated. Finally, the development of an erlotinib-resistant DU-145 line indicates that the HER3 receptor plays an important role in the resistance. This receptor is able to activate this pathway to maintain proliferation when the EGFR receptor is inhibited. These results show that the dual inhibition of EGFR and HER3 could improve the efficacy of current cancer treatments that directly inhibit the EGF-HER family in prostate cancer.

In short, the results obtained in this thesis have provided knowledge to improve the selectivity of transition metal chemotherapeutic agents and to establish a mechanism involved in EGFR inhibitors resistance in prostate cancer, which are relevant to finding more efficient alternative therapeutics for cancer treatment.

Anàlisi de la vehiculització
de compostos metàl·lics
com a agents antitumorals
i de la família HER-EGF en la
resistència als tractaments
oncològics

1 Introducció

1.1 El càncer

El càncer és, en l'actualitat, la principal causa de mort en els països desenvolupats i la segona causa de mort en els països en vies de desenvolupament ⁽¹⁾. A Europa, segons dades de l'Organització Mundial de la Salut (WHO, *World Human Organization*), cada any apareixen més de 3 milions de nous casos de càncer i moren, aproximadament, 1.7 milions de persones degut a aquesta malaltia. Aquestes dades reflecteixen la importància del càncer en la salut pública i la necessitat de desenvolupar metodologies i teràpies eficients pel seu diagnòstic i tractament.

El càncer inclou un grup de malalties caracteritzades per una divisió i proliferació anormal de les cèl·lules provocades per un canvi en els mecanismes de control del creixement cel·lular. Quan les cèl·lules adquireixen aquesta habilitat de proliferar en excés i sense control, es forma una acumulació de cèl·lules que rep el nom de tumor o neoplasma. Els tumors es consideren benignes quan les cèl·lules neoplàstiques es troben agrupades en una zona localitzada i poden ser extirpades per cirurgia. D'altra banda, quan aquestes cèl·lules adquireixen la capacitat d'envair teixits del seu voltant, el tumor és considerat maligne i s'anomena càncer. Les cèl·lules canceroses tenen la capacitat d'envair altres òrgans i teixits migrant a través del torrent sanguini o els vasos limfàtics formant metàstasis que condueixen a l'aparició de tumors secundaris ^(2,3).

Existeixen molts tipus de tumors ja que aquests es classifiquen en funció dels teixits que afecten i de les cèl·lules dels quals provenen. En tots els casos, però, el seu origen és monoclonal ja que provenen de la divisió anormal d'una única cèl·lula que pateix diversos canvis genètics que li permeten tenir un creixement incontrolat. Aquestes anomalies poden ser degudes a canvis o mutacions en el

seu material genètic o a canvis epigenètics que afecten la pauta d'expressió del DNA ^(3,4). Actualment, es coneixen dos tipus de gens relacionats amb el desenvolupament de tumors: els oncogens i els gens supressors de tumors. Els oncogens són gens que regulen la proliferació cel·lular i que es troben activats en les cèl·lules tumorals; tenen el seu origen en l'alteració d'uns gens de les cèl·lules normals, anomenats proto-oncogens, que estan relacionats amb funcions reguladores del cicle i la divisió cel·lulars com, per exemple, els factors de creixement o les proteïnes amb activitat quinasa. D'altra banda, els gens supressors de tumors són gens que exerceixen un control negatiu sobre la proliferació cel·lular, per la qual cosa, en les cèl·lules tumorals es troben desactivats; la funció d'aquests gens està relacionada amb el control del cicle cel·lular, la diferenciació, l'adhesió cel·lular, l'apoptosi i el manteniment de la integritat genòmica de les cèl·lules ⁽²⁻⁶⁾.

En el procés de desenvolupament d'un tumor, les cèl·lules evolucionen progressivament a un estat neoplàstic a través de deu alteracions essencials ⁽⁷⁾: 1) aconseguint una proliferació incrementada i sostinguda a través de factors de creixement provinents de la pròpia cèl·lula, de la matriu extracel·lular o d'una altra cèl·lula; 2) sent insensibles als senyals inhibidors del creixement; 3) evadint els senyals d'apoptosi; 4) adquirint un potencial replicatiu il·limitat; 5) aconseguint la capacitat de crear nous vasos sanguinis (angiogènesi); 6) envaint i metastatitzant altres teixits; 7) reprogramant el metabolisme energètic; 8) evadint la destrucció immunitària; 9) presentant una gran inestabilitat genòmica i capacitat de mutació i 10) adquirint factors de la inflamació que facilitin el seu desenvolupament (figura 1.1) ⁽⁷⁾. En conjunt, totes aquestes alteracions confereixen unes propietats a les cèl·lules tumorals que fan molt difícil el tractament i eradicació de les neoplàsies malignes.

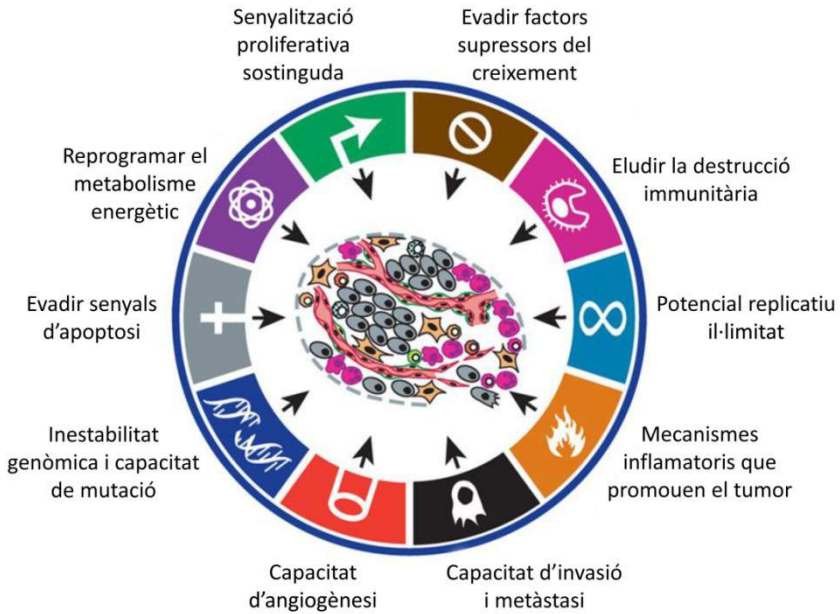


Figura 1.1. Alteracions essencials en el càncer ⁽⁷⁾.

1.2 El tractament oncològic

El tractament oncològic té com a objectiu principal eradicar totes les cèl·lules tumorals de l'organisme amb la finalitat de curar definitivament el pacient. En alguns casos en què la cura no és possible, també és utilitzat per tal de pal·liar o millorar els símptomes de la malaltia i per preservar la qualitat de vida del pacient. En l'actualitat, el tractament del càncer es caracteritza per utilitzar tres eines fonamentals que, soles o en combinació, permeten establir la millor estratègia terapèutica per cada tipus de tumor: la cirurgia oncològica, la radioteràpia oncològica i la teràpia farmacològica antineoplàstica.

1.2.1 El tractament quirúrgic del càncer

La cirurgia ha estat durant molt de temps l'única estratègia considerada curativa pel tractament oncològic i, actualment, continua tenint una gran importància en el tractament de la majoria de tumors sòlids. Tot i això, només és efectiva en un 40% dels pacients, ja que en molts dels malalts es desenvolupa una forma metastàsica del tumor que no pot ser eliminada amb aquesta intervenció ⁽⁶⁾. En aquests casos, però, la cirurgia continua tenint un paper molt important ja que pot ser utilitzada amb l'objectiu de fer un control local del tumor, preservar la funció dels òrgans afectats, obtenir informació de l'estatge del tumor o facilitar el seu tractament amb teràpies posteriors, com la radioteràpia i la teràpia farmacològica ⁽⁸⁾.

1.2.2 La radioteràpia oncològica

La radioteràpia permet fer el diagnòstic i el tractament del pacient oncològic a través de la irradiació de la zona tumoral mitjançant radiacions ionitzants. Les radiacions són una forma física de tractament que trenquen el DNA i generen radicals lliures a partir de les molècules d'aigua que es troben a l'interior de la cèl·lula, la qual cosa danya les membranes cel·lulars, les proteïnes i els orgànuls de les cèl·lules i comporta, finalment, la mort cel·lular. Actualment, l'administració de la radiació pel tractament de tumors es pot fer en forma de fotons (raigs X i raigs gamma), que és la forma més freqüentment utilitzada, o en forma de partícules (protons, neutrons i electrons). La radioteràpia és una tècnica molt complexa, ja que a més de considerar el tipus de radiació també cal tenir presents paràmetres com el volum de la irradiació, la dosi o el temps de irradiació, que dependran del pacient i del tipus de tumor a tractar ^(5,8).

En el tractament antineoplàstic, la radioteràpia pot ser utilitzada amb finalitats curatives, adjuvants o pal·liatives. La radioteràpia amb finalitats curatives permet fer la cura de l'òrgan irradiat conservant la seva fisiologia i, en molts casos, la seva funció. D'altra banda, la radioteràpia amb finalitats adjuvants s'utilitza després de la cirurgia o la quimioteràpia amb l'objectiu de millorar el control local de la malaltia i disminuir, així, el risc de recaiguda. Per últim, la radioteràpia amb finalitats pal·liatives s'utilitzarà per millorar la simptomatologia en determinades situacions com, per exemple, per controlar el dolor en les metàstasis òssies o per millorar els símptomes neurològics en les metàstasis cerebrals ⁽⁸⁾.

1.2.3 La teràpia farmacològica antineoplàstica

La teràpia farmacològica antineoplàstica es basa en el tractament del pacient mitjançant fàrmacs amb l'objectiu d'eradicar les cèl·lules tumorals de l'organisme. En l'actualitat, s'utilitza sola o en combinació amb la cirurgia i la radioteràpia per tal de disminuir el volum inicial del tumor, fer un control local de la malaltia, eliminar les metàstasis que s'hagin desenvolupat o alleujar algunes manifestacions de la malaltia com, per exemple, el dolor.

Actualment, els fàrmacs utilitzats en el tractament antitumoral es classifiquen en quatre grups principals: els agents quimioteràpics convencionals, els agents utilitzats en la teràpia hormonal, els agents utilitzats en la teràpia dirigida i els agents utilitzats en la teràpia biològica o immunoteràpia ⁽⁶⁾.

- Els **agents quimioteràpics convencionals** van ser els primers fàrmacs utilitzats en el tractament oncològic. Es classifiquen en funció de si actuen

sobre el DNA (a través d'una forma directa o indirecta) o si s'uneixen als microtúbuls de la cèl·lula.

Entre els fàrmacs que actuen sobre el DNA a través d'una acció directa es troben els compostos alquilants, els inhibidors de les topoisomerases i els antibiòtics antitumorals. Els **agents alquilants** (taula 1.1, A) són un grup de fàrmacs que es caracteritzen per originar uns intermediaris més reactius que interaccionen covalentment amb les bases del DNA. A través d'aquest mecanisme, impedeixen que les cèl·lules puguin fer la replicació normal del DNA o la divisió cel·lular i activen vies cel·lulars que conduiran a l'apoptosi de la cèl·lula. Els **inhibidors de les topoisomerases** (taula 1.1, A) actuen sobre aquests enzims impedit que es dugui a terme la correcta relaxació de la molècula del DNA, per la qual cosa, afecten la seva replicació i transcripció. Els **antibiòtics antitumorals** (taula 1.1, A) són unes substàncies produïdes per bacteris que indueixen unes lesions al DNA que comporten la parada del cicle cel·lular⁽⁹⁾. En la classificació dels fàrmacs antitumorals, alguns d'aquests antibiòtics antitumorals (com les antraciclins i les actinomicines) es classifiquen com a inhibidors de les topoisomerases ja que, tot i ser produïdes per bacteris, actuen inhibint aquests enzims ⁽⁵⁾.

Pel què fa als agents que actuen sobre el DNA a través d'una acció indirecta, es troben els **antimetabòlits** (taula 1.1, A). Els antimetabòlits es caracteritzen per tenir una estructura similar als precursors de les purines i les pirimidines, per la qual cosa, interfereixen en la biosíntesi d'aquestes molècules i provoquen canvis en el temps i en la progressió de la síntesi del DNA.

D'altra banda, dins de la quimioteràpia convencional també es troben els **agents antimicrotúbuls** (taula 1.1, A). Aquests tipus de compostos duen a terme la seva acció unint-se als microtúbuls de la cèl·lula a través de

diferents mecanismes, fet que acaba provocant uns canvis en aquestes estructures que impedeixen que es pugui culminar el cicle cel·lular.

- La **teràpia hormonal** és una estratègia utilitzada pel tractament de càncers que tenen un creixement depenent de les hormones, com el càncer de mama, el de pròstata o el d'ovari. L'objectiu de la teràpia hormonal és modificar o inhibir l'efecte que fan les hormones sobre el creixement i el desenvolupament d'aquests tumors per tal de parar el creixement de les cèl·lules neoplàstiques o, fins i tot, provocar-ne la mort.

Actualment s'utilitzen diferents fàrmacs i estratègies en la teràpia hormonal. Aquests es classifiquen, en funció del seu mecanisme d'acció, en **teràpies additives** (taula 1.1, B) quan es basen en l'administració d'anàlegs dels estrògens, els andrògens, els progestàgens, els corticoides o la somatostatina; en **teràpies competitives** (taula 1.1, B) quan es basen en l'administració de moduladors selectius del receptor d'estrògens (SERM, *selective estrogen receptor modulator*), d'antiestrògens purs i d'antiandrògens; i en **teràpies inhibidores** (taula 1.1, B) quan s'utilitzen inhibidors de l'aromatasa i anàlegs dels factors alliberadors de l'hormona luteïnitzant (LH-RH, *luteinizing hormone releasing hormone*)⁽⁵⁾.

- La **teràpia dirigida** és una estratègia utilitzada en el tractament oncològic que ha sorgit gràcies als avenços realitzats en el coneixement de la biologia de les cèl·lules tumorals. Aquests avenços han permès descriure vies imprescindibles pel creixement i el desenvolupament de les cèl·lules tumorals relacionades amb la seva capacitat de proliferar de forma incontrolada, d'evadir els mecanismes de mort cel·lular i el sistema immunològic i amb la seva capacitat d'invasió i de metàstasi ⁽⁷⁾. La teràpia dirigida es basa en el disseny de fàrmacs que actuen sobre molècules que

tenen un paper essencial en aquests processos però que no es troben tan expressades en les cèl·lules normals, la qual cosa permet que aquests agents tinguin una acció específica sobre les cèl·lules canceroses. En l'actualitat, diversos d'aquests fàrmacs tenen el seu ús aprovat en clínica, com les molècules petites inhibidores de l'activitat tirosina quinasa de determinats receptors, els inhibidors de la histona deacetilasa i la DNA metiltransferasa i els inhibidors del proteasoma⁽⁵⁾.

Les **molècules petites inhibidores de l'activitat tirosina quinasa** (taula 1.1, C) es caracteritzen per bloquejar les vies de transducció de la senyal de diversos receptors en inhibir la seva activitat tirosina quinasa. Aquest bloqueig provoca una parada en el creixement de les cèl·lules tumorals o activa mecanismes que indueixen la seva apoptosi⁽¹⁰⁾.

Els **inhibidors de la histona deacetilasa i la DNA metiltransferasa** (taula 1.1, C) inhibeixen l'activitat d'uns enzims que regulen l'activitat de determinats gens involucrats en l'aparició i el desenvolupament d'alguns tipus de tumors^(11,12), per la qual cosa, restauren el control del cicle cel·lular i la senyalització de l'apoptosi en aquestes cèl·lules neoplàstiques⁽⁵⁾.

Els **inhibidors del proteasoma** (taula 1.1, C) actuen inhibint el sistema ubiquitina-proteasoma, un sistema involucrat en la degradació de diverses proteïnes com les que controlen el cicle cel·lular, l'apoptosi, la reparació del DNA i la resposta a l'estrès, entre d'altres⁽¹³⁾. La seva inhibició s'ha associat amb la prevenció de la degradació d'aquestes proteïnes, fet que comporta una parada en el cicle cel·lular i l'activació del mecanisme de la mort cel·lular programada en les cèl·lules neoplàstiques⁽¹⁴⁾.

A) AGENTS UTILITZATS EN LA QUIMIOTERÀPIA CONVENCIONAL		
TIPUS DE FÀRMAC	GRUP	EXEMPLES
FÀRMACS QUE ACTUEN SOBRE EL DNA		
Agents alquilants	Alquil sulfonats	Busulfan
	Aziridines	Tiotepa
	Mostasses nitrogenades	Mecloretamina, Melfalan, Clorambucil, Ciclofosfamida,
	Nitrosourees	Carmustina, Estreptozotocina
	Triazines	Dacarbazina, Temozolomida
	Anàlegs de platí	Cisplatí, Carboplatí, Oxaliplatí
	Camptotecines	Irinotecan, Topotecan
	Antraciclines	Doxorubicina, Daunorubicina, Epirubicina, Idarubicina
	Antracenediones	Mitoxantrona
	Actinomicines	Dactinomicina
Antibiòtics antitumorals	Epipodofilotoxines	Etoposid, Teniposid
		Bleomicina
Antimetabòlits	Antifolats	Metotrexat, Pemetrexed, Pralatrexat
	5-fluoropirimidines	5-Fluorouracil
	6-tiopurines	6-mercaptopurina, 6-tioguanina
	Altres	Capecitabina, Citarabina, Gemcitabina, Fludarabina
FÀRMACS QUE ACTUEN SOBRE ELS MICROTÚBULS		
Fàrmacs que s'uneixen als microtúbuls	Taxans	Paclitaxel, Docetaxel, Cabazitaxel
	Alcaloides de la vinca	Vincristina, Vinblastina, Vinorelbina

B) AGENTS UTILITZATS EN LA TERÀPIA HORMONAL		
TIPUS DE TERÀPIA	TIPUS DE FÀRMAC	EXEMPLES
Teràpia hormonal additiva	Estrògens	Estradiol
	Andrògens	Fluoximesterona
	Progestàgens	Megestrol, Medroxiprogesterona
	Anàlegs de la SST	Octreotide
Teràpia hormonal competitiva	SERM	Tamoxifè, Toremifè, Raloxifè
	Antiestrògens purs	Fulvestrant
	Antiandrògens	Flutamida, Bicalutamida, Nilutamida
Teràpia hormonal inhibidora	Inhibidors de l'aromatasa	Anastrozol, Letrozol, Exemestan
	Anàlegs de la LH-RH	Goserelina, Leuprolida
C) AGENTS UTILITZATS EN LA TERÀPIA DIRIGIDA		
TIPUS DE TERÀPIA	DIANA	EXEMPLES
Molècules petites inhibidores de l'activitat tirosina quinasa	BRC-ABL	Imatinib, Dasatinib, Nilotinib
	KIT	Imatinib, Unitinib
	PDGFR α/β	Imatinib
	HER2	Lapatinib
	EGFR	Gefitinib, Erlotinib
	VEGFR	Sorafenib, Sunitinib
Inhibidors de la histona deacetilasa i de la DNA metiltransferasa	TORC1	Sirolimus, Everolimus, Temsirolimus
	Histona deacetilasa	Vorinostat, Romidepsina
	DNA metiltransferasa	5-Azaciditidina, 2' Desoxi-5-azaciditidina
Inhibidors el proteasoma	Proteasoma 26S	Bortezomib

D) AGENTS UTILITZATS EN LA IMMUNOTERÀPIA		
TIPUS DE TERÀPIA	TIPUS DE MOLÈCULA	EXEMPLES
Citoquines	Interferons	INF- α
	Interleucines	IL-2
TIPUS DE TERÀPIA	DIANA	EXEMPLES
Anticossos monoclonals	CD-20	Rituximab
	CD-52	Alemtuzumab
	CD-20	Ofatumumab
	EGFR	Cetuximab, Panitumumab
	HER2	Trastuzumab
	VEGF	Bevacizumab

Taula 1.1. Agents utilitzats en la teràpia farmacològica antineoplàstica actual.

- La **teràpia biològica** (també anomenada **immunoteràpia**) es basa en l'administració de substàncies que es troben a l'organisme de forma natural, com els anticossos, les citoquines o les seqüències antisentit, amb l'objectiu d'activar i potenciar la resposta immunològica del pacient perquè reconegui les cèl·lules tumorals que l'afecten ⁽¹⁵⁾. Alguns d'aquests fàrmacs tenen elements en comú amb els agents utilitzats en la teràpia dirigida, ja que reconeixen molècules específiques de la cèl·lula i bloquegen la seva acció. Actualment s'estan utilitzant diversos tipus de teràpies per tal d'activar la immunitat antitumoral, entre les quals és important destacar els anticossos monoclonals i les citoquines ⁽⁵⁾ (taula 1.1, D).

Els **anticossos monoclonals** realitzen la seva activitat unint-se a la molècula específica per la qual han estat dissenyats. A través d'aquesta unió, l'anticòs indueix la inhibició i la neutralització de la molècula on es troba unit o activa la resposta immunològica del pacient, provocant l'activació del sistema de complement i/o del mecanisme de citotoxicitat mediat per la cèl·lula ^(15,16).

Pel què fa a les **citoquines**, el seu ús en la teràpia antitumoral s'ha relacionat amb el paper que tenen en la resposta immunològica de l'hoste. Actualment, estan sent utilitzades en clínica l'interferó- α (INF- α) i la interleucina-2 (IL-2) ⁽¹⁵⁾.

En l'actualitat, doncs, existeixen un elevat nombre de fàrmacs i múltiples estratègies per atacar la cèl·lula neoplàstica, però la majoria d'aquests agents presenten limitacions ⁽⁵⁾. Una d'aquestes limitacions està relacionada amb la baixa selectivitat que tenen per les cèl·lules neoplàstiques, ja que això provoca l'afectació d'altres tipus cel·lulars i l'aparició d'efectes adversos en els pacients. Una altra limitació s'ha relacionat amb el desenvolupament de resistències per les cèl·lules tumorals, fet que comporta que agents que inicialment són efectius

sobre les cèl·lules canceroses, deixin de ser-ho. Aquests fets han provocat que la recerca antitumoral actual estigui molt dirigida a desenvolupar nous compostos que permetin atacar les cèl·lules neoplàstiques selectivament i que hi hagi un gran interès en establir els mecanismes a través dels quals les cèl·lules tumorals esdevenen resistents a les teràpies, ja que això permetria trobar alternatives terapèutiques més eficients pel tractament del càncer.

1.3 La vehiculització de fàrmacs en el tractament oncològic

La teràpia dirigida és una estratègia molt prometedora per tal de millorar l'especificitat dels fàrmacs antitumorals i minimitzar els seus efectes adversos. Una de les alternatives que inclou es basa en la unió d'un compost antitumoral a un agent vehiculitzador que té els seus receptors sobreexpressats en les cèl·lules tumorals amb l'objectiu de dirigir específicament el fàrmac amb acció citotòxica a l'interior d'aquestes cèl·lules ⁽¹⁷⁾. Amb el disseny i l'estudi d'aquests compostos es pretén millorar algunes de les limitacions dels agents utilitzats en el tractament oncològic convencional com, per exemple, els complexos metàl·lics.

1.3.1 Els compostos metàl·lics com a fàrmacs antitumorals

En l'actualitat, els compostos que contenen un àtom de platí com a element central són el grup de fàrmacs més utilitzat en la teràpia antitumoral ⁽⁵⁾. Aquests fàrmacs, sols o en combinació amb altres agents quimioterapèutics, són pilars en el tractament de diversos tipus de càncers com els del tracte respiratori, els del tracte gastrointestinal, els ginecològics o els del tracte

genitourinari i, a més, són elements clau per al tractament d'alguns tipus de limfomes i per als càncers infantils ^(5,18). Tot i això, el seu ús és limitat degut als efectes adversos que provoquen i al desenvolupament de resistències per part de les cèl·lules tumorals, la qual cosa comporta que es continuïn estudiant nous compostos de platí o d'altres metalls de transició per tal de millorar algunes de les seves propietats com, per exemple, l'especificitat o la via d'administració ^(19,20).

1.3.1.1 Els compostos de platí

El **cis-diaminodicloroplatí** ($\text{cis-}[\text{Pt}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{NH}_3)_2]$, també conegut com a **cisplatí** (figura 1.2), és un senzill compost de platí (II) format per un àtom de platí unit a dos àtoms de clor i a dos grups amino que té el seu ús aprovat en clínica pel tractament dels tumors de bufeta, de testicle, d'ovari, de cap i coll, el cervical i alguns tipus de limfoma ^(5,19,21).

Per tal de dur a terme la seva acció, el cisplatí és activat a l'interior de la cèl·lula mitjançant un mecanisme de substitució dels seus lligands clorur per molècules d'aigua. Aquest mecanisme, que depèn de la concentració de ions clorur, permet que sigui administrat per via intravenosa i que arribi a la cèl·lula pel torrent sanguini de forma inalterada, ja que l'elevada concentració de ions clorur que es troba en la sang (~100 mM) impedeix que s'hidrolitzi ⁽²²⁾. Una elevada proporció del cisplatí administrat, però, no durà a terme la seva acció, ja que aproximadament el 90% del cisplatí que es troba en sang és eliminat a través de la seva unió a algunes proteïnes plasmàtiques com, per exemple, l'albumina. Per tal d'accedir a l'interior de la cèl·lula el cisplatí utilitza principalment mecanismes de difusió passiva; tot i això, també internatitza a través d'algunes proteïnes transportadores, com els transportadors de coure

(23,24). Un cop a l'espai intracel·lular, la baixa concentració de ions clorur del citoplasma (~20 mM) provoca que el cisplatí s'hidrolitzi i canviï una o dues molècules de clor per molècules d'aigua (25), la qual cosa genera les espècies monohidratada $[PtCl(H_2O)(NH_3)_2]^+$ i dihidratada $[Pt(H_2O)_2(NH_3)_2]^{2+}$ que són molt més reactives i interaccionen amb biomolècules com el DNA, l'RNA o algunes proteïnes (26).

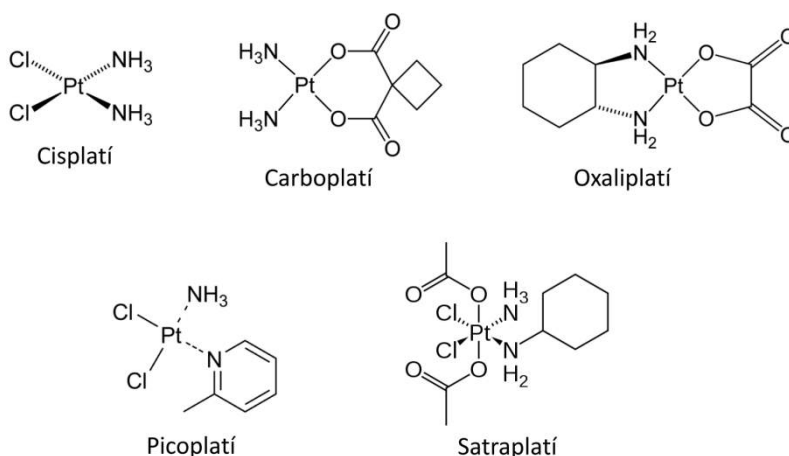


Figura 1.2. Estructura química de fàrmacs antitumorals anàlegs de platí utilitzats en clínica en l'actualitat (part superior) o avaluats en assaigs clínics (part inferior).

L'activitat citotòxica del cisplatí es deu a la seva interacció amb el DNA, ja que provoca uns canvis en la seva estructura que interfereixen en el cicle cel·lular i activen mecanismes de mort cel·lular. El seu efecte s'ha relacionat, principalment, amb la interacció que s'estableix entre l'àtom de platí i la posició N7 de les bases de guanina, fet que genera adductes bifuncionals entre dues guanines intracatenàries (representen el 60-65% de les lesions), entre una guanina i una adenosina intracatenàries (20-25% de les lesions) o entre dues guanines intercatenàries (5% de les lesions) (27,28); en un percentatge molt menor (<1%), a més, es formen adductes bifuncionals intracadena o adductes

monofuncionals entre el cisplatí i el DNA o algunes proteïnes ⁽²⁹⁾. El mecanisme concret a través del qual es produeix la mort cel·lular, però, encara no està totalment establert. En aquest procés, sembla que hi juguen un paper molt important les proteïnes que reconeixen i s'uneixen al DNA lesionat després d'interaccionar amb el cisplatí ⁽²⁸⁻³²⁾, ja que eviten que el dany produït pel cisplatí sigui reparat i, per tant, impedeixen que tinguin lloc processos cel·lulars com la replicació i la transcripció i provoquen que s'activin vies de transducció de la senyal implicades en el procés d'apoptosi i amb l'allargament de la fase G2 del cicle cel·lular, la qual cosa comportarà, finalment, la mort de la cèl·lula per apoptosi ⁽³²⁾.

Actualment, el cisplatí té un paper molt important en la teràpia oncològica però el seu ús en clínica és limitat ja que no pot ser administrat per via oral, algunes cèl·lules tumorals es tornen resistents a aquesta fàrmac i, degut a la seva baixa selectivitat, produeix efectes adversos com la nefrotoxicitat, l'ototoxicitat, la neurotoxicitat, nàusees i vòmits ⁽³³⁻³⁵⁾. Aquestes limitacions han promogut que hagi augmentat l'interès per tal d'establir quins són els principals mecanismes implicats en l'aparició de resistències i de buscar alternatives que siguin menys tòxiques, que tinguin una activitat similar a aquest compost i que permetin millorar la seva via d'administració.

Pel què fa als mecanismes de resistència, aquests es classifiquen en funció de si impedeixen la unió entre el cisplatí i el DNA o si permeten reparar el dany ocasionat per aquest fàrmac (figura 1.3) ⁽¹⁹⁾. Per tal d'impedir la unió del cisplatí al DNA, s'han descrit mecanismes que disminueixen l'entrada a l'interior de la cèl·lula a través d'una reducció en l'expressió dels receptors implicats, com el receptor del coure Ctr1 ^(36,37); mecanismes que augmenten els nivells de molècules que contenen grups tiol al citoplasma (com el glutatió o les

metal·loproteases) que interaccionen amb el cisplatí i inhibeixen les seves funcions ⁽³⁸⁻⁴⁰⁾; i mecanismes que augmenten el flux de sortida del cisplatí a l'exterior de la cèl·lula a través de determinats transportadors, com les ATPases ATP7A i ATP7B ^(37,41,42).

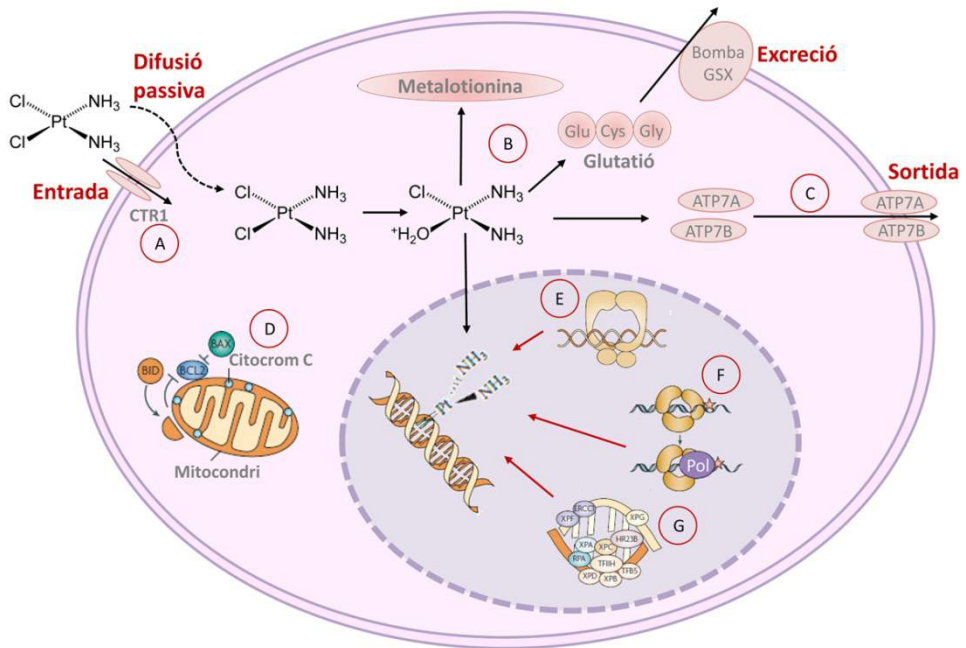


Figura 1.3. Mecanismes de resistència de la cèl·lula tumoral al cisplatí. La cèl·lula tumoral desenvolupa mecanismes diversos per tornar-se resistent al cisplatí: redueix l'expressió de receptors implicats en l'entrada del cisplatí, com el receptor del core Ctr1 (A); augmenta nivells d'espècies que contenen tiols al citoplasma, com el glutatió o les metal·loproteases (B); augmenta el flux de sortida del cisplatí a l'exterior de la cèl·lula a través de determinats transportadors, com les ATPases ATP7A i ATP7B (C); modifica les vies de senyalització implicades en l'apoptosi (D); perd mecanismes de reparació per mismatch (E); millora els mecanismes de replicació (F); o millora els mecanismes de reparació del DNA (G) ⁽¹⁹⁾.

D'altra banda, entre els mecanismes basats en reparar el dany exercit pel cisplatí sobre el DNA, alguns es basen en millorar la reparació del DNA i

eliminar els adductes formats a través dels sistemes normals de reparació (com l'excisió de nucleòtids, l'escissió de bases, la reparació per desaparellament i la reparació del trencament de la doble cadena de DNA), mentre que els altres es basen en augmentar la tolerància de les cèl·lules a aquests adductes a través de la pèrdua dels mecanismes de reparació per desaparallament ⁽⁴³⁾, la qual cosa es tradueix en una disminució de l'apoptosi, una millora en els mecanismes de replicació i una disminució en l'expressió o en la pèrdua de vies de senyalització implicades en l'apoptosi ⁽⁴⁴⁾.

En relació al desenvolupament de nous fàrmacs, el primer compost alternatiu al cisplatí que es va utilitzar va ser el **carboplatí**. El **carboplatí** (cis-diamino-[1,1-ciclobutandicarboxilat (2-)]-O,O'-platí(II), figura 1.2) és un anàleg del cisplatí més estable ja que presenta uns lligands que s'hidrolitzen més lentament i que donen lloc a un fàrmac que és menys reactiu i menys tòxic que el cisplatí. El carboplatí presenta un espectre d'activitat similar i menys efectes adversos que el seu precursor, la qual cosa permet administrar-lo en aquells pacients que són intolerants al cisplatí. Tot i això, el carboplatí també presenta algunes limitacions, ja que el seu ús s'ha relacionat amb l'aparició d'efectes mieolopressors, requereix ser administrat a una concentració entre 20 i 40 vegades superior que la utilitzada pel cisplatí, és menys actiu que el cisplatí en alguns tipus de tumor i, a més, presenta resistència creuada amb el cisplatí ^(18,45).

Un altre fàrmac que té el seu ús aprovat en clínica és l'**oxaliplatí** (1,2-diaminociclohexà-oxalat-platí(II), figura 1.2) un compost de Pt(II) de tercera generació que té activitat sobre tumors que són insensibles al cisplatí o al carboplatí i que té un espectre de resistència diferent ^(18,46). Aquestes

diferències són degudes al fet que l'oxaliplatí indueix la formació d'uns adductes sobre el DNA que es reconeixen i processen diferent que els formats pel cisplatí i el carboplatí ^(18,46). En l'actualitat l'oxaliplatí s'utilitza en clínica pel tractament del càncer de colon avançat i metastàtic, tot i que també s'està estudiant el seu ús en els tumors d'ovari, gàstric i esofàgic ^(18,47,48). L'ús de l'oxaliplatí també s'ha relacionat amb l'aparició d'efectes adversos, sobretot de neuropaties motores i sensorials ⁽⁴⁹⁾.

El **picoplatí** (cis-aminodicloro(2-metilpiridina)platí(II), figura 1.2) és un altre complex de Pt(II) que està sent avaluat en assaigs clínics i que va ser dissenyat per superar alguns dels mecanismes de resistència descrits pel cisplatí. El picoplatí presenta un lligand 2-metilpiridina a la seva estructura que li confereix un major impediment estèric al voltant de l'àtom de platí, fet que li permet formar uns adductes més voluminosos sobre el DNA que no poden ser reparats mitjançant les proteïnes reparadores del DNA i, a més, limita la inactivació del picoplatí a través de molècules detoxificants, com el glutatió o les metal·loproteases ^(18,19,50). Actualment s'està estudiant l'ús del picoplatí, sol o en combinació amb altres fàrmacs, en el tractament d'alguns tipus de càncer com el de pulmó i el d'ovari, la qual cosa ha demostrat que presenta una bona activitat en el tractament d'aquests tipus de tumors i que té menys efectes adversos que altres compostos de platí; el seu ús, però, s'ha relacionat amb l'aparició de trombocitopènia i neutropènia ^(19,50).

D'altra banda, l'interès per trobar fàrmacs que puguin ser administrats per via oral i que presentin una major efectivitat i menys efectes adversos que els compostos de Pt(II), ha promogut el desenvolupament de complexos de Pt(IV). Aquests complexos es caracteritzen per ser molt més inerts que els compostos

de Pt(II), per la qual cosa, tenen una major capacitat d'arribar intactes a la diana cel·lular i mostren menys efectes adversos ⁽⁵¹⁾. Tot i que inicialment són inactius, a l'organisme són reduïts a l'interior o a l'exterior de la cèl·lula per molècules com l'àcid ascòrbic, el GSH o les metal·loproteïnes ^(52,53), fet que genera la corresponent espècie activa de Pt(II) que s'unirà al DNA i realitzarà l'activitat citotòxica ^(54,55). La utilització d'aquests complexos resulta molt interessant ja que al tenir dos lligands més que les espècies de Pt(II), poden incorporar grups en la seva estructura per tal de millorar determinades característiques, com la via d'administració, els efectes secundaris o la selectivitat per les cèl·lules tumorals ⁽⁵¹⁾. Fins al moment cap d'aquests compostos ha sigut aprovat en clínica, però alguns, com el satraplatí, estan sent avaluats en assaigs clínics. El **satraplatí** (bis-acetat-amino-diclor-ciclohexilamina-platí(IV), figura 1.2) és un derivat del carboplatí que presenta una bona absorció per via oral, té menys efectes secundaris que el cisplatí i el carboplatí i és actiu en el tractament del càncer de pròstata refractari a la teràpia hormonal, per la qual cosa, s'estan duent a terme nous assaigs per comprovar la seva eficàcia en el tractament d'altres tipus de tumors ^(18,56,57).

A més dels compostos de platí, en les darreres dècades han anat adquirint importància els compostos basats en la utilització d'altres metalls de transició, com el ruteni, l'osmi, l'or, el tecneci, el reni i el coure, ja que al tenir propietats diferents de les del platí, actuen sobre les cèl·lules tumorals a través d'altres mecanismes d'acció. Aquestes estratègies s'estan convertint en teràpies alternatives per aquells càncers que han desenvolupat resistències al cisplatí o per aquells tumors pels quals el cisplatí i els seus derivats no són efectius ⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾.

1.3.1.2 Els compostos de ruteni

El ruteni és un metall de transició del mateix grup del platí que presenta unes característiques molt adequades pel desenvolupament de compostos amb activitat antitumoral ^(61,62). Entre aquestes característiques destaca, en primer lloc, que presenta una cinètica de bescanvi de lligand lenta molt similar a l'observada pel cisplatí, la qual cosa li dóna una elevada estabilitat cinètica i condiciona els seus processos d'activació i desactivació, fets que estan molt relacionats amb la seva activitat biològica ⁽⁶³⁾. Per altra banda, al presentar una geometria de coordinació octaèdrica diferent de la del platí (que és plana-quadrada) duu a terme la seva activitat a través de mecanismes d'acció diferents, la qual cosa li permet ser actiu en cèl·lules tumorals que no responen als compostos de platí ⁽⁶⁴⁾. Una altra propietat interessant del ruteni és que, fisiològicament, es troba en tres estats d'oxidació (Ru(II), Ru(III) i Ru(IV)), dels quals, el Ru(III) és l'estat predominant però és relativament inactiu i el Ru(II) és l'estat més reactiu; això ha permès sintetitzar compostos de Ru(III) i Ru(IV) que s'activen a l'interior de les cèl·lules tumorals a través del mecanisme "activació per reducció", que té lloc com a conseqüència de les condicions de la cèl·lula (baixa concentració d'oxigen, elevats nivells de glutatió i pH àcid) i que permet acumular i activar els complexos de ruteni al seu interior ⁽⁶⁵⁾. Una altra propietat que facilita l'entrada del ruteni a l'interior de les cèl·lules tumorals és que pot unir-se a transportadors com la transferrina, una proteïna que es troba sobreexpressada en les cèl·lules tumorals amb la finalitat d'augmentar l'acumulació de ferro al seu interior ^(65,66). A més, alguns d'aquests complexos tenen la capacitat d'inhibir el trencament de les unions entre les cèl·lules tumorals i, per tant, inhibeixen el seu poder d'invasió, migració i re-adhesió a un nou substrat, característiques que els fan més eficaços contra les metàstasis tumorals que contra els tumors primaris ⁽⁶⁵⁾.

Pel què fa al seu mecanisme d'acció, la majoria de compostos de ruteni s'uneixen al DNA a través d'adductes i distorsions diferents dels del cisplatí i altres compostos de platí ⁽⁶⁰⁾ per la qual cosa, tenen un mecanisme d'acció diferent. El seu efecte, a més, s'ha relacionat amb la interacció que estableixen amb determinades proteïnes, com la topoisomerasa II, la cathepsina B, la tioredoxina reductasa o algunes metal·loproteases ^(60,67), i amb la cadena de transport d'electrons ⁽⁶⁸⁾.

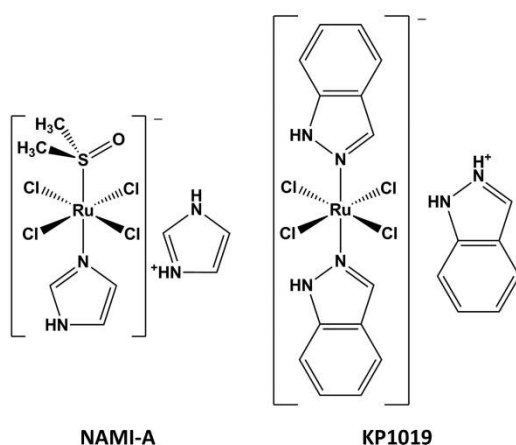


Figura 1.4. Estructura química del **NAMI-A** i el **KP1019**, dos anàlegs de ruteni que estan sent avaluats en assaigs clínics en l'actualitat.

En els darrers anys s'han desenvolupat diversos grups de complexos de ruteni que presenten lligands com el dimetilsulfòxid (DMSO, *dimethyl sulfoxide*), el grup polipiridil o alguns grups arena, units a Ru(II) o Ru(III) ⁽⁶⁹⁾. Un grup molt destacable és el què presenta el Ru(III) unit a grups heterocíclics o grups arena, ja que en formen part el *trans*-[tetracloro(dimetilsulfòxid)-(1H-imidazol) rutenat(III)] (**NAMI-A**) i el *trans*-[(tetracloro)bis-(1H-indazol)rutenat(III)] (**KP1019**) (figura 1.4), els dos únics complexos de ruteni que estan sent avaluats en assaigs clínics. El **NAMI-A** és un compost de Ru(III) coordinat al DMSO i a

l'imidazol que, a través de diferents mecanismes ⁽⁷⁰⁻⁷⁴⁾, prevé la formació de metàstasis i n'inhibeix el creixement ⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾. D'altra banda, el **KP1019** és un complex de Ru(III) amb dues molècules d'indazol coordinades al centre metàl·lic ⁽⁶¹⁾ que es caracteritza per provocar un efecte citotòxic directe sobre les cèl·lules a través de diferents mecanismes ^(68,78,79). Aquestes característiques i els satisfactoris resultats obtinguts en assaigs preclínic amb el NAMI-A i el KP1019 han promogut la seva entrada en assaigs clínics, la qual cosa ha demostrat el seu bon perfil de seguretat en humans ^(65,80-82).

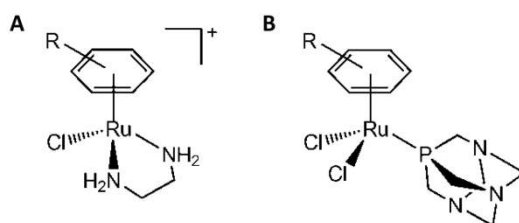


Figura 1.5. Estructura química general dels arenocomplexos de Ru(II) amb estructura tipus: A) $[(\eta^6\text{-areno})\text{RuCl}(\text{en})]^+$ i B) RAPTA.

Un altre grup d'arenocomplexos de Ru(II) amb una bona activitat antitumoral tenen l'estructura general $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{Z})(\text{X})(\text{Y})]$ (on Z és un grup sortint i X i Y són dos lligands). Dins d'aquest grup destaquen els $[(\eta^6\text{-areno})\text{RuCl}(\text{en})]^+$ (en = etilendiamina) (figura 1.5), que tenen una activitat citotòxica comparable o fins i tot superior a la del cisplatí ^(83,84), i els complexos RAPTA (figura 1.5), que presenten una bona activitat citotòxica i són antimetastàtics ⁽⁸⁵⁾. L'efecte d'aquests complexos de Ru(II) s'ha relacionat, bàsicament, amb la seva acció sobre el DNA ⁽⁸⁶⁾, encara que també actuen inhibint alguns enzims i proteïnes que intervenen en la progressió i el desenvolupament del càncer, com la tioredoxina reductasa, la cathepsina N ⁽⁸⁷⁾ i el glutatí S-transferasa ⁽⁸⁸⁾.

1.3.1.3 Els compostos d'osmi

L'osmi és un altre metall de transició que s'està estudiant en la teràpia antitumoral. Inicialment no va ser tant considerat com el ruteni, tot i ser el seu congènere més lleuger, degut a la toxicitat que s'havia relacionat a l'osmi (sobretot al compost OsO_4)⁽⁶⁰⁾ i al fet que és més inert que altres metalls de transició⁽⁵⁹⁾. Tot i això, els bons resultats obtinguts amb els complexos de ruteni i les característiques diferencials que presenta l'osmi en relació a altres metalls, han promogut el seu estudi ja que introdueix nous mecanismes d'acció per atacar les cèl·lules. Un d'aquests mecanismes es deu justament al fet que, al ser més inert, presenta unes reaccions de substitució molt més lentes i una cinètica de bescanvi de lligand diferent a la d'altres metalls de transició, fet que li permet unir-se a les bases de guanina a través d'un mecanisme alternatiu^(89,90).

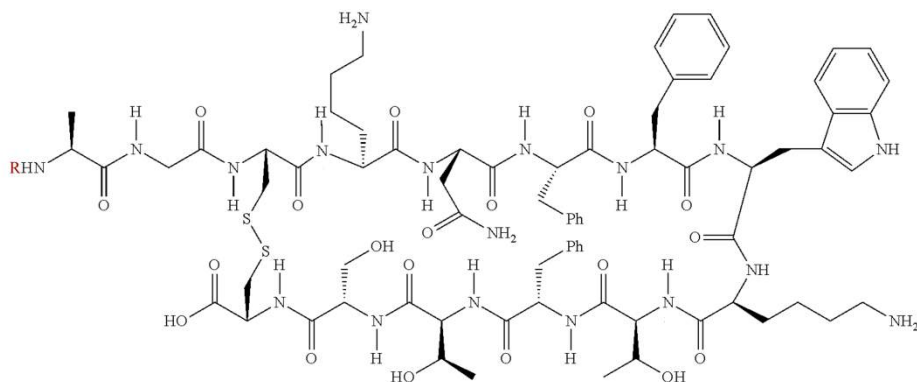
Actualment s'han desenvolupat diversos complexos d'osmi, alguns dels quals són anàlegs dels compostos de ruteni NAMI-A o KP1019 que tenen una activitat citotòxica similar o superior a la dels anàlegs de ruteni originals^(89,91). A més, també s'ha estat treballant en un grup d'areno complexos d'Os(II) amb l'estructura general $[(\eta^6\text{-areno})\text{Os}(\text{Z})(\text{XY})]$ (on XY és un lligand i Z un bon grup sortint). Aquests complexos presenten una molt bona activitat citotòxica fins i tot en línies cel·lulars resistents al cisplatí, fet que ha indicat que tenen un mecanisme d'acció diferent al dels complexos de platí convencionals^(92,93).

1.3.2 Molècules vehiculitzadores de fàrmacs antitumorals

Les cèl·lules tumorals sobreexpressen diverses molècules en comparació amb les corresponents cèl·lules normals. Entre aquestes molècules s'inclouen alguns receptors de factors de creixement, com el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) o el receptor del factor de creixement fibroblàstic (FGFR, *fibroblast growth factor receptor*), la transferrina, la interleucina-13, el receptor de la somatostatina (SSTR, *somatostatin receptor*) o el receptor dels folats (FR, *folate receptor*)⁽⁹⁴⁻⁹⁶⁾. Aquests receptors han esdevingut dianes en el tractament oncològic i han permès desenvolupar diverses estratègies, una de les quals es basa en conjuguar un lligand d'aquests receptors a un radionúclid o un fàrmac antitumoral amb l'objectiu de visualitzar o tractar, respectivament, els tumors que sobreexpressen el receptor⁽⁹⁷⁾. En els darrers anys s'han estudiat diverses molècules transportadores, com els anàlegs de la somatostatina (SST, *somatostatin*)⁽⁹⁸⁾ i l'àcid fòlic^(99,100) que, units a radionúclids o a fàrmacs antineoplàstics, han demostrat la seva capacitat per dirigir aquestes teràpies a l'interior de les cèl·lules tumorals.

1.3.2.1 La via de la somatostatina

La **somatostatina** (SST, SMS), és un polipèptid cíclic que pertany a la família dels neuropèptids i que es troba present a l'organisme en dos isotipus, la SST-14 (formada per 14 aminoàcids) i la SST-28 (formada per 28 aminoàcids), una extensió N-terminal de la SST-14 (figura 1.6).



SST-14: R = H

SST-28: R = H-Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-

Figura 1.6. Estructura química dels dos isotipus de somatostatina, la SST-14 i la SST-28
(101)

La SST desenvolupa diferents funcions a l'organisme, però la més important i coneguda és que inhibeix la secreció de l'hormona del creixement (GH, *growth hormone*), la prolactina, la tirotròpina, moltes hormones del tracte gastrointestinal (com la gastrina, la neurotensina o la secretina), el glucagó, la insulina i el polipèptid pancreàtic. A més, té funcions inhibidores de l'activitat exocrina de les glàndules salivals, de la mucosa gastrointestinal, dels acins pancreàtics i del fetge, inhibeix l'absorció d'alguns nutrients i ions, modifica la motilitat intestinal i alguns paràmetres renals, modula activitats del sistema nerviós central relacionades amb la cognició i la locomoció i té efectes antiproliferatius^(102,103).

La SST realitza les seves funcions unint-se als seus cinc receptors, anomenats SSTR-1, SSTR-2, SSTR-3, SSTR-4 i SSTR-5. Els SSTR pertanyen a la superfamília de receptors acoblats a la proteïna G i estan formats per una cadena polipeptídica simple amb un domini extracel·lular responsable de la unió al lligand, un domini intracel·lular acoblat a la proteïna G que media la transducció de la senyal a l'interior de la cèl·lula i set dominis transmembrana⁽¹⁰³⁾. Aquests receptors

tenen entre un 40 i un 50 % d'homologia i es diferencien, bàsicament, pels seus extrems amino- i carboxi-terminal, la qual cosa explica les seves diferències en relació a l'especificitat d'unió al lligand i en la modulació de les rutes de senyalització intracel·lular ^(103,104). Tots cinc receptors presenten una elevada afinitat tant per la SST-14 com per la SST-28, però els receptors SSTR1-4 mostren més afinitat per la SST-14 i el receptor SSTR5, per la SST-28 ⁽¹⁰⁵⁾. Pel que fa a les rutes que modulen, cada receptor regula específicament diverses vies ⁽¹⁰³⁾ però, en general, tots cinc modulen rutes com la via de les serina/treonina i tirosina fosfatases, la via de l'adenilat ciclase i la via de la proteïna quinasa activada per mitogen (MAPK, *mitogen-activated protein kinases*). Per altra banda, la unió del lligand al receptor pot induir la formació d'homo i heterodímers entre els diferents SSTR ⁽¹⁰⁶⁾ i la internalització dels receptors SSTR2, 3, 4 i 5 ⁽¹⁰³⁾.

Els SSTR es troben expressats en el pàncreas, el pulmó, l'estómac, els ronyons, la glàndula tiroides, el cervell i l'intestí prim ^(98,102,105). A més, estan sobreexpressats de forma aberrant en diversos tipus de tumors neuroendocrins i no neuroendocrins com els de pulmó, el gastrointestinal, el pancreàtic, el pituïtari, el medul·lar, el de pròstata, el de mama, el colorectal, el d'ovari o el de cèrvix; a més, també es troben sobreexpressats en els vasos sanguinis angiogènics ^(94,98). Diversos estudis han demostrat que en cada tumor es pot trobar expressat més d'un tipus de SSTR però que la seva sobreexpressió no és homogènia, ja que molts tumors sobreexpressen el SSTR2, alguns expressen els receptors SSTR1, SSTR3 i SSTR5, i pocs expressen el SSTR4 ^(98,107).

El descobriment que la SST inhibeix la proliferació cel·lular i que alguns dels seus receptors es troben sobreexpressats en determinats tipus de tumors va

promoure la seva avaluació com a agent antitumoral ⁽¹⁰⁸⁾. Les seves característiques, però, van impedir que pogués ser aplicada en clínica, ja que és degradada enzimàticament i té una vida mitja molt curta (entre 2 i 3 minuts). Aquests resultats van promoure el desenvolupament d'anàlegs de la SST que tinguessin una major resistència a la degradació enzimàtica però que mantinguessin el pont disulfur i la seqüència aminoacídica X⁷-Trp⁸-Lys⁹-Y¹⁰ (on la X pot ser una Phe o una Tyr i la Y un Thr o una Val) ⁽¹⁰⁹⁾ ja que aquestes característiques permeten conservar l'afinitat pels receptors i la seva activitat biològica ^(102,110). Seguint aquestes premisses, s'han desenvolupat centenars d'anàlegs sintètics de la SST caracteritzats per tenir una cadena aminoacídica més curta que la SST natural (figura 1.7, A) i per presentar D-aminoàcids enlloc de L-aminoàcids, d'entre els quals destaca l'octreotide, ja que és l'anàleg més utilitzat en clínica en l'actualitat ⁽¹¹¹⁾.

L'**octreotide** (D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂) (figura 1.7) és més estable que la SST i té una elevada afinitat pel receptor SSTR2 ⁽¹¹⁰⁾, per la qual cosa s'utilitza en el diagnòstic i la localització de diversos tumors neuroendocrins, com els carcinoids, els tumors pancreàtics endocrins i els tumors pitüitaris ⁽¹¹¹⁾. Fins al moment s'han sintetitzat diversos conjugats octreotide-radionucli amb l'objectiu de visualitzar el tumor a través de la seva internalització i acumulació en les cèl·lules tumorals ⁽¹¹²⁾, com el ⁹⁰Y-DOTA-(D-Phe¹, Tyr³)-octreotide, l'anàleg més utilitzat en radioteràpia, i el In-DTPA-(D-Phe¹)-octreotide, el més utilitzat en gammagrafia ⁽¹¹¹⁾.

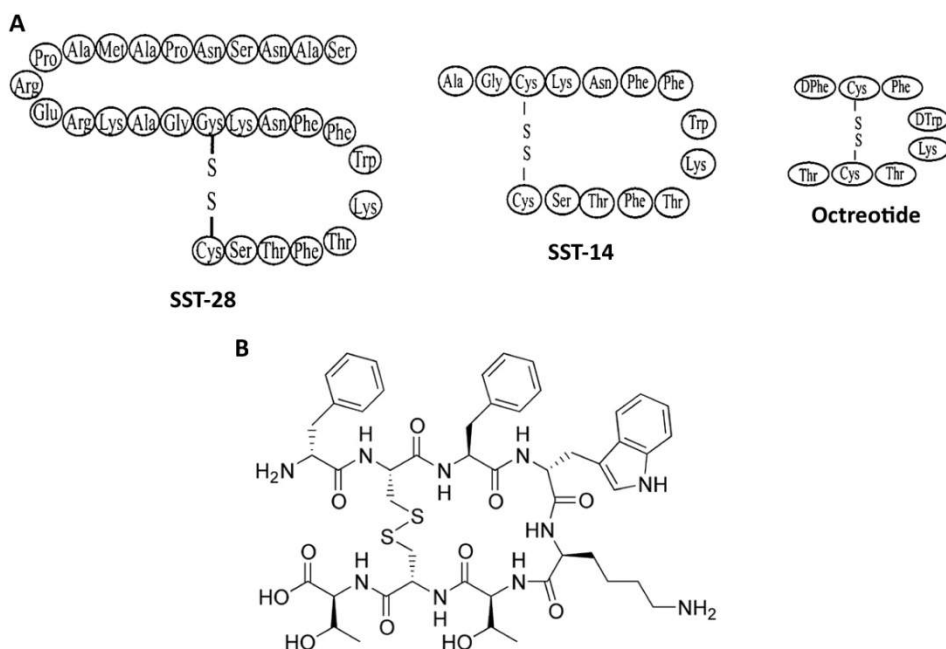


Figura 1.7. A. Estructura aminoacídica de la SST-28, la SST-14 i l'octreotide ⁽⁹⁸⁾. **B.** Estructura química de l'octreotide ⁽¹⁰¹⁾.

D'altra banda, també s'han sintetitzat conjugats constituïts per un anàleg de la SST i un fàrmac antitumoral amb la finalitat de dirigir específicament aquests agents a l'interior de les cèl·lules tumorals que sobreexpressen els SSTR (taula 1.2). Un d'aquests agents, el JF-10-81, té la camptotecina (CPT, *camptothecin*) unida a l'extrem N-terminal d'un anàleg de la SST, el JF-07-69 (D-Lys-D-Tyr-Lys-D-Tyr-D-Lys-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂), a través d'un grup carbamat; aquest compost té una elevada afinitat pel receptor SSTR2, internalitza ràpidament a l'interior de les cèl·lules a través d'aquest receptor i conserva una activitat antiproliferativa molt similar a la de la CPT en diferents línies cel·lulars ⁽¹¹³⁾. També s'han sintetitzat conjugats constituïts per la doxorubicina (DOX, *doxorubicin*) i el seu derivat 2-pirrolino-DOX, units a un octapèptid anàleg de la SST, el RC-121 (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂), els quals han mostrat

ser més efectius i menys tòxics que els fàrmacs inicials sense conjuguar⁽¹¹⁴⁻¹¹⁶⁾. El metotrexat (MTX, *methotrexate*) és un altre fàrmac que s'ha unit a anàlegs de la SST i que ha donat lloc a alguns conjugats, com l'AN-51 i el MTX-SST, que dirigeixen específicament el MTX a l'interior de les cèl·lules tumorals i que tenen una major efectivitat antitumoral i menors efectes adversos que el MTX^(98,117). El paclitaxel (PTX) o taxol també s'ha unit a l'extrem N-terminal de l'octreotide amb l'objectiu de millorar la seva selectivitat; aquest conjugat té una major activitat citotòxica en les cèl·lules que expressen els receptors SSTR2 i SSTR5 que en les cèl·lules que no els expressen, la qual cosa suggereix que aquesta unió dirigeix selectivament el PTX cap a les cèl·lules diana, disminuint, així, els seus efectes adversos⁽¹¹⁸⁾.

COMPLEX	DESCRIPCIÓ
JF-10-81	CPT unida a l'anàleg JF-07-69
AN-238	2-pirrolino-DOX unida a l'anàleg RC-121
AN-162	DOX unida a l'anàleg RC-121
AN-51	Metotrexat unit a l'anàleg RC-121
MTX-SST	Metotrexat unit a l'anàleg JF-07-69
PTX-SST	Paclitaxel unit a octreotide

Taula 1.2. Alguns complexos fàrmac-anàleg de la SST sintetitzats i provats fins al moment⁽⁹⁸⁾.

1.3.2.2 La via de l'àcid fòlic

Una altra de les molècules estudiades actualment per tal de vehiculitzar fàrmacs a l'interior de les cèl·lules tumorals és l'àcid fòlic. L'àcid fòlic, o vitamina B9, és una vitamina hidrosoluble essencial per la proliferació i el manteniment de les cèl·lules que participa en la transferència de grups metil a les vies metabòliques involucrades en la síntesi de nucleòtids⁽¹⁰⁰⁾. A l'organisme es troben diferents formes de la vitamina B9, però les més destacables són el 5-

metiltetrahidrofolat, que és la principal forma circulant en l'organisme, i l'àcid fòlic, que és la forma parental d'aquest grup de vitamines (figura 1.8).

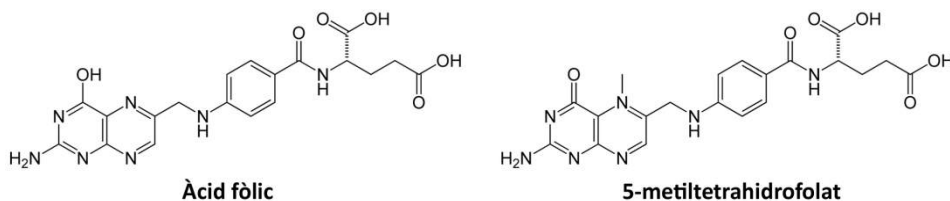


Figura 1.8. Estructura química de l'àcid fòlic i el 5-metiltetrahidrofolat.

Tot i la funció essencial dels folats, l'organisme humà no té la capacitat de sintetitzar-los, per la qual cosa, s'obtenen de la dieta a través de determinats aliments, com el fetge i els vegetals de fulla verda. Un cop a l'organisme, els folats entren a l'interior de la cèl·lula a través del portador de folat reduït (*RFC*, *reduced folate carrier*), el transportador de folat acoblat a protó (*PCFT*, *proton-coupled folate transporter*) o el receptor de folat (*FR*, *folate receptor*). D'aquests tres receptors, el RFC i el PCFT són considerats els transportadors principals ja que, tot i que tenen una baixa afinitat pels folats, permeten la seva absorció en la major part de les cèl·lules. El RFC s'ha descrit com el sistema de transport de folats més important, ja que està expressat de forma generalitzada en la majoria de cèl·lules i teixits de l'organisme, desenvolupa una funció fonamental en l'homeòstasi del folat i permet un transport ràpid i adequat dels folats a l'interior de la cèl·lula ^(119,120). El PCFT és un transportador que es troba altament expressat a la zona apical del duodè i a la zona proximal del jejú, per la qual cosa, la seva funció està principalment relacionada amb el transport del folat a l'intestí ⁽¹²⁰⁻¹²²⁾. Per últim, el FR és una proteïna N-glicosilada que presenta una elevada afinitat pels folats i que només es troba en determinades localitzacions, com la zona apical de les cèl·lules del teixit

epitelial i en alguns tipus de càncers, com el d'ovari, el de ronyó, el de pulmó, el de mama, el d'endometri i el de cèl·lules mieloides d'origen hematopoètic ⁽⁹⁹⁾. Aquestes característiques fan que el FR sigui el principal transportador dels conjugats que contenen folat, ja que pràcticament no tenen afinitat pels RFC i PCFT però presenten una elevada afinitat pel FR ⁽⁹⁹⁾.

En les darreres dècades s'han sintetitzat diversos conjugats de folat amb l'objectiu de fer el tractament i/o el marcatge dels tumors que expressen el FR. El seu estudi ha demostrat que la unió entre el FR i el conjugat genera un complex (conjugat-FR) que és internalitzat en la cèl·lula a través d'un mecanisme d'endocitosi mediada pel receptor (figura 1.9). Amb aquest mecanisme, el complex entra a l'interior de la cèl·lula mitjançant un endosoma primerenc que, quan madura, adquireix un pH àcid que provoca canvis en la conformació del receptor i permet l'alliberació del conjugat de folat. Posteriorment, les condicions que adopta l'endosoma fan possible que es trenqui la unió entre el folat i l'agent actiu i permeten l'alliberació d'aquest agent al citoplasma per tal que dugui a terme la seva activitat ^(123,124).

L'estudi d'aquest mecanisme ha demostrat que la molècula que uneix l'agent actiu al folat és un element clau a l'hora de sintetitzar aquests conjugats, ja que ha de mantenir unit el conjugat al FR durant tot el procés d'internalització però ha de permetre alliberar el compost quan l'endosoma adquireix les condicions idònies ^(99,124). Fins al moment han estat avaluades dues estratègies principals per tal de fer aquesta unió. La primera, es basa en la introducció d'una molècula que conté un pont disulfur en la seva estructura per tal que les condicions reductores de l'interior de l'endosoma ⁽¹²⁵⁾ trenquin aquesta estructura i alliberin el compost ^(124,126). La segona, es basa en la utilització de molècules que contenen grups ésters amb l'objectiu que el compost sigui

alliberat degut al pH àcid dels endosomes ^(127,128). L'elecció d'una de les dues alternatives depèn de les característiques del compost que s'uneix al folat o de les propietats del conjugat final; fins al moment, però, la primera és la que ha mostrat uns millors resultats, ja que fa una alliberació més ràpida del compost i permet obtenir uns conjugats més efectius ⁽⁹⁹⁾.

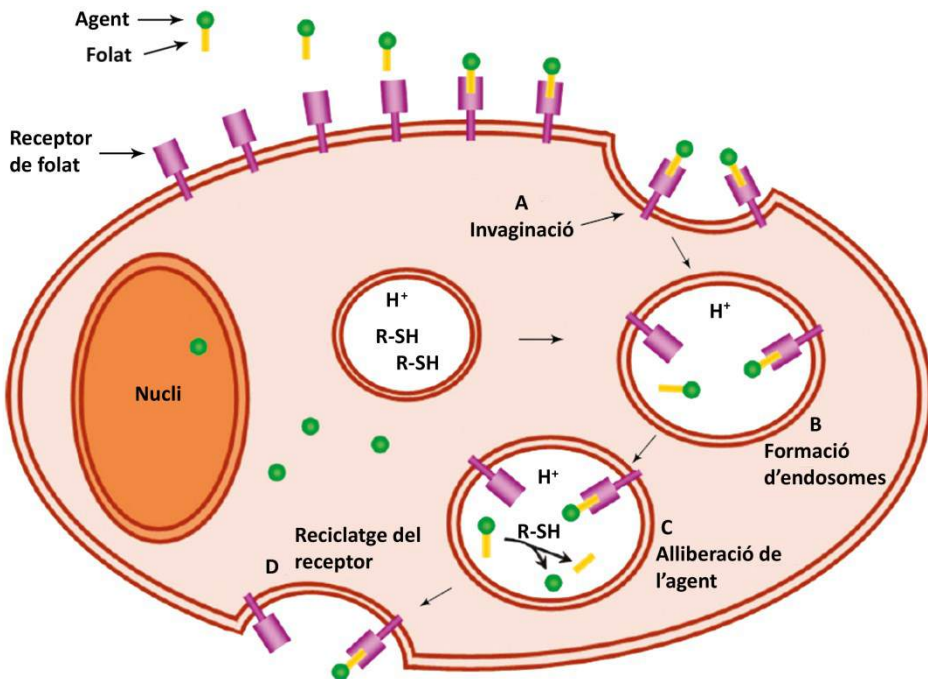


Figura 1.9. Endocitosis mediada pel receptor de conjugats amb folat. Els conjugats folat-agent s'uneixen al FR amb elevada afinitat. La membrana plasmàtica invagina al voltant del complex FR/folat-agent (A) i forma un endosoma (B) a l'interior del qual l'agent és alliberat del folat (C). Finalment, el FR és reciclat i retorna a la membrana plasmàtica (D) ⁽⁹⁹⁾.

S'han sintetitzat diversos conjugats constituïts pel folat i per agents radioactius o agents quimioterapèutics que estan sent avaluats en assaigs clínics ⁽⁹⁹⁾. La primera molècula assajada en humans ha estat el ¹¹¹In-DTPA-Folat (figura 1.10), un conjugat que té una elevada selectivitat pels teixits que sobreexpressen el FR, una ràpida eliminació dels teixits que no l'expressen i un lleu marcatge no

específic i pocs efectes adversos ^(100,129), per la qual cosa, ha estat utilitzat en el marcatge de tumors malignes que expressen el FR. L'èxit obtingut amb aquest compost ha promogut el desenvolupament del complex ^{99m}Tc-Folat (EC20) (figura 1.10), que presenta unes característiques similars ⁽¹³⁰⁾.

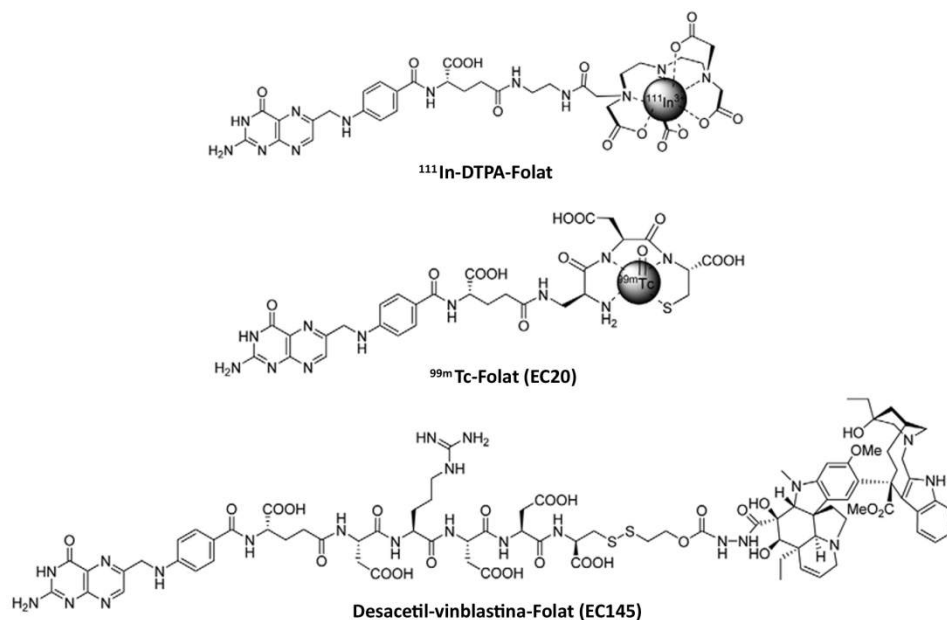


Figura 1.10. Estructura química del ¹¹¹In-DTPA-Folat, el ^{99m}Tc-Folat (EC20) i la Desacetil-vinblastina-Folat (EC145).

D'altra banda, s'ha estat treballant en el desenvolupament de conjugats que tenen un agent quimioterapèutic unit al folat a través d'una molècula que l'allibera a l'interior de la cèl·lula. Entre aquests complexos destaca l'EC145, un conjugat format per la desacetil-vinblastina, el folat i una molècula enllaçadora que conté un pont disulfur (figura 1.10). L'avaluació en assaigs clínics de l'EC145 ha confirmat la seva activitat antitumoral en el càncer d'ovari i de pulmó ⁽¹³¹⁾ i ha demostrat que té una toxicitat menor que la desacetil-vinblastina lliura ^(100,132). També s'han avaluat en clínica tres compostos més que estan units al

folat a través d'un espaiador hidrofílic (per millorar la solubilitat del conjugat) i un pont disulfur (per millorar l'alliberació del fàrmac) i que han demostrat que mantenen un efecte citotòxic similar que els seus fàrmacs homòlegs lliures però que presenten una toxicitat menor, la qual cosa confirma que la unió de compostos al folat disminueix la toxicitat inicial dels fàrmacs estudiats ⁽¹⁰⁰⁾.

1.4 La família HER-EGF en la resistència als tractaments oncològics

El desenvolupament de resistències per part de les cèl·lules tumorals és una altra limitació als tractaments antineoplàstics actuals ja que permet mantenir el creixement i la divisió de les cèl·lules tumorals tot i ser tractades amb fàrmacs que haurien de provocar la seva mort o una aturada en la seva proliferació. Aquesta limitació s'ha descrit pels agents oncològics convencionals però també s'ha relacionat amb algunes de les noves teràpies dirigides com, per exemple, amb els inhibidors de la família HER-EGF.

1.4.1 La família HER-EGF

La família de receptors del factor de creixement epidèrmic humà (HER, *human epidermal growth factor receptor*) pertany a la superfamília de receptors amb activitat tirosina quinasa i consta de quatre membres: EGFR (*epidermal growth factor receptor* o HER1), HER2 (també conegut com a ErbB2 o Neu), HER3 (ErbB3) i HER4 (ErbB4). Tots quatre receptors són enzims ancorats a la membrana cel·lular que consten d'un domini extracel·lular involucrat en el reconeixement i la unió al lligand, un domini hidrofòbic transmembrana amb estructura α -hèlix i un domini intracel·lular que consta d'una regió

juxtamembrana, un domini tirosina quinasa i un extrem carboxi terminal (figura 1.11). El domini intracel·lular dels receptors HER és altament conservat, excepte en el cas de HER3, que conté substitucions d'alguns aminoàcids crucials per la seva funció que provoquen que aquest receptor sigui considerat una pseudo-tirosina quinasa ^(133,134). D'altra banda, els dominis extracel·lulars d'aquests receptors són menys conservats, fet que es relaciona amb la diferent especificitat d'unió a lligand dels quatre membres ⁽¹³⁴⁾.

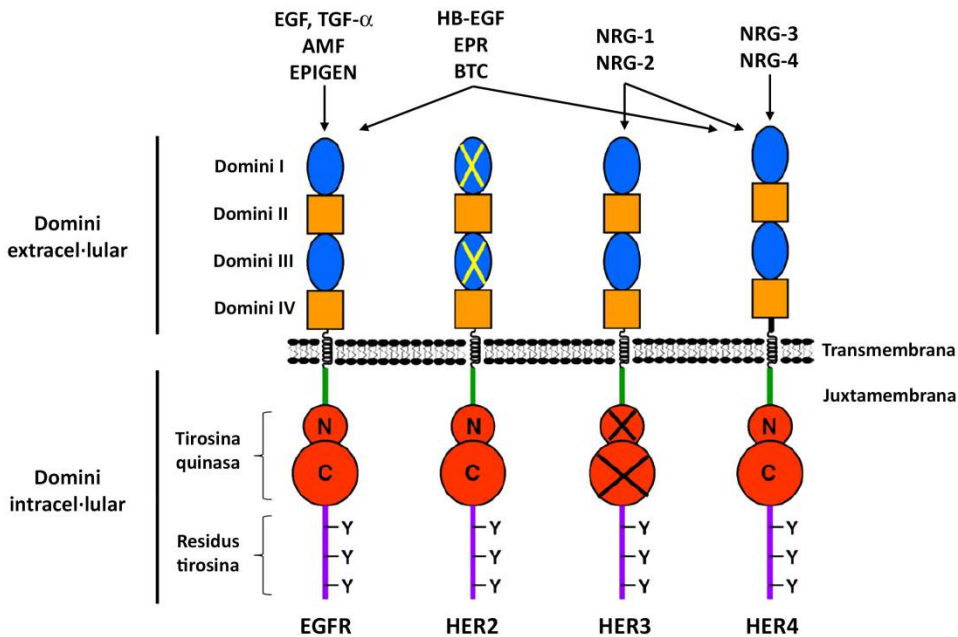


Figura 1.11. Receptors HER i els seus lligands. Els receptors HER estan constituïts per un domini extracel·lular format per 4 dominis, per una regió transmembrana i per un domini intracel·lular que conté l'activitat tirosina quinasa del receptor i els residus de tirosina que poden ser fosforilats. Els dominis dels receptors HER2 i HER3 que no són funcionals o que tenen menys funcionalitat estan indicats amb una "X". Els lligands de la família HER es classifiquen en funció de la capacitat que tenen per unir-se als receptors ⁽¹³⁵⁾.

L'activació dels receptors HER es produeix a través de la unió del lligand, la qual cosa induïx la hetero-dimerització del receptor amb un altre membre de la mateixa família o la seva homo-dimerització. Aquest fet provoca la fosforilació de residus de tirosina específics de la seva cua citoplasmàtica i permet l'activació de diferents vies de senyalització intracel·lular, predominantment la de les quinases reguladores de la senyalització extracel·lular 1/2 (ERK1/2, *extracellular signal-regulated kinases*) i la de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K, *phosphoinositide 3-kinase*)/Akt (també coneguda com a proteïna quinasa B (PKB, *protein kinase B*)) (figura 1.12)⁽¹³⁶⁻¹³⁸⁾. Aquestes vies controlen diferents processos biològics com la proliferació cel·lular, la diferenciació, la supervivència, la migració o l'angiogènesi, la qual cosa relaciona la família HER-EGF amb molts processos biològics diferents^(134,139,140).

Els lligands dels receptors HER pertanyen a la família dels factors de creixement peptídics relacionats amb l'EGF. Aquests lligands es classifiquen en tres grups depenent de la seva especificitat d'unió al receptor. El primer grup inclou l'EGF, el factor de creixement tumoral α (TGF- α , *tumor growth factor α*), l'amfiregulina (AMF, *amphiregulin*) i l'epigen (EPG), que són els lligands que específicament s'uneixen a l'EGFR. El segon grup, que està format per aquells lligands que tenen especificitat tant per EGFR com per HER4, inclou la betacelulina (BTC, *betacellulin*), el factor de creixement epidèrmic amb capacitat d'unió a l'heparina (HB-EGF, *heparin-binding epidermal growth factor*) i l'epiregulina (EPR, *epiregulin*). El tercer grup de lligands és el que està conformat per les neuregulines (NRG, *neuregulin*), les quals es divideixen en dos subgrups en funció de la capacitat que mostren d'unió als receptors. Així, la NRG-1 i la NRG-2 s'uneixen a HER3 i HER4, mentre que la NRG-3 i la NRG-4, s'uneixen només a HER4^(134,135). Actualment, no es coneix cap lligand de la família EGF que s'uneixi a HER2 però, tot i això, aquest receptor és molt

important ja que és la parella preferida pels altres receptors a l'hora de formar hetero-dímers ⁽¹⁴¹⁾.

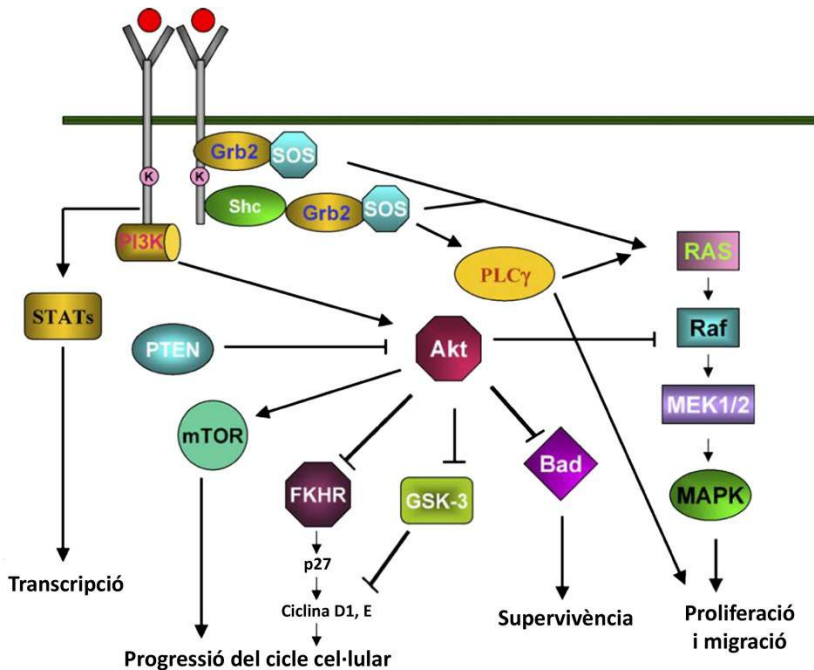


Figura 1.12. Vies de senyalització relacionades amb l'activació dels receptors HER a través dels seus lligands. La unió del lligand induïx la homo o hetero-dimerització dels receptors provocant la fosforilació dels residus de tirosina de la cua C-terminal dels receptors HER i activant diferents vies de transducció de la senyal implicades en la transcripció, la progressió del cycle cel·lular, la supervivència i la proliferació i la migració ⁽¹⁴²⁾.

La família HER-EGF s'ha relacionat amb el desenvolupament i la patogènia de molts carcinomes humans, entre els quals s'inclouen el càncer de pulmó de cèl·lules no petites (NSCLC, *non-small cell lung carcinoma*), l'adenocarcinoma colorectal, el glioblastoma, el carcinoma de coll i cap i els càncers gàstric, pancreàtic, de mama, d'ovari, de cèrvix i de pròstata ^(138,143,144). L'activació oncogènica d'aquesta via es produeix a través de diferents mecanismes, com una expressió excessiva de lligand, una elevada expressió dels receptors

(sobretot de EGFR i HER2), l'aparició de mutacions activadores de la via HER, la fallada en els mecanismes d'inactivació d'aquesta via o la transactivació a través de la dimerització dels receptors ^(141,143,145).

1.4.2 Teràpies dirigides a inhibir la família HER-EGF en el tractament oncològic

En els darrers anys s'han desenvolupat diverses molècules dirigides a inhibir els HER en els carcinomes humans, com els anticossos monoclonals, les molècules petites inhibidores de l'activitat tirosina quinasa, les proteïnes recombinants i les molècules mimetitzadores de pèptids ⁽¹⁴⁶⁾. Entre aquestes, destaquen els **anticossos monoclonals** i les **molècules petites inhibidores de l'activitat tirosina quinasa** ja que actualment estan sent utilitzades en clínica ⁽¹⁴⁶⁻¹⁵⁰⁾.

1.4.2.1 Els anticossos monoclonals

Els anticossos monoclonals són agents que reconeixen epítops dels HER i s'hi uneixen amb elevada afinitat. Aquestes molècules realitzen la seva activitat a través de diferents mecanismes: estabilitzant la conformació inactiva del receptor o bloquejant la formació de la seva conformació activa, bloquejant la zona d'unió del lligand, impedit la dimerització dels receptors, induint la internalització o la destrucció dels receptors o activant la resposta immunològica en contra de les cèl·lules a les quals es troben units ^(151,152).

Actualment, existeixen diversos anticossos monoclonals dirigits contra els receptors EGFR i HER2 que han mostrat activitat clínica en una gran varietat de

neoplàsies i que s'estan usant en clínica, com el Cetuximab (Erbix[®]), el Panitumumab (Vectibix[®]) i el Trastuzumab (Herceptin[®]).

El **cetuximab** (C225, Erbitux[®]), és una immunoglobulina (Ig) G1 quimèrica que s'uneix al domini III del receptor EGFR amb una afinitat molt elevada, semblant a la de l'EGF i el TGF- α . La unió del cetuximab a l'EGFR indueix la internalització i la degradació del receptor sense haver estat prèviament fosforilat i activat ^(153,154), la qual cosa resulta en una disminució en l'activitat del receptor, una reducció en la disponibilitat del receptor en la membrana plasmàtica i prevé l'activació de les vies de transducció de la senyal associades a l'EGFR. A través d'aquests mecanismes el cetuximab inhibeix el creixement i la proliferació de diferents tipus de cèl·lules tumorals bloquejant la fase G1 del cicle cel·lular, induint l'apoptosi de les cèl·lules, inhibint l'angiogènesi tumoral, inhibint la invasió i metàstasi i activant la resposta citotòxica mediada per les cèl·lules i dependent d'anticossos ⁽¹⁵⁴⁻¹⁵⁶⁾. Actualment el seu ús en clínica està autoritzat per l'agència europea d'avaluació de medicaments (EMA, *european medicines evaluation agency*) i la *Food and Drug Administration* (FDA) dels EUA pel tractament del càncer colorectal metastàtic i pel carcinoma de cèl·lules escamoses de cap i coll (HNSCC, *head and neck squamous cell carcinoma*), administrat en combinació amb radioteràpia i altres agents quimioterapèutics.

El **panitumumab** (Vectibix[®]), és una IgG2 humana que s'uneix al domini extracel·lular de l'EGFR amb una elevada afinitat, la qual cosa impedeix la unió del lligand i prevé la fosforilació del receptor i l'activació de determinades quinases associades a l'EGFR. Aquesta acció provoca la inhibició del creixement cel·lular, la inducció de l'apoptosi, la disminució de la producció de citoquines proinflamatòries i del factor de creixement vascular i la internalització de l'EGFR ⁽¹⁵⁷⁾. El panitumumab té el seu ús aprovat en clínica per la EMA i la FDA en el

tractament del càncer colorectal metastàtic, administrat sol o en combinació amb altres agents quimioterapèutics.

El **trastuzumab** (Herceptin®) és una IgG1 humanitzada que s'uneix a la regió extracel·lular del receptor HER2. Aquesta unió provoca la disminució de l'expressió de HER2 en la membrana cel·lular, l'augment de l'endocitosi i la degradació del receptor, una disminució en l'activació de les vies de senyalització activades per HER2, la inhibició de la senyalització activada per altres membres de la família HER al prevenir l'heterodimerització d'aquests receptors amb el receptor HER2 o l'activació de la resposta citotòxica mediada per les cèl·lules i dependent d'anticossos^(158,159). A través d'aquests mecanismes, produeix la seva activitat antitumoral disminuint la proliferació cel·lular, augmentant l'apoptosi i disminuint l'angiogènesi^(160,161). El trastuzumab, administrat juntament amb radioteràpia i altres agents utilitzats en quimioteràpia, té aprovat el seu ús en clínica per la EMEA i la FDA pel tractament del càncer de mama primerenc i metastàtic i pel tractament del càncer d'estómac metastàtic^(162,163).

1.4.2.2 Les molècules petites inhibidores de l'activitat tirosina quinasa

Les molècules petites inhibidores de l'activitat tirosina quinasa (TKI, *tyrosine kinase inhibitors*) són compostos sintètics que tenen una estructura derivada de la quinazolina i, per tant, molt semblant a la de l'ATP. Aquesta característica els permet inhibir competitiu la unió de l'ATP a la regió intracel·lular del receptor, impeding, així, la seva activitat tirosina quinasa, evitant la fosforilació del receptor i impeding l'activació de les vies de senyalització activades pel receptor^(164,165). A diferència dels anticossos monoclonals, que són molt específics per la diana per la qual han estat dissenyats, els inhibidors de

l'activitat tirosina quinasa no tenen una especificitat tan elevada ⁽¹⁶⁶⁾, per la qual cosa poden inhibir l'activitat d'altres receptors amb activitat quinasa ⁽¹⁶⁷⁾. Per altra banda, poden ser administrats oralment, la qual cosa representa una gran qualitat a l'hora de ser utilitzats en clínica.

En els darrers 20 anys s'han desenvolupat diversos TKI de diferents receptors. El **gefitinib** (Iressa®) i l'**erlotinib** (Tarceva®) inhibeixen la fosforilació del domini tirosina quinasa del EGFR, fet que s'ha relacionat amb una inhibició de la proliferació del tumor i amb la inducció de l'apoptosi en les cèl·lules tumorals ^(168,169). Actualment, el gefitinib té el seu ús aprovat en clínica per la FDA i la EMEA en el tractament del NSCLC quan els tractaments convencionals han fallat. D'altra banda, l'erlotinib s'utilitza en monoteràpia pel tractament del càncer NSCLC i pel càncer pancreàtic avançat en combinació amb la gemcitabina.

El **lapatinib** (Tyverb®) és un inhibidor de l'activitat tirosina quinasa dels receptors EGFR i HER2 que s'està utilitzant pel tractament del càncer de mama, ja que s'ha descrit que inhibeix la proliferació cel·lular, indueix l'apoptosi i provoca una parada del cicle cel·lular en cèl·lules que sobreexpressen el receptor HER2 ⁽¹⁵⁰⁾.

1.4.3 Resistència a les teràpies dirigides a inhibir la família HER-EGF

Tot i que actualment diversos anticossos monoclonals i TKI dirigits a inhibir la família HER-EGF estan sent utilitzats en clínica amb èxit, en alguns casos tenen una eficàcia clínica limitada ^(170,171) degut, principalment, al desenvolupament de resistències per part de les cèl·lules tumorals. Es coneixen diferents mecanismes implicats en l'aparició d'aquestes resistències, d'entre els quals

destaquen l'activació d'altres receptors de factors de creixement alternatius a la via HER-EGF, l'aparició de mutacions en els receptors HER, l'activació constitutiva de les vies de senyalització de forma independent a l'activació dels receptors HER, l'augment de factors i mediadors de l'angiogènesi i l'augment en la producció autocrina/paracrina dels receptors i els lligands de la pròpia via HER-EGF (figura 1.13) ⁽¹⁷¹⁻¹⁷³⁾.

1.4.3.1 Activació de receptors de factors de creixement alternatius a la família HER-EGF

La inhibició de la família HER-EGF pot provocar que s'activin altres sistemes de senyalització no relacionats amb aquesta família, com la via del factor de creixement de la insulina (IGF-IGFR, *insulin growth factor - insulin growth factor receptor*) o la via del factor de creixement hepatocític (HGF-HGFR, *hepatocyte growth factor - hepatocyte growth factor receptor*). La via IGF-IGFR és una ruta que s'ha trobat activada en diferents línies tumorals de càncer de mama, de pròstata i en gliomes resistents a inhibidors de la via HER, a través d'un augment en l'expressió de IGF o IGFR o de l'activació de les seves rutes de senyalització (PI3K-Akt i Ras/Raf/MEK/ERK) ^(171,172,174). El receptor HGFR, que és activat per l'HGF, és un receptor que està involucrat en moltes funcions biològiques, com el creixement i la supervivència cel·lulars; la seva activació també s'ha relacionat amb la resistència a teràpies dirigides contra la via HER, sobretot amb els TKI ⁽¹⁷⁵⁾.

1.4.3.2 Mutacions en els receptors HER

Una de les mutacions més ben caracteritzades és la que dóna lloc a la variant VIII de l'EGFR (EGFRvIII). L'aparició d'aquesta variant es deu a una delecció des del domini 2 fins al domini 7 de la zona extracel·lular del receptor, la qual cosa permet que el receptor estigui constitutivament activat sense necessitat d'unir-se al lligand. La sobreexpressió d'aquesta variant EGFRvIII en el HNSCC i en el glioblastoma multiforme (GBM), s'ha relacionat amb el desenvolupament de resistències per part d'aquestes cèl·lules al tractament amb cetuximab i gefitinib, respectivament ^(176,177).

Una altra mutació coneguda relacionada amb l'aparició de resistències als TKI és un canvi entre una treonina de la posició 790 que passa a ser una metionina (T790M) en el receptor EGFR. Aquesta mutació produeix una disminució en la resposta al gefitinib i a l'erlotinib en pacients que inicialment responien al tractament ⁽¹⁷⁵⁾.

1.4.3.3 Activació constitutiva de les vies de senyalització activades pels receptors HER

Un altre mecanisme implicat en la resistència és l'activació persistent de vies de senyalització intracel·lulars activades pels receptors HER independentment de l'activació pel lligand. Aquestes vies intracel·lulars, com la de la PI3K/Akt o la de les MAPK, estan involucrades en la proliferació, la supervivència, la diferenciació i la motilitat cel·lulars ^(139,140). La seva activació es produeix a través de diferents mecanismes com l'amplificació directa del gen de la PI3K, la presència de mutacions activadores a la subunitat p85 de la PI3K, la sobreexpressió del gen de l'Akt o la pèrdua de funció de gens inactivadors de la

via, com el gen homòleg de fosfatasa i tensina (*PTEN, phosphatase and tensin homolog*)^(171,175,178).

La resistència també s'ha relacionat amb la desregulació d'altres mediadors implicats en les vies de transducció de la senyal, com la família de quinases Src o Ras^(173,178). La família de quinases Src són un grup de molècules amb activitat tirosina quinasa que medien el creixement i la supervivència cel·lulars; la seva activació constitutiva s'ha relacionat amb la progressió de diferents tipus de tumors⁽¹⁷⁹⁾ i amb el desenvolupament de resistències a les teràpies inhibidores de la via HER⁽¹⁸⁰⁾. Per altra banda, Ras és una GTPasa que és activada pel receptor EGFR i que activa la via Ras/Raf/ERK/MAPK⁽¹⁸¹⁾, per tant, la presència de mutacions activadores de Ras disminueix l'efectivitat dels TKI, ja que activa les vies de transducció de la senyal de l'EGFR independentment de l'estimulació d'aquest receptor⁽¹⁸²⁾.

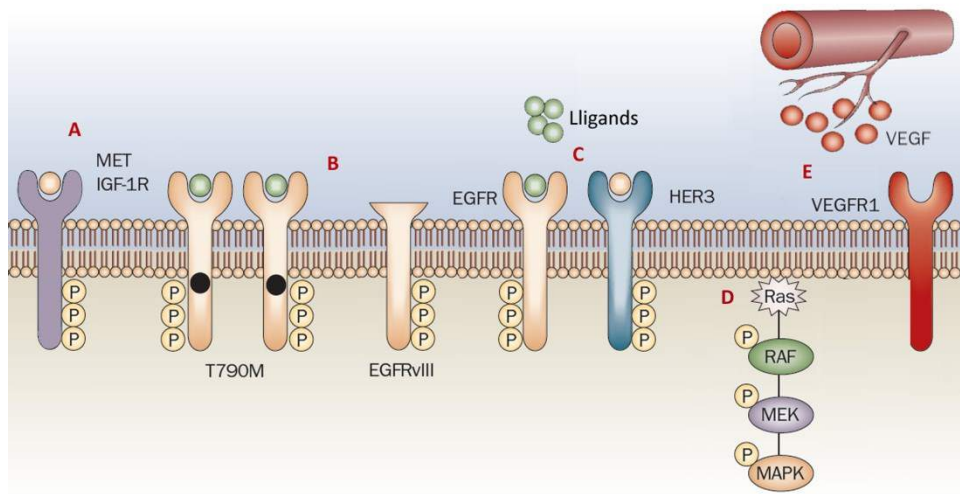


Figura 1.13. Mecanismes de resistència a les teràpies dirigides contra el receptor EGFR. Activació de vies de senyalització de receptors de factors del creixement alternatius (A). Aparició de mutacions en el receptor (B). Augment en l'expressió i la producció de receptors alternatius i lligands de la via HER (C). Activació constitutiva de vies de senyalització (D). Augment en l'angiògenesis (E)⁽¹⁷¹⁾.

1.4.3.4 Augment en l'angiogènesi

En les cèl·lules tumorals, la via HER-EGF controla parcialment la producció de factors de creixement vasculars endotelials (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) i altres mediadors de l'angiogènesi, per la qual cosa, l'activació d'aquesta via s'ha relacionat amb un augment en l'angiogènesi tumoral ^(173,178,183) i la seva inhibició s'ha associat a una disminució en la producció de VEGF ^(184,185). Per altra banda, en el desenvolupament de la resistència al EGFR s'ha observat una sobreexpressió de VEGF que manté la supervivència i augmenta la capacitat d'angiogènesi de les cèl·lules tot i tenir el receptor EGFR inhibit ^(171,173,178), fet que ha relacionat aquesta via amb l'aparició de resistències a aquets agents.

1.4.3.5 Augment de l'expressió de receptors HER alternatius i de la producció de lligands de la família HER-EGF

Un altre mecanisme es basa en la sobreexpressió de receptors HER alternatius a l'inhibit i en l'augment de l'expressió i la producció de lligands de la pròpia via. Aquest mecanisme indueix la formació d'uns bucles autocrins a les cèl·lules tumorals que mantenen activades les vies de senyalització i de proliferació cel·lulars independentment que un dels receptors HER es trobi inhibit. En aquest sentit, estudis previs del nostre grup amb línies cel·lulars de càncer de mama han demostrat la capacitat d'aquestes cèl·lules per compensar la pèrdua d'activitat de l'EGFR induïda pel gefitinib a través d'un augment en l'expressió gènica de lligands de la via HER-EGF, especialment l'EPR, la NRG i l'EGF ⁽¹⁸⁶⁾. Uns resultats similars s'han descrit per una línia cel·lular de NSCLC resistent a cetuximab, en la qual s'ha observat un augment en l'expressió de l'EGF, l'AMF,

l'HB-EGF i la BTC ⁽¹⁸⁷⁾, i en una línia de càncer de mama resistent al trastuzumab, on l'augment en l'expressió del TGF- α , l'HB-EGF i la NRG s'ha relacionat amb un augment en la fosforilació de EGFR i de l'heterodímer EGFR/HER2 ⁽¹⁸⁸⁾.

La resistència a aquestes teràpies també s'ha associat a canvis en l'expressió de receptors alternatius a l'inhibit, sobretot a la sobreexpressió i activació del receptors HER2 i HER3. En aquest sentit, el desenvolupament de línies de càncer de pulmó i de càncer de coll i cap resistents al cetuximab, ha resultat en un augment en l'expressió i la senyalització dels receptors HER2 i HER3 ⁽¹⁷⁰⁾. Aquesta relació també s'ha establert en cèl·lules de càncer de cap i coll resistents al gefitinib, en les quals, l'augment detectat en l'expressió de HER2 i HER3 ha demostrat que aquests receptors poden ser usats com a marcadors predictius per aquest tipus de càncer i com a dianes terapèutiques per ser inhibides de forma combinada amb l'EGFR en aquest tipus de tumors ⁽¹⁸⁹⁾. En el càncer de mama també s'ha observat un augment en l'expressió del HER3 que, en resposta al tractament amb TKI dirigits a inhibir el EGFR i el HER2, activa una via de senyalització alternativa i compensatòria a l'inhibida ⁽¹⁹⁰⁾. D'altra banda, aquest mecanisme de resistència també s'ha estudiat en alguns tumors que no responen a les teràpies dirigides a inhibir la via HER-EGF en els assaigs clínics com, per exemple, el càncer de pròstata (PCa, *prostate cancer*). En aquest sentit, el desenvolupament d'una línia cel·lular de PCa resistent al gefitinib ha demostrat que la resistència pot ser deguda, entre d'altres mecanismes, a un augment en l'expressió del receptor HER2 ⁽¹⁹¹⁾.

1.4.4 El càncer de pròstata

El PCa és, en l'actualitat, el segon càncer diagnosticat amb més freqüència en homes a nivell mundial i és la sisena causa de mort per càncer en aquesta població ⁽¹⁾. Pel què fa als països de la Unió Europea, aquest tipus de càncer és el més freqüent en homes, seguit pel càncer de pulmó, amb un total de 338.700 casos nous l'any 2008 ⁽¹⁹²⁾.

Tot i que la seva etiologia no és totalment coneguda, l'aparició i la progressió del PCa s'ha relacionat a factors com l'edat, la raça i factors hereditaris del pacient. En relació a l'edat, s'ha demostrat que la prevalença del PCa augmenta amb l'edat ja que el 65% del total dels PCa diagnosticats afecta a pacients majors de 65 anys ⁽¹⁹³⁾. D'altra banda, s'ha detectat que la raça afroamericana mostra una prevalença tres vegades superior a patir PCa que la raça caucàsica, mentre que la raça asiàtica és la que mostra una menor prevalença a patir aquest tipus de patologia ⁽¹⁹⁴⁾. Pel què fa als factors hereditaris, s'ha descrit que els homes amb un familiar de primer grau amb antecedents de PCa tenen dues vegades més probabilitats de desenvolupar aquest tipus de tumor, mentre que els que tenen dos o més familiars amb aquesta malaltia són gairebé quatre vegades més propensos a ser diagnosticats de PCa ⁽¹⁹³⁾.

1.4.4.1 Desenvolupament del càncer de pròstata

El teixit prostàtic normal té un creixement i unes funcions que són bàsicament controlades a través de l'acció de diferents hormones i factors de creixement. Els andrògens són els principals reguladors d'aquestes funcions ja que a través de la unió al receptor d'andrògens (AR, *androgen receptor*), regulen l'expressió de gens específics implicats en el manteniment del fenotip i l'homeòstasi de la

glàndula prostàtica (figura 1.14). En l'inici d'un PCa, s'esdevenen una sèrie de canvis en les cèl·lules de la pròstata que permeten el seu creixement incontrol·lat ⁽⁷⁾. En aquest estadi, les cèl·lules prostàtiques continuen sent depenents dels andrògens, per tant, els tractaments més utilitzats i eficaços en aquests tipus de tumors són les teràpies hormonals basades en eliminar els andrògens testiculars del pacient (ADT, *androgen deprivation therapy*) ^(195,196). Inicialment la majoria de pacients responen a l'ADT però, tot i això, alguns PCa es tornen resistents i evolucionen a uns tipus de tumors refractaris a aquesta teràpia i amb una major capacitat de proliferació i d'invasió que el PCa inicial ⁽¹⁹⁶⁾: el PCa resistent a la castració androgènica (CRPC, *castration-resistant prostate cancer*), que no respon a l'ADT però que continua sent depenent d'andrògens i és sensible a altres teràpies hormonals ⁽¹⁹⁷⁾, i el PCa androgen-independent (AIPC, *androgen-independent prostate cancer* o HRPC, *hormone-resistant prostate cancer*), que no depèn dels andrògens ⁽¹⁹⁸⁻²⁰⁰⁾. En el desenvolupament d'aquests tumors hi estan implicats diversos processos, entre els quals s'inclouen l'amplificació del gen del AR, les mutacions activadores del AR, els canvis en molècules coreguladores del AR i l'activació del AR independentment de la unió del lligand ^(195-198,201,202). Es coneixen diversos factors de creixement polipeptídics i altres factors autocrins que activen la senyalització intracel·lular del AR independentment de la unió dels andrògens, entre les quals destaca la família HER-EGF ^(203,204).

1.4.4.2 El càncer de pròstata i la família HER-EGF

La relació entre la via HER-EGF i el PCa s'ha estudiat extensament en els últims anys. Alguns autors l'han relacionat amb l'activació del AR ja que activa rutes de transducció de la senyal del AR en absència dels andrògens i permet mantenir

el creixement cel·lular a través del AR independentment de l'estimulació del lligand (figura 1.14) ⁽²⁰⁵⁻²¹⁰⁾.

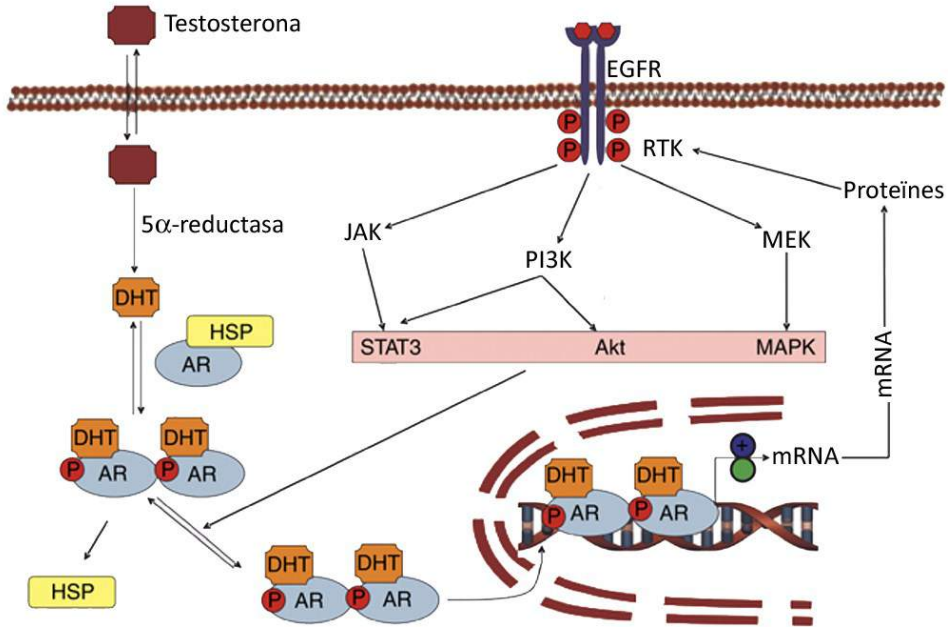


Figura 1.14. Senyalització a través del receptor d'andrògens en el teixit prostàtic normal i en el càncer de pròstata. En el teixit prostàtic normal, la testosterona lliura travessa la membrana cel·lular i activa el receptor d'andrògens (AR). La interacció d'aquest complex amb el DNA regula l'expressió de gens implicats en el manteniment del fenotip i l'homeòstasi de la glàndula prostàtica i, en concret, disminueix l'expressió del gen de l'EGFR. En el PCa canvia la regulació de l'expressió gènica dels receptors HER que, a través de les seves vies de senyalització, permeten activar al AR independentment de la presència de la testosterona. Aquests canvis provoquen la progressió del PCa a un estat de resistència que permet activar la senyalització del AR sense necessitat d'unió al seu lligand donant lloc a la proliferació, la migració i la supervivència de les cèl·lules ⁽²¹¹⁾.

Pel què fa al EGFR, s'ha demostrat que tot i que en el teixit normal de pròstata els andrògens actuen inhibint l'expressió d'aquest receptor, en el PCa l'expressió d'aquest receptor augmenta, fet que s'ha relacionat amb la

progressió del PCa cap a l'estadi de resistència ^(204,212). En relació a HER2, s'ha descrit que l'activació d'aquest receptor augmenta la transcripció i l'estabilitat del AR contribuint així, amb l'activitat d'aquest receptor en el CRPC ⁽²¹³⁻²¹⁹⁾. El HER3 també s'ha relacionat amb la progressió del PCa a la fase de resistència, ja que provoca un augment en l'activitat transcripcional del AR i en la progressió del cicle cel·lular ^(193,218-220). La relació entre el HER4 i el PCa mostra més controvèrsia. En el teixit prostàtic normal l'expressió de HER4 s'ha associat a la diferenciació cel·lular, una disminució del creixement i una supressió del desenvolupament tumoral ⁽²²¹⁾. D'altra banda, l'expressió elevada d'aquest receptor en el PCa s'ha associat tant a unes característiques menys agressives del tumor i a una aturada en el creixement d'aquestes cèl·lules tumorals ⁽²²²⁻²²⁴⁾ com a un augment en la proliferació cel·lular i en la capacitat migratòria de les cèl·lules tumorals ^(225,226). Pel que fa als lligands, s'ha demostrat que estan més expressats en les cèl·lules tumorals que en el teixit prostàtic normal ^(221,227) i que la seva expressió es relaciona amb un augment en l'activació del AR en el PCa ⁽²²⁸⁾; a més, tot i que no s'ha establert si aquesta sobreexpressió té alguna significança pronòstica en el PCa, l'evidència ha demostrat que aquests pèptids promouen el creixement autònom i la diferenciació d'aquestes cèl·lules ^(212,229,230).

La relació establerta entre la família EGF-HER i el PCa ha promogut l'avaluació de les teràpies dirigides a inhibir aquesta família en el tractament del PCa. Els resultats han demostrat que *in vitro* i *in vivo* agents com el cetuximab, el trastuzumab, el gefitinib o l'erlotinib inhibeixen el creixement de les cèl·lules tumorals prostàtiques ⁽²³¹⁻²³⁴⁾. D'altra banda, els assaigs clínics demostren que aquests agents no tenen efectes beneficiosos en la majoria de pacients amb PCa ⁽²³⁵⁻²³⁹⁾. Actualment, es desconeixen els mecanismes implicats en la manca

d'efectivitat d'aquests tractaments en clínica, per la qual cosa, elucidar si el desenvolupament de resistències està implicat en aquesta manca d'efectivitat és de gran importància per tal de trobar estratègies que permetin millorar-la.

Anàlisi de la vehiculització
de compostos metàl·lics
com a agents antitumorals
i de la família HER-EGF en la
resistència als tractaments
oncològics

2 Hipòtesi i objectius

Actualment, el càncer és un dels problemes de salut pública més importants de la nostra societat ⁽¹⁾. Un dels pilars del seu tractament és la teràpia farmacològica antineoplàstica, una estratègia que ha millorat molt el pronòstic d'alguns tipus de càncer però que continua presentant certes limitacions, com els efectes secundaris i l'aparició de resistències, per la qual cosa, incrementar la selectivitat de les teràpies i establir els mecanismes implicats en l'aparició d'aquestes resistències és encara un dels grans reptes de la recerca oncològica actual.

En aquesta tesi ens hem plantejat una nova estratègia per millorar la selectivitat i eficàcia dels tractaments oncològics. Aquesta estratègia es basa en vehiculitzar compostos metàl·lics amb potencial activitat citotòxica a l'interior de les cèl·lules tumorals, a través de la seva unió a molècules que tenen els seus receptors sobreexpressats en la membrana d'aquests tipus cel·lulars i que internalitzen a través de diferents mecanismes.

El primer objectiu que ens hem proposat, doncs, és sintetitzar una sèrie de conjugats formats per compostos metàl·lics de platí, ruteni i osmi amb potencial activitat citotòxica i anàlegs de la somatostatina (octreotide) i de folat com a portadors biològics, per tal de determinar si són biològicament actius i si confereixen als compostos una major selectivitat per les cèl·lules tumorals que sobreexpressen els seus receptors respecte la resta de cèl·lules de l'organisme. Aquest objectiu general està integrat pels objectius específics següents:

1. Sintetitzar i caracteritzar diversos anàlegs d'octreotide i conjugar-los a compostos metàl·lics de platí (II), areno-complexos de ruteni (II) i areno-complexos d'osmi (II).

2. Avaluar la capacitat dels anàlegs d'octreotide d'internalitzar a l'interior de cèl·lules tumorals que sobreexpressen el SSTR2.
3. Caracteritzar l'activitat citotòxica, el mecanisme d'acció i la selectivitat dels conjugats i dels corresponents complexos metàl·lics.
4. Analitzar l'efecte citotòxic d'un conjugat constituït per un complex de platí (IV) i per un anàleg del folat per tal d'avaluar la capacitat del folat d'actuar com a agent vehiculitzador de compostos metàl·lics.

D'altra banda, els avenços realitzats en relació a la teràpia dirigida han permès desenvolupar nous agents pel tractament oncològic, entre els quals destaquen els fàrmacs que inhibeixen específicament els receptors de la família HER-EGF. Tot i els bons resultats que s'han obtingut amb aquestes teràpies, el seu ús es veu limitat pel desenvolupament de resistències per les cèl·lules tumorals. Dins dels diversos mecanismes de resistència que s'han descrit, en aquest treball hem volgut analitzar la capacitat de les cèl·lules tumorals d'establir bucles autocrins mitjançant la sobreexpressió dels HER i la producció de lligands de la pròpia família que els permetin mantenir activades les vies de proliferació cel·lulars tot i tenir un dels receptors inhibits. En concret, s'ha volgut analitzar si aquest mecanisme està implicat en la baixa efectivitat clínica d'aquestes teràpies en el PCa, ja que el desenvolupament d'aquests tipus de tumors s'ha relacionat amb aquesta via de factors de creixement

Així, el segon objectiu general que ens hem plantejat en aquest treball ha sigut estudiar si les cèl·lules de PCa presenten un mecanisme de resistència intrínsec que els permet modular l'expressió dels membres de la família HER-EGF en

resposta als inhibidors d'aquesta via. Aquest objectiu general està integrat pels objectius específics següents:

1. Caracteritzar l'expressió dels receptors i els lligands de la via HER-EGF en dues línies de càncer de pròstata androgen-independents.
2. Determinar l'efecte de tres inhibidors de l'EGFR, dos inhibidors de l'activitat tirosina quinasa, el gefitinib i l'erlotinib, i un anticòs monoclonal, el cetuximab, sobre el creixement i la proliferació d'aquestes línies tumorals.
3. Determinar l'efecte del gefitinib, l'erlotinib i el cetuximab sobre l'expressió dels receptors i lligands de la via HER-EGF en les dues línies de càncer de pròstata androgen-independents.
4. Caracteritzar si la sobreexpressió de lligands i receptors de la via HER-EGF està relacionat amb la resistència a agents inhibidors de l'EGFR mitjançant el desenvolupament d'una línia de carcinoma de pròstata androgen-independent resistent a l'erlotinib.

Anàlisi de la vehiculització
de compostos metàl·lics
com a agents antitumorals
i de la família HER-EGF en la
resistència als tractaments
oncològics

3 Materials i mètodes

3.1 Vehiculització de compostos metàl·lics com a nova estratègia antitumoral

3.1.1 Vehiculització de compostos metàl·lics de Pt(II), Ru(II) i Os(II) a través de la unió a anàlegs de l'octreotide

En el primer apartat d'aquesta tesi es va treballar conjuntament amb els departaments de Química Orgànica (Dr Vicente Marchán i Dra Flavia Barragán) i de Química Inorgànica (Dra Virtudes Moreno) de la Facultat de Química de la Universitat de Barcelona. Ells van sintetitzar i caracteritzar els pèptids, els conjugats metall-pèptid i els complexos metàl·lics control que posteriorment van ser avaluats biològicament.

3.1.1.1. Síntesi química dels compostos metàl·lics, els pèptids i els conjugats

En aquest projecte es van sintetitzar quatre complexos metàl·lics (un complex de Pt(II) (**Cx1**), dos complexos de Ru(II) (**Cx2** i **Cx3**) i un complex d'Os(II) (**Cx4**)) (figura 3.1), tres pèptids (l'octreotide (**P1**) i dos anàlegs dicarba de l'octreotide (**P2** i **P3**)) i set conjugats complex metàl·lic-pèptid (**Cj1**, **Cj2**, **Cj3**, **Cj4**, **Cj5**, **Cj6** i **Cj7**) (figura 3.2). També es van sintetitzar els pèptids **P1** i **P3** derivatitzats amb fluoresceïna (**P1-F** i **P3-F**, respectivament) (figura 3.3). En general, tots els reactius, resines i aminoàcids utilitzats eren d'origen comercial (Aldrich, Fluka, Novabiochem, Bachem i IrisBiotech).

A continuació es descriu breument la síntesi dels diferents compostos.

a) Síntesi química dels complexos metàl·lics de Pt(II), Ru(II) i Os(II)

Els complexos metàl·lics de platí *cis*-dicloro-(1-(àcid carboxílic etil éster)-1,2-diaminoetà)platí (II) ([PtCl₂(Etdap)]), complex **Cx1** es va sintetitzar seguint un protocol prèviament descrit per Moradell et al ⁽²⁴⁰⁾.

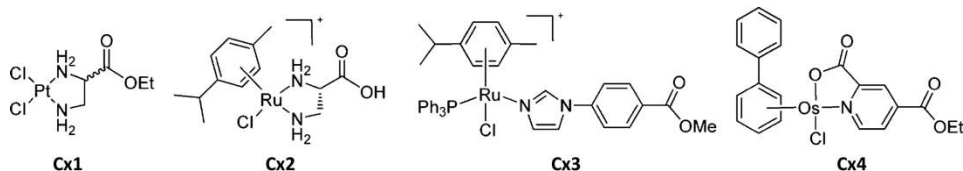


Figura 3.1. Estructura química dels complexos metàl·lics sintetitzats.

El complex de ruteni $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{RuCl}(\text{dap})][\text{PF}_6]$ (complex **Cx2**) es va obtenir per reacció del dihidroclorur de (*L*)-2,3-diaminopropanoat de metil, amb el complex $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$, en presència de NEt₃ i NH₄PF₆.

Per sintetitzar el complex $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{RuCl}(\text{Im-BzCOOMe})(\text{PPh}_3)][\text{PF}_6]$ (complex **Cx3**) en primer lloc es va sintetitzar el complex intermedi $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{RuCl}_2(\text{Im-BzCOOMe})]$ per reacció entre $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$ i l'èster de metil de l'àcid 4-(1*H*-imidazol-1-il)benzoic. A partir de $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{RuCl}_2(\text{Im-BzCOOMe})]$, per reacció amb PPh₃ i hexafluorofosfat d'amoni, es va obtenir el complex **Cx3** ⁽²⁴¹⁾.

Finalment, el complex d'osmi $[(\eta^6\text{-}bip)\text{Os}(4\text{-CO}_2\text{Et-Pico})\text{Cl}]^+$ (complex **Cx4**) es va sintetitzar tal i com es troba descrit en el treball de Van Rijt et al ⁽²⁴²⁾.

b) Síntesi química dels peptíds anàlegs dicarba de l'octreotide

L'octreotide (**P1**) utilitzat en aquests experiments es va obtenir de Bachem (Bubendorf, Switzerland).

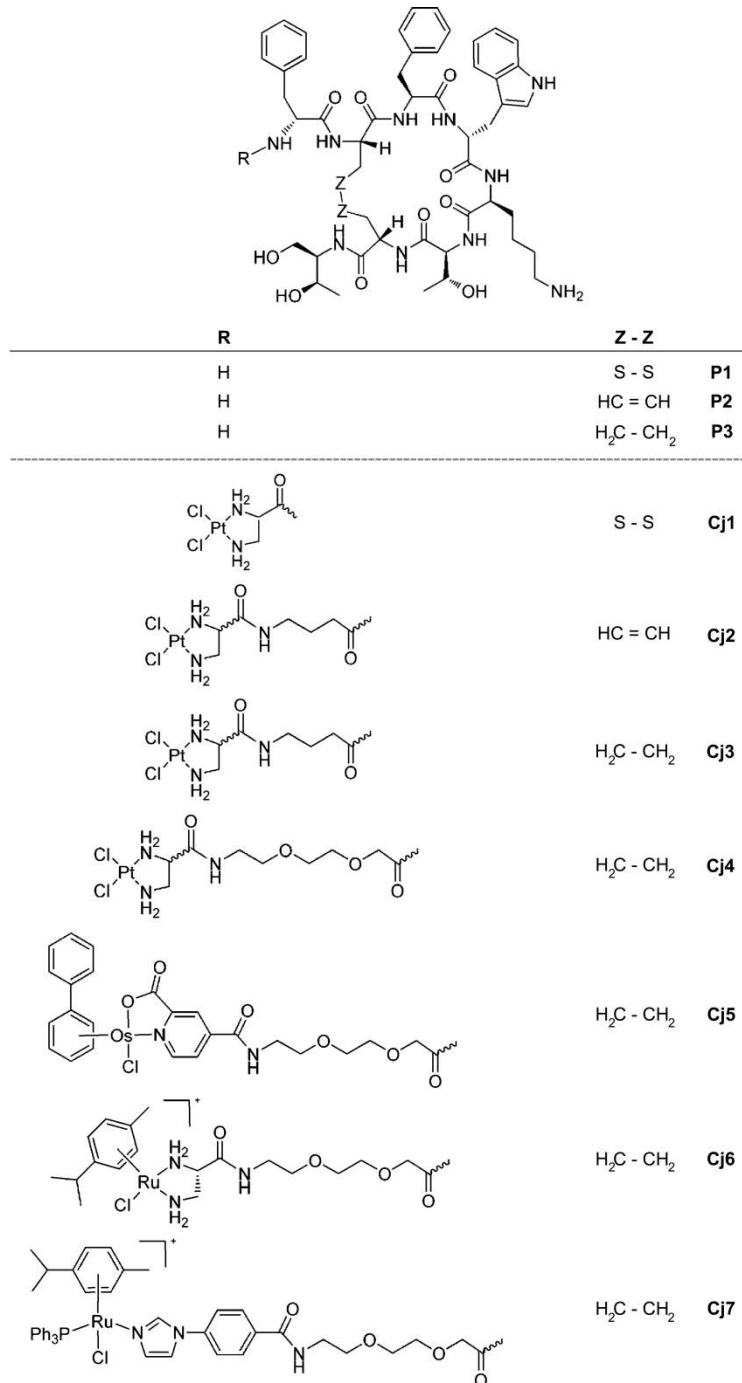


Figura 3.2. Estructura química de l'octreotide, els pèptids anàlegs de l'octreotide i els conjugats metall-pèptid sintetitzats.

La síntesi química de l'anàleg dicarba insaturat de l'octreotide, *cis-H₂N-D-Phe-c(dhDsaN-Phe-D-Trp-Lys-Thr-dhDsaC)-Thr-ol (P2)*, es va dur a terme seguint una estratègia Fmoc/^tBu en fase sòlida, tal i com es descriu en els articles de D'Addona et al.⁽²⁴³⁾ i de Barragán et al.⁽²⁴⁴⁾. Com a suport sòlid es va utilitzar la resina comercial Fmoc-Rink Amida *p*-MBHA de NovaBiochem (Darmstadt, Germany).

L'anàleg dicarba saturat de l'octreotide, *H₂N-D-Phe-cs(dhDsaN-Phe-D-Trp-Lys-Thr-DsaN)-Thr-ol (P3)*, es va obtenir per hidrogenació del doble enllaç del pèptid **P2** utilitzant el catalitzador de Wilkinson⁽²⁴⁴⁾.

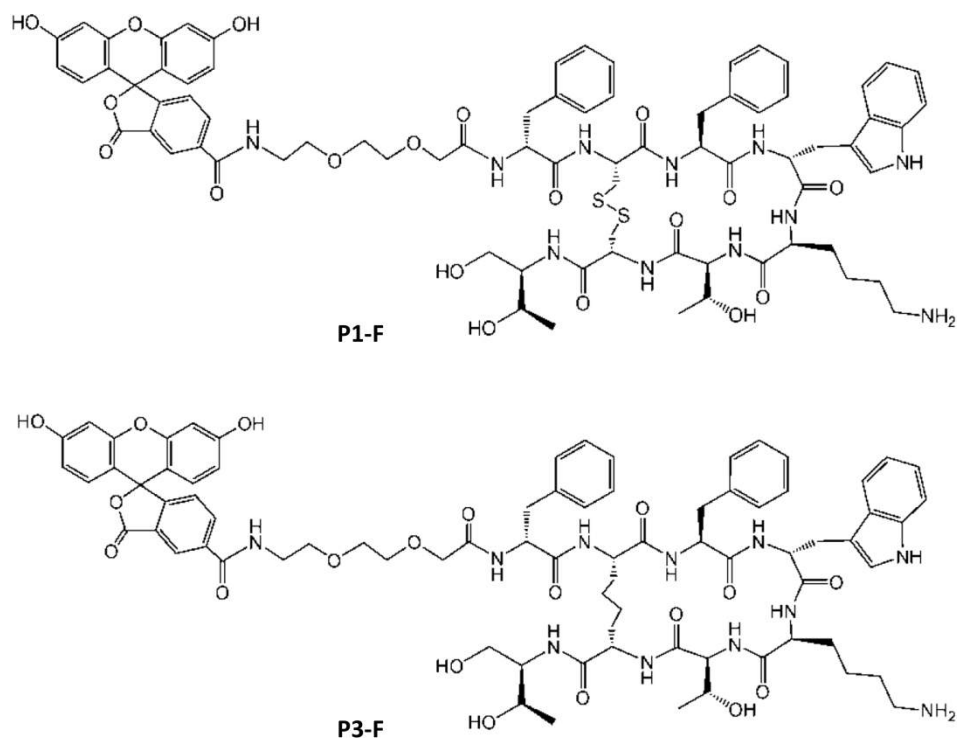


Figura 3.3. Estructura química de l'octreotide fluoresceïnat P1-F i de l'anàleg dicarba fluoresceïnat P3-F.

La síntesi química de l'octreotide fluoresceïnat **P1-F** i de l'anàleg dicarba fluoresceïnat **P3-F** (figura 3.2) es va dur a terme seguint procediments similars. En tots dos casos, els pèptids es van derivatitzar mitjançant l'acoblament de 5(6)-carboxifluoresceïna amb *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIPC) i 1-hidroxi-7-aza-benzotriazole (HOAt) en *N,N*-dimetilformamida (DMF) anhidra ⁽²⁴¹⁾.

c) Síntesi química dels conjugats constituïts pels complexos metàl·lics de Pt(II), Ru(II) i Os(II) i l'octreotide o els anàlegs dicarba de l'octreotide

En total es van sintetitzar 7 conjugats constituïts per un complex metàl·lic, una molècula espaciadora (L) i un pèptid (complex metàl·lic – L – pèptid). Per a la síntesi dels diferents conjugats, va ser necessari preparar els complexos metàl·lics **Cx5**, **Cx6**, **Cx7** i **Cx8** (figura 3.4, A), i els corresponents pèptids **P2** i **P3** ancorats a resina i convenientment protegits. Pel que fa als espaciadors, es van emprar l'àcid δ -aminobutíric (**L1**) i el polietilenglicol (**L2**) (figura 3.4, B).

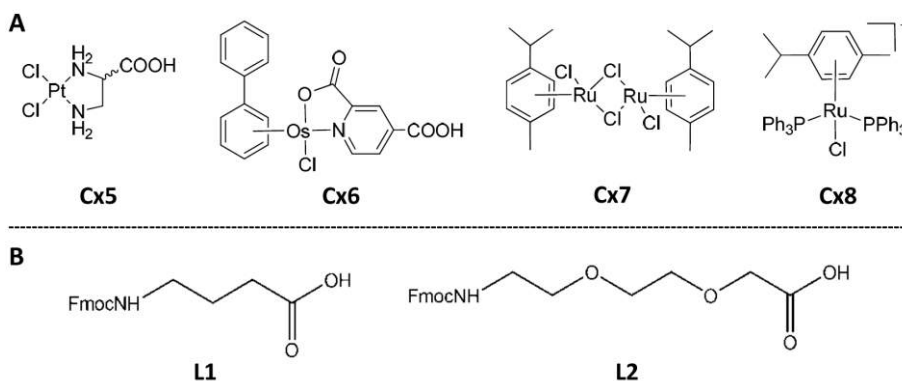


Figura 3.4. Estructura química dels complexos metàl·lics (A) i de les molècules espaciadores (B) utilitzats en la síntesi dels conjugats metall-pèptid.

El primer conjugat, el $[PtCl_2Dap]$ -[octreotide] (**Cj1**), es va obtenir per reacció de l'acetat d'octreotide **P1** amb el complex de Pt(II) **Cx5** en DMF, utilitzant com a reactius d'acoblament *N*-hidroxisuccinimida i carbodiimida soluble ECD ⁽²⁴⁴⁾. La purificació es va dur a terme per HPLC en fase reversa en columnes Nucleosil C8 (250x4 mm, 10 µm) (Sigma, St. Louis, MO, USA), utilitzant els dissolvents A: H₂O/0.045% TFA i B: ACN/0.036% TFA en un gradient de 30→80% B en 30 min. El producte es va caracteritzar per espectrometria de masses MALDI-TOF i electrospray.

Els conjugats $[PtCl_2Dap]$ – L1 – *D-Phe-c(dhDsaN-Phe-D-Trp-Lys-Thr-dhDsaC)-Thr-ol* (**Cj2**) i $[PtCl_2Dap]$ – L1 – *D-Phe-cs(DsaN-Phe-D-Trp-Lys-Thr-DsaC)-Thr-ol* (**Cj3**), es van obtenir en fase sòlida per reacció dels pèptids **P2** i **P3** (prèviament derivatitzats amb l'espaiador **L1**), respectivament, i el complex de Pt(II) **Cx5**, seguint una estratègia lineal en fase sòlida ⁽²⁴⁴⁾. La purificació es va dur a terme per HPLC en fase reversa en columnes GraceSmart RP C18 (250x4 mm, 5 µm) (Sigma) i utilitzant els dissolvents A: H₂O/0.045% TFA i B: ACN/0.036% TFA en un gradient de 20→60% B en 30 min. La caracterització es va fer per espectrometria de masses.

Els conjugats $[PtCl_2Dap]$ – L2 – *D-Phe-cs(DsaN-Phe-D-Trp-Lys-Thr-DsaC)-Thr-ol* (**Cj4**) i $[(\eta^6\text{-bifenil})OsCl(\text{pico})]$ – L2 – *D-Phe-cs(DsaN-Phe-D-Trp-Lys-Thr-DsaC)-Thr-ol* (**Cj5**) ⁽²⁴²⁾ es van obtenir en fase sòlida per reacció del peptid **P3** (prèviament derivatitzat amb l'espaiador **L2**) amb els complexos de Pt(II) **Cx5** i d'Os(II) **Cx6**, respectivament, seguint una estratègia lineal en fase sòlida ⁽²⁴¹⁾. A continuació, la purificació es va realitzar per HPLC en fase reversa utilitzant columnes GraceSmart RP C18 (250x4 mm, 5 µm) i els dissolvents A: H₂O/0.045% TFA i B: ACN/0.036% TFA en un gradient de 20→60% B en 30 min. La caracterització es va dur a terme per espectrometria de masses.

Els conjugats $[(\eta^6\text{-}p\text{-Cym})\text{RuClDap}] - \text{L2} - \text{D-Phe-cs}(\text{DsaN-Phe-D-Trp-Lys-Thr-DsaC})\text{-Thr-ol}$ (**Cj6**) i $[(\eta^6\text{-}p\text{-Cym})\text{RuCl}(\text{PPh3})(\text{ImB})] - \text{L2} - \text{D-Phe-cs}(\text{DsaN-Phe-D-Trp-Lys-Thr-DsaC})\text{-Thr-ol}$ (**Cj7**) es van sintetitzar en fase sòlida per reacció del pèptid **P3** (prèviament derivatitzat amb l'espaiador **L2** i el lligand corresponent, Dap o imidazol) amb els complexos de Ru(II) **Cx7**⁽²⁴⁵⁾ i **Cx8**⁽²⁴⁶⁾, respectivament, seguint la metodologia descrita per Barragán et al.⁽²⁴¹⁾. Tot seguit, la purificació per HPLC en fase reversa es va dur a terme en columnes GraceSmart RP C18 (250x4 mm, 5 μm) i utilitzant els dissolvents A: H₂O/0.045% TFA i B: ACN/0.036% TFA en un gradient de 20→60% B en 30 min, pel **Cj6**, i de 30→100% B en 30 min, pel **Cj7**.

3.1.1.2. Estudis d'estabilitat, hidròlisi i interacció amb el DNA dels conjugats metàl·lics d'anàlegs de l'octreotide

A continuació es fa una breu descripció dels estudis d'estabilitat, hidròlisi i interacció amb el DNA que es van realitzar amb els conjugats sintetitzats, ja que són especialment útils per a discutir la seva activitat biològica. Aquests estudis es van dur a terme en el Departament de Química Orgànica de la Universitat de Barcelona.

a) Assajos d'estabilitat en medi aquós del conjugat **Cj1**

L'estabilitat del conjugat **Cj1** en medi aquós es va iniciar dissolent una alíquota de compost en aigua àcida (0.045% TFA). A continuació, i després de separar la solució sobrenedant del precipitat mitjançant centrifugació, el producte majoritari es va aïllar per HPLC en fase reversa i es va liofilitzar. El producte

liofilitzat es va redissoldre en 125 µL d'aigua àcida i, després de deixar-lo incubar durant 30 minuts o 24 hores, es va analitzar per HPLC en fase reversa en una columna Nucleosil C8 (250 x 4 mm, 10 µm), utilitzant gradients lineals de dissolucions H₂O/0.045% TFA (dissolvent A) i ACN/0.036% TFA (dissolvent B). Finalment, la caracterització dels productes formats es va realitzar per EM-MALDI-TOF i EM-ESI.

b) Assajos d'estabilitat en medi aquós del conjugat Cj2

El seguiment de l'estabilitat en medi aquós del conjugat **Cj2** es va dur a terme incubant una alíquota del compost en dissolució aquosa durant 24 hores i en dissolució 150 mM NaCl durant 4 dies. Posteriorment, el producte obtingut es va analitzar per HPLC en fase reversa en una columna GraceSmart RP C18 (250x4 mm, 5 µm), utilitzant gradients lineals de dissolucions H₂O/0.045% TFA (dissolvent A) i ACN/0.036% TFA (dissolvent B). A continuació, els conjugats es van caracteritzar per EM-MALDI-TOF o EM-ESI.

c) Estudi de l'activació dels conjugats Cj4 - Cj7

Per estudiar l'activació dels conjugats **Cj4 - Cj7** mitjançant la hidròlisi de l'enllaç metall-clorur (M-Cl) es va treballar a una concentració 100 µM pel conjugat **Cj4** i 10 µM pels conjugats **Cj5 - Cj7**. Pel què fa al conjugat **Cj6**, aquest experiment i el següent es van dur a terme amb el conjugat unit al pèptid **P2** (anomenat conjugat **Cj6a**), ja que quan es van realitzar no es disposava del conjugat **Cj6**. Per tal de dur a terme l'experiment, es van preparar tres dissolucions aquoses amb cadascun d'aquests compostos a una concentració de 4, 22.7 i 100 mM de

NaCl. Les mostres es van incubar a 37°C durant 24h i es van analitzar per HPLC en fase reversa en les següents condicions:

- Hidròlisi de **Cj4**, **Cj5** i **Cj7**: Es va utilitzar una columna Kromasil C18 (250 x 4.6 mm, 10 µm, cabal: 1 mL/min) i gradients lineals de dissolucions H₂O/0.045% TFA (dissolvent A) i ACN/0.036% TFA (dissolvent B).
- Hidròlisi de **Cj6a**: Es va utilitzar una columna GraceSmart RP C18 (150 x 2.1 mm, 5 µm, cabal: 1 mL/min) i gradients lineals de dissolucions H₂O/0.1% àcid fòrmic (dissolvent A') i ACN/0.1% àcid fòrmic (dissolvent B').

Els diferents productes aïllats per HPLC van ser caracteritzats per EM-MALDI-TOF o EM-ESI.

d) Estudis d'interacció dels conjugats Cj2, Cj4, Cj5, Cj6a i Cj7 amb el DNA

La interacció dels compostos amb la seqüència oligonucleotídica 5' dCATGGCT es va dur a terme a 37°C i en una solució aquosa 4 mM de NaCl. Inicialment, es van col·locar en un eppendorf 0.032 µmol dels conjugats **Cj2**, **Cj4**, **Cj5**, **Cj6a** o **Cj7** liofilitzats o en dissolució aquosa. A continuació, es va afegir la quantitat necessària de l'oligonucleòtid dissolt en medi aquós que permetés arribar a la concentració final de 100 µM. Finalment, el volum es va completar amb una solució aquosa de NaCl a la concentració adequada per tal de tenir una concentració final 4 mM de NaCl. L'evolució de l'estabilitat del producte i de les reaccions d'unió al DNA es van monitoritzar per HPLC en fase reversa en columnes Kromasil C₁₈ (250 x 4.6 mm, 10 mm, cabal: 1 mL/min) utilitzant gradients lineals de dissolucions aquoses d'acetat de trietilamoni (TEAA) (0.05 M) (dissolvent A) i ACN (dissolvent B) o ACN/H₂O 1:1 (dissolvent B'). Els

adductes metàl·lics es van aïllar després de realitzar diverses anàlisi per HPLC utilitzant les condicions analítiques de separació. La caracterització dels productes per HR MALDI-TOF MS es va dur a terme en el mode negatiu utilitzant com a matriu la 2,4,6-trihidroxiacetofenona i, com a additiu, citrat d'amoni. Les digestions enzimàtiques amb les exonucleases 5' i 3' (fosfodiesterases provinents de melsa de boví i de verí de serp, respectivament) es van realitzar seguint procediments descrits prèviament ⁽²⁴⁷⁻²⁴⁹⁾.

3.1.1.3 Avaluació de la citotoxicitat i l'especificitat dels conjugats metàl·lics d'anàlegs de l'octreotide

a) Línies cel·lulars i condicions de cultiu

La línia cel·lular de càncer de mama humà MCF-7 i la línia cel·lular de carcinoma de pròstata humà andrògen-independent DU-145 es van obtenir de l'ATCC. Les cèl·lules procedents d'ovari de hàmtor xinès (CHO, *chinese hamster ovary*) es van seleccionar com a línia cel·lular no tumoral. Les cèl·lules es van fer créixer en Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM)_GlutaMAX-I suplementat amb 10% de sèrum fetal boví, 100 U/ml de Penicil·lina G i 100 µg/ml d'estreptomicina (tots ells de Gibco, Paisley, UK). Les cèl·lules es van mantenir en un incubador a una temperatura de 37°C i amb una atmosfera humidificada amb el 5% de CO₂, mantenint-les lliures de micoplasma i propagant-les en cultiu adherent a través de diferents protocols ja establerts.

b) Quantificació del receptor SSTR2 per citometria de flux

Les cèl·lules MCF-7, DU-145 i CHO es van obtenir per tripsinització i, a continuació, $5 \cdot 10^5$ cèl·lules es van fixar amb PBS-1.5% formaldehid durant 30 minuts a 4°C i es van permeabilitzar amb PBS-0.2% Tween 20 (Biorad, Hercules, CA, USA) durant 15 minuts a 37°C. Tot seguit, les cèl·lules es van incubar durant 30 minuts a 4°C amb un anticòs monoclonal d'origen murí dirigit contra el receptor SSTR2 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) a una dilució 1/20. Després de rentar amb PBS, les cèl·lules es van incubar durant 30 minuts a 4°C amb un anticòs dirigit contra les IgG murines conjugat a Alexa-Fluor 488 (Invitrogen Life Technologies) a una dilució 1/200. Després de realitzar un últim rentat, es va procedir a analitzar la fluorescència de les cèl·lules mitjançant un citòmetre de flux FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) equipat amb el programa CellQuest™ (Becton Dickinson). La intensitat de fluorescència es va representar en una escala logarítmica de quatre ordres de magnitud (1 – 10000). Els experiments es van dur a terme per triplicat i es van analitzar 10.000 cèl·lules en cadascun dels experiments realitzats.

c) Internalització del pèptid P3-F per microscòpia confocal

Per tal d'avaluar la internalització del pèptid **P3-F** per microscòpia confocal, es van sembrar 50000 cèl·lules MCF-7 sobre uns cubreobjectes que prèviament s'havien tractat amb fibronectina (5 µg/mL, durant 1 hora), en plaques de 24 pous. 24 hores després, les cèl·lules es van incubar durant 1, 3 i 6 hores amb 50 µM del pèptid **P3-F** a 37°C. Un cop passats els temps indicats, les cèl·lules es van rentar amb PBS fred i es van fixar en PBS-4% paraformaldehid durant 15

minuts a 4°C. A continuació, el nucli cel·lular es va marcar amb Hoescht 33258 (excitació/emissió: 352 nm/461 nm) a una concentració de 5 µg/mL durant 15 minuts. Després, les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS fred i es va procedir a fer el muntatge dels cobreobjectes utilitzant el medi de muntatge fluorescent DAKO (Carpinteria, CA, USA). Les cèl·lules es van examinar utilitzant el microscopi confocal espectral multifotó d'elevada velocitat Leica TCS-SF2 (Leica Microsystems, Nussloch, Germany).

d) Quantificació de la internalització dels pèptids P1-F i P3-F per citometria de flux

En aquest experiment es van sembrar 75000 cèl·lules MCF-7 en plaques de 12 pous. 24 hores després, les cèl·lules es van incubar durant 1, 3 i 6 hores amb 50 µM del pèptid **P1-F** o 50 µM del pèptid **P3-F** a 37°C. Un cop passat el temps indicat, les cèl·lules es van tripsinitzar i es van rentar tres vegades amb PBS a 4°C. A continuació, es va procedir a analitzar la fluorescència de les cèl·lules mitjançant un citòmetre de flux FACSCalibur (Becton Dickinson) equipat amb el programa CellQuest™ (Becton Dickinson). La intensitat de fluorescència es va representar en una escala logarítmica de quatre ordres de magnitud (1 – 10000). Els experiments es van dur a terme per triplicat i es van analitzar 10.000 cèl·lules en cadascun dels experiments realitzats.

e) Assaigs de citotoxicitat

Per tal d'analitzar l'efecte citotòxic dels compostos sobre les cèl·lules MCF-7, DU-145 i CHO es van sembrar 3500, 4000 o 2000 cèl·lules per pou, respectivament, en una placa de 96 pous. 24 hores després, les cèl·lules MCF-7 es van tractar amb diferents concentracions del pèptid **P2** (25 – 250 µM), el

pèptid **P3** (25 – 250 μM), el conjugat **Cj2** (25 – 250 μM), el conjugat **Cj4** (25 – 250 μM), el conjugat **Cj5** (25 – 250 μM), el conjugat **Cj6** (25 – 250 μM), el conjugat **Cj7** (25 – 100 μM), el complex **Cx1** (25 – 250 μM), el complex **Cx2** (25 – 250 μM), el complex **Cx3** (2 – 15 μM), el cisplatí (1 – 10 μM) i amb el vehicle sol (aigua + 10%-DMSO) com a control. Les cèl·lules DU-145 i CHO es van tractar amb el conjugat **Cj7** (25 – 100 μM), el complex **Cx3** (2 – 15 μM) i amb vehicle sol (aigua + 10%-DMSO) com a control. Tres dies després, les cèl·lules es van rentar amb PBS i l'efecte dels compostos es va analitzar mitjançant un assaig que determina la reducció del *3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenil-tetrazolium bromide* (MTT) (Sigma, St. Louis, MO, USA) a formazan⁽²⁵⁰⁾. Els resultats es van obtenir fent la lectura de la placa a 570 nm en un lector de plaques Multiscan Plate Reader (ELX800, Biotek, Winooski, USA). La viabilitat de les cèl·lules es va expressar com el percentatge de cèl·lules viables en les mostres tractades respecte les cèl·lules viables en les mostres control, fent el quocient entre l'absorbància obtinguda per cadascun dels tractaments i l'obtinguda pels controls. A partir de la viabilitat i la concentració del fàrmac, es va construir la corba de citotoxicitat. La interpolació dels valors del 50% de supervivència a les corbes va permetre determinar la concentració que inhibeix en un 50% la supervivència cel·lular (IC_{50} , *inhibitory concentration 50*) dels fàrmacs estudiats. Els resultats de cada experiment són la mitjana de tres determinacions i tots els experiments es van dur a terme per triplicat.

f) Estudis d'interacció del complex metàl·lic Cx3 amb el DNA plasmídic

En aquest experiment es va utilitzar el plàsmid de DNA pBR322 a una concentració 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($8,84 \cdot 10^{-8}$ M). Les solucions mare de cisplatí i de complex **Cx3** es van preparar amb aigua miliQ-5% DMSO abans de ser

utilitzades. Les mostres de reacció es van preparar en un volum final de 20 μl de tampó TE (Tris- H_4EDTA : 50 mM NaCl, 10 mM Tris- HCl, 0.1 mM H_4EDTA , pH 7.4) utilitzant les solucions mare de cisplatí i del complex **Cx3** i 2,8 μl del plàsmid pBR322. Les mostres es van preparar amb una ràtio molar (ri) de 0.5 entre el complex i els nucleòtids. Les mesclades de reacció es van incubar a 37°C. 48 hores després, es van afegir 4 μl de tampó de càrrega a una alíquota dels 20 μl de l'adducte complex/DNA. A continuació, les mostres es van fer córrer en un gel d'agarosa (1% en tampó TBE, Tris-Borat-EDTA) durant 3 hores a 25 volts. Passat el temps d'electroforesi, el gel es va marcar durant 45 minuts amb una solució de bromur d'etidi (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en TBE) que va permetre visualitzar els productes per rajos UV i obtenir-ne una fotografia. En l'experiment també es va utilitzar una mostra control que només contenia DNA plasmídic.

g) Assaig de l'acumulació de ruteni en les cèl·lules MCF-7

Per avaluar l'acumulació de ruteni del conjugat **Cj7** i del complex **Cx3** a les cèl·lules MCF-7, es van sembrar $1.5 \cdot 10^6$ cèl·lules en plaques de Petri de 100 mm de diàmetre. 48 hores després, les cèl·lules es van tractar a una concentració equivalent a la cinquena part de la IC_{50} del conjugat **Cj7** i del complex **Cx3** (12.5 μM i 0.66 μM , respectivament), o amb medi sol com a control. 24 hores després, les cèl·lules es van rentar tres vegades amb PBS fred, es van tripsinitzar i es van comptar manualment en un hemocitòmetre utilitzant el mètode d'exclusió del blau de tripà. Seguidament, les cèl·lules es van centrifugar, es van dissoldre amb 300 μL d'àcid nítric concentrat al 72% (v/v) i es van transferir a uns vials wheaton v (Sigma-Aldrich) que es van deixar al forn a 100°C durant 18 hores. Passat aquest temps, els vials es van refredar i les mostres es van rentar amb aigua miliQ i es van traspasar a un tub volumètric.

Tot seguit, les mostres es van diluir unes 10 vegades amb aigua miliQ per tal d'obtenir una concentració final d'àcid nítric equivalent al 2.5% (v/v). El contingut de ruteni es va analitzar amb l'aparell d'espectrometria de massa de plasma d'acoblament inductiu (ICP-MS, *inductively coupled plasma mass spectrometry*) Perkin Elmer Elan 6000 del Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Barcelona. El dissolvent utilitzat en cada experiment va ser aigua milli-Q - 1% HNO₃. En tots els experiments es va fer una corba de calibració de ruteni preparada amb la solució estàndard de ruteni (High-Purity Standards, 1000 µg/mL + 5 µg/mL in 2% HCl). Totes les mostres es van analitzar per triplicat. L'isòtop detectat va ser el Ru₁₀₁. El rodi es va afegir a una concentració final de 10 ppb en totes les mostres ja que va ser utilitzat d'estàndard intern.

h) Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic es va dur a terme utilitzant el programa estadístic SPSS per a Windows (versió 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Les variables quantitatives es van expressar com a mitjana i error estàndard (SE). La normalitat de les dades es va comprovar utilitzant el test de Kolmogorov-Smirnov. Les diferències entre les dades que presentaven una distribució normal i variàncies homogènies es va analitzar utilitzant el test paramètric de la t d'Student, mentre que en els altres casos el test aplicat va ser el de Mann-Whitney. En comparar resultats, es va considerar significatiu un valor de $p < 0.05$.

3.1.2 Vehiculització de compostos metàl·lics de Pt(IV) a través de la unió a anàlegs de folat

En aquesta part del treball es va estudiar una estratègia alternativa basada en la vehiculització de complexos de Pt(IV) a través de la seva unió al folat. Amb aquesta finalitat, es va col·laborar amb el Departament de Química Orgànica i amb el Departament de Química Inorgànica de la Facultat de Química de la Universitat de Barcelona, que van realitzar la síntesi química dels complexos metàl·lics de Pt, l'anàleg de folat i el conjugat final que van ser avaluats biològicament.

3.1.2.1. Síntesi química dels compostos metàl·lics, de l'anàleg de l'àcid fòlic i del conjugat metall-folat

En aquest projecte es van sintetitzar un pèptid anàleg de l'àcid fòlic (**F2**), dos complexos metàl·lics de Pt, el picoplatí (**Cx9**) i un complex de platí (IV) anàleg del picoplatí (**Cx10**), i un conjugat complex de Pt(IV) – folat (**Cj8**) (figura 3.5). En general, tots els reactius, resines i aminoàcids que es van utilitzar eren d'origen comercial (Aldrich, Fluka, Novabiochem, Bachem i IrisBiotech).

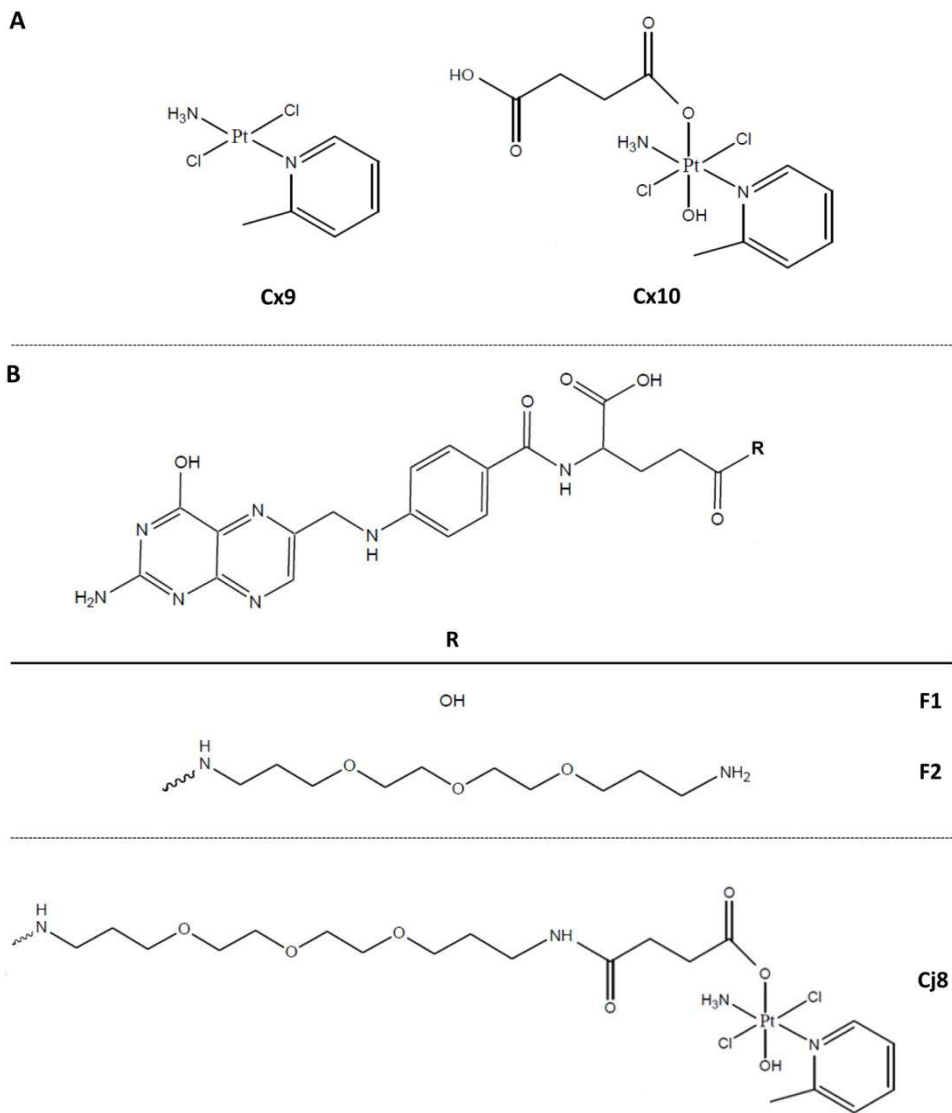


Figura 3.5. Estructura química dels complexos metàl·lics (A) i dels anàlegs de folat i el conjugat metall-folat (B) sintetitzats.

A continuació, s'exposa una breu síntesi dels compostos sintetitzats.

a) Síntesi química dels complexos metàl·lics *cis*-[PtCl₂(2-metilpiridina)(NH₃)] i *cis,cis,trans*-[PtCl₂(2-metilpiridina)(NH₃)(OH)(O₂CCH₂CH₂CO₂H₂)]

Per tal de sintetitzar el picoplatí (*cis*-[PtCl₂(2-metilpiridina)(NH₃)], **Cx9**) primerament es van fer reaccionar el KI, el K[PtCl₃(NH₃)] i la 2-metilpiridina. Així es va obtenir el complex *cis*-[PtI₂(2-metilpiridina)(NH₃)], un precursor del **Cx9** que es va fer reaccionar amb AgNO₃ i HCl per tal d'obtenir el **Cx9**.

El complex *cis,cis,trans*-[PtCl₂(2-metilpiridina)(NH₃)(OH)(O₂CCH₂CH₂CO₂H₂)] (**Cx10**) es va obtenir fent reaccionar el **Cx9** amb una mescla de H₂O/Heptà i H₂O₂. El producte obtingut (*cis,cis,trans*-[PtCl₂(2-metilpiridina)(NH₃)(OH)₂]) es va dissoldre en DMF i es va fer reaccionar amb anhídrid succínic, per tal d'obtenir el complex final.

b) Síntesi química de l'anàleg de l'àcid fòlic

L'anàleg de l'àcid fòlic **F2** es va obtenir a través de la reacció de l'àcid fòlic (**F1**) amb la trietilamina, la N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), la N-hidroxisuccinimida (NHS) i la 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina.

c) Síntesi química del conjugat constituït per un complex metàl·lic de Pt(IV) i un anàleg de l'àcid fòlic

El conjugat **Cj8** es va obtenir a través de la formació d'un enllaç amida entre el complex **Cx10** i el grup amina de l'anàleg de folat **F2** fent reaccionar els dos compostos amb presència de HATU i N,N-Diisopropiletilamina (DIEA).

3.1.2.2. Avaluació de la citotoxicitat dels complexos metàl·lics Cx9 i Cx10, l'anàleg de folat F2 i el conjugat Cj8

a) Línies cel·lulars i condicions de cultiu

La línia cel·lular de càncer de mama humà MDA-MB-231 es va obtenir de l'ATCC. Les cèl·lules es van fer créixer en medi RPMI (Gibco) suplementat amb 10% de sèrum fetal boví, 100 U/ml de Penicil·lina G i 100 µg/ml d'Estreptomicina (Gibco). Les cèl·lules es van mantenir en un incubador a una temperatura de 37°C i amb una atmosfera humidificada amb el 5% de CO₂, mantenint-les lliures de micoplasma i propagant-les en cultiu adherent a través de diferents protocols ja establerts.

b) Assaig de citotoxicitat

Per tal d'analitzar l'efecte citotòxic dels compostos **Cj8**, **F2**, **Cx9** i **Cx10** sobre les cèl·lules MDA-MB-231 es van sembrar 6000 cèl·lules per pou en una placa de 96 pous. 48 hores després, les cèl·lules es van tractar amb diferents concentracions del conjugat **Cj8** (50 – 200 µM), de l'anàleg de folat **F2** (50 – 200 µM), del complex **Cx9** (25 – 100 µM), del complex **Cx10** (50 – 200 µM) i amb vehicle sol (aigua + 10%-DMSO) com a control. Tres dies després, les cèl·lules es van rentar amb PBS i l'efecte dels compostos es va analitzar mitjançant un assaig de MTT tal i com s'especifica en l'apartat 3.1.1.4.e.

3.2 Resistència de les cèl·lules tumorals de càncer de pròstata a les teràpies dirigides a inhibir la família HER-EGF

a) Línies cel·lulars i condicions de cultiu

Les línies cel·lulars de carcinoma de pròstata humà andrògen-independents DU-145 i PC-3 es van obtenir de l'ATCC. Les cèl·lules es van fer créixer en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)_GlutaMAX-1 suplementat amb 10% de sèrum fetal boví, 100 U/ml de Penicil·lina G i 100 µg/ml d'Estreptomicina (tots ells de Gibco). Les cèl·lules es van mantenir en un incubador a una temperatura de 37°C i amb una atmosfera humidificada amb el 5% de CO₂, mantenint-les lliures de micoplasma i propagant-les en cultiu adherent a través de diferents protocols ja establerts.

A partir de la línia cel·lular de carcinoma de pròstata humà DU-145 es va establir una línia cel·lular resistent a l'erlotinib (DUERr) exposant de forma continuada les cèl·lules parentals DU-145 a concentracions creixents d'erlotinib. Inicialment, les cèl·lules es van tractar durant un mes a la IC50 de l'erlotinib (2,5 µM). Posteriorment, la concentració es va anar augmentant mensualment a 5, 10 i 15 µM d'erlotinib mantenint la dosi màxima en el cultiu cel·lular durant 3 mesos més. A partir del sisè més, la línia cel·lular es va considerar resistent i el seu manteniment es va continuar fent en presència de la dosi màxima aconseguida d'erlotinib al medi de cultiu.

b) Assaig de proliferació cel·lular

En aquest experiment, es va analitzar l'efecte de tres inhibidors de la via HER-EGF sobre la proliferació de les cèl·lules DU-145 i PC-3: el **cetuximab** (Erbitux[®], Merck-Serono, Darmstadt, Germany) obtingut gràcies a la donació de l'àrea de farmàcia de l'Institut Català d'Oncologia (ICO, Hospital Dr. Josep Trueta, Girona), l'**erlotinib** (Tarceva[®]) obtingut de Roche (London, UK) i el **gefitinib** (Iressa[®]) obtingut d'Astrazeneca (London, UK). Per realitzar els experiments, es van sembrar 4000 cèl·lules per pou en plaques de 96 pous i, 24 hores després, les cèl·lules es van tractar amb **erlotinib** (2.5 - 15 μ M), **gefitinib** (2.5 - 15 μ M) i **cetuximab** (100 - 500 μ g/mL) o PBS (cèl·lules control). Tres dies després, les cèl·lules es van rentar amb PBS i l'efecte dels compostos sobre la viabilitat cel·lular es va analitzar mitjançant un assaig de MTT tal i com s'especifica en l'apartat 3.1.1.4.e.

Els assaigs de proliferació cel·lular també es van utilitzar per analitzar l'efecte del bloqueig dels receptors HER2, HER3 i de la NRG-1 sobre la proliferació de les cèl·lules DU-145 i DUErR. Els tractaments es van fer amb el **trastuzumab** (Herceptin[®], Roche, Basel, Switzerland), obtingut gràcies a la donació de l'àrea de farmàcia de l'Institut Català d'Oncologia; un anticòs bloquejador del receptor HER3 (H3.105.5), obtingut de Calbiochem (San Diego, CA, USA) i un anticòs contra la NRG-1 (clon C-18), obtingut de R&D Systems. En els experiments es van sembrar les cèl·lules DU-145 i DUErR a una densitat de 4000 cèl·lules per pou en plaques de 96 pous. 24 hores després, les cèl·lules es van tractar amb 15 μ M d'erlotinib, 10 μ g/ml de trastuzumab, 10 μ g/ml de l'anticòs dirigit contra HER3 i 10 μ g/ml de l'anticòs dirigit contra la NRG-1 o diferents combinacions d'aquests compostos (15 μ M d'erlotinib + 10 μ g/ml de

trastuzumab, 15 μ M d'erlotinib + 10 μ g/ml de l'anticòs dirigit contra HER3 i 15 μ M d'erlotinib + 10 μ g/ de l'anticòs dirigit contra la NRG-1). Tres dies després, les cèl·lules es van rentar amb PBS i l'efecte dels compostos sobre la viabilitat cel·lular es va analitzar mitjançant un assaig de MTT tal i com s'especifica en l'apartat 3.1.1.4.e.

c) Assaig de creixement cel·lular

Les cèl·lules DU-145 i PC-3 es van obtenir dels flascons on estaven adherides per tripsinització i es van sembrar $1.5 \cdot 10^5$ cèl·lules en plaques de 100 mm de diàmetre. Tres dies després, les cèl·lules es van incubar amb el medi de cultiu DMEM-10% FBS juntament amb **erlotinib** (15 μ M), **gefitinib** (15 μ M), **cetuximab** (500 μ g/mL) o PBS (cèl·lules control) o amb medi DMEM-0.1% FBS durant 24, 48 i 72h. Just abans del tractament (temps 0 hores) i 24, 48 i 72h després d'haver iniciat els respectius tractaments, les cèl·lules es van tripsinitzar i es va comptar manualment el nombre de cèl·lules viables en un hemocitòmetre utilitzant el mètode d'exclusió de trypan blue. Els resultats de cada experiment són la mitjana de tres determinacions. Tots els experiments es van dur a terme per triplicat.

d) Determinació de l'expressió gènica de PTEN per PCR convencional

L'expressió gènica de PTEN en les línies cel·lulars DU-145 i PC-3 es va examinar mitjançant la tècnica de la PCR semiquantitativa utilitzant l'expressió del gen constitutiu gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) com a control intern. Les cèl·lules es van obtenir dels flascons on estaven adherides per tripsinització. A continuació, es va

procedir a fer l'extracció de l'RNA total de $2 \cdot 10^6$ cèl·lules utilitzant el kit comercial RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguint el protocol de la casa fabricant i incloent la digestió amb DNasa utilitzant el kit RNase-Free DNase Set (Qiagen). El rendiment de l'extracció i la puresa de l'RNA obtingut es van determinar espectroscòpicament utilitzant un Nanodrop (ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA). A partir de 1 µg de l'RNA obtingut, es va sintetitzar el cDNA de cadena senzilla equivalent utilitzant el kit High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). La PCR es va dur a terme utilitzant 4 µL de cDNA, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP, 0.8 µM dels oligonucleòtids "forward" i "reverse" i 1 unitat µL⁻¹ de la DNA polimerasa de Biotools (Biotools B&M Labs, Madrid, Spain) en un volum final de 25 µL. Els encebadors i les condicions de ciclació dels gens PTEN i GAPDH es van obtenir d'uns protocols previs^(251,252). 20 µL dels productes de la ciclació es van fer córrer en un gel d'agarosa a l'1.5%, marcat amb 0.5 µg/mL de bromur d'etidi. Finalment, els productes de la PCR es van visualitzar per rajos UV i se'n va obtenir la fotografia.

e) **Determinació de l'expressió gènica dels receptors i lligands de la família HER-EGF per PCR quantitativa**

Per aquest experiment es van sembrar $1.5 \cdot 10^5$ cèl·lules DU-145 i PC-3 en plaques de 100 mm de diàmetre. Tres dies després, les cèl·lules es van tractar a una concentració similar a la corresponent IC₅₀ de l'**erlotinib** i el **gefitinib** (2.5 µM per ambdós compostos en les cèl·lules DU-145 i 15 µM per ambdós compostos en les cèl·lules PC-3) i a una concentració similar a la corresponent IC₃₀ del **cetuximab** (350 µg/mL) per les cèl·lules DU-145 o a la dosi màxima assajada per aquest compost (500 µg/mL) per les cèl·lules PC-3. 24 hores

després, les cèl·lules es van tripsinitzar i es va procedir a fer l'extracció de l'RNA d'un total de $2 \cdot 10^6$ cèl·lules utilitzant el kit comercial RNeasy® Mini Kit (Qiagen). El rendiment de l'extracció i la puresa de l'RNA obtingut es van determinar espectroscòpicament utilitzant un Nanodrop (ND-1000, Thermo Scientific). A partir de 1 µg de l'RNA obtingut, es va sintetitzar el cDNA de cadena senzilla equivalent utilitzant el kit High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). L'expressió gènica dels lligands i dels receptors de la via HER-EGF (EGFR, HER2, HER3, HER4, EGF, TGF- α , AMF, BTC, EPR, HB-EGF i NRG-1) es va analitzar mitjançant una PCR quantitativa a temps real utilitzant les sondes i encebadors Taqman® (TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems-Applera Hispania SA, Espanya), que són predissenyades i específiques pels gens a analitzar. Totes les PCR es van dur a terme en plaques estàndard de 96 pous utilitzant la mix TaqMan One-Step Universal Master Mix (Applied Biosystems) i el sistema 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems) per tal d'analitzar els resultats. Les condicions de ciclació utilitzades van ser 95°C durant 10 minuts, seguida per 40 cicles a 95°C durant 15 segons i 60°C durant 1 minut. Les dades obtingudes van ser processades i analitzades mitjançant el programa 7300 SDS 1.3.1 (Applied Biosystems), obtenint un valor de Ct (*threshold cycle*) per cada mostra. La quantificació relativa de l'expressió dels receptors, els lligands i el control intern TBP, es va determinar a partir de la interpolació de la Ct en la corba estàndard obtinguda per cadascun dels gens analitzats. Per tal d'estimar la variabilitat dins d'un mateix assaig es van realitzar tres replicats per cada mostra i per cada gen, mentre que la variabilitat entre assaigs es va determinar analitzant totes les mostres per triplicat. Els resultats es van expressar com la mitjana \pm error estàndard de l'expressió relativa dels gens analitzats normalitzada amb la corresponent expressió del TBP.

Per tal d'analitzar els canvis produïts en l'expressió gènica de les cèl·lules resistents DUErR en comparació amb la de les cèl·lules DU-145 control, les dues línies cel·luars es van tripsinitzar i es van obtenir $2 \cdot 10^6$ de cèl·lules. A continuació, es va fer l'extracció de l'RNA, la síntesi el cDNA corresponent i l'anàlisi de l'expressió gènica dels receptors i lligands de la via HER-EGF per cadascuna de les línies, tal i com s'ha explicat en el paràgraf anterior, permetent obtenir un valor de Ct per cada mostra. La quantificació relativa de l'expressió dels receptors, els lligands i el control intern TBP, es va determinar a partir de la interpolació de la Ct en la corba estàndard obtinguda per cadascun dels gens analitzats. Per tal d'estimar la variabilitat dins d'un mateix assaig es van realitzar tres replicats per cada mostra i per cada gen, mentre que la variabilitat entre assaigs es va determinar analitzant totes les mostres per triplicat. L'expressió relativa dels gens analitzats es va normalitzar amb el corresponent valor de mRNA obtingut pel gen constitutiu TBP. A continuació, els resultats es van expressar com la mitjana \pm error estàndard dels resultats obtinguts per les cèl·lules DUErR en comparació amb els resultats obtinguts per les cèl·lules DU-145 control.

f) Quantificació dels receptors HER per citometria de flux

Les cèl·lules DU-145 i PC-3 es van obtenir per tripsinització dels flascons on estaven adherides. A continuació, $5 \cdot 10^5$ cèl·lules es van rentar amb PBS i es van incubar durant 30 minuts a 4°C amb els anticossos monoclonals d'origen murí dirigits contra les proteïnes humanes EGFR, HER2, HER3 i HER4 (Calbiochem) a una concentració final de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Passat el temps indicat, les cèl·lules es van rentar amb PBS i es van incubar durant 30 minuts a 4°C amb un anticòs de cabra dirigit contra les IgG murines conjugat a Alexa-Fluor 488 (Invitrogen Life

Technologies, Frederick, MD) a una dilució 1/200. Després de realitzar un últim rentat, es va analitzar la fluorescència de les cèl·lules mitjançant un citòmetre de flux FACSCalibur (Becton Dickinson) equipat amb el programa CellQuest™ (Becton Dickinson). La intensitat de fluorescència es va representar en una escala logarítmica de quatre ordres de magnitud (1 – 10000). Els experiments es van dur a terme per triplicat i es van analitzar 10.000 cèl·lules en cadascun dels experiments realitzats.

g) Determinació de l'expressió proteica per Western Blot

Les cèl·lules DU-145 (control o tractades amb 2,5 μ M d'erlotinib durant 48 hores) i DUErR (contínuament exposades a 15 μ M d'erlotinib) es van obtenir a través de la seva tripsinització. A continuació, $2 \cdot 10^6$ de cèl·lules es van lliurar en un tampó de lisis que contenia 1 mM de EDTA, 150 mM de NaCl, 100 μ g/mL de PMSF, 50 mM de Tris-HCl (pH 7.5) i una mescla d'inhibidors de proteases i fosfatases (Sigma-Aldrich). La concentració de proteïna en els llisats obtinguts es va determinar mitjançant la tècnica de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A continuació les mostres de proteïna es van separar mitjançant un gel de SDS-poliacrilamida al 5-8% (per l'anàlisi de l'EGFR total i fosforilat, el HER2 total i fosforilat, el HER3 total i fosforilat, el HER4 total, l'ERK1/2 total i fosforilat, l'Akt total i fosforilat i l'actina) i al 5-12% (per l'anàlisi de la NRG-1) i es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa (Millipore, Bedford, MA, USA) prèviament activada amb metanol. Tot seguit, les membranes es van incubar durant 1h a temperatura ambient en una solució de bloqueig (preparada amb 2.5% de llet en pols en el tampó TBS-T (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl i 0.1% Tween-20) per tal de prevenir la unió inespecífica de l'anticòs. A continuació, les membranes es van incubar durant

tota la nit a 4°C amb diferents solucions d'anticossos primaris preparades en tampó de bloqueig. Els anticossos primaris utilitzats van ser els següents: anticòs policlonal anti-EGFR total (dilució 1/1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anticòs anti-EGFR fosforilat (Tyr1173) (clon 53A5, dilució 1/1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anticòs policlonal anti-HER2 total (dilució 1/1000; Santa Cruz Biotechnology), anticòs anti-HER2 fosforilat (Tyr1248) (clon PN2A, dilució 1/200; Thermo Fisher, Fremont, CA, USA), anticòs policlonal anti-HER3 total (dilució 1/1000; Santa Cruz Biotechnology), anticòs anti-HER3 fosforilat (Tyr1289) (clon 21D3, dilució 1/200; Cell Signaling Technology), anticòs policlonal anti-HER4 total (dilució 1/500; Santa Cruz Biotechnology), anticòs policlonal anti-ERK1/2 total (dilució 1/500; Cell Signaling Technology), anticòs de ratolí anti-ERK1/2 fosforilat (Thr202/Tyr204) (clon E10, dilució 1/500; Cell Signaling Technology), anticòs policlonal anti-Akt total (dilució 1/500; Cell Signaling Technology), anticòs de conill anti-Akt fosforilat (Ser473) (clon 193H12, dilució 1/200; Cell Signaling Technology) i anticòs anti-NRG1 (clon C-18, dilució 1/250; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Després, les membranes es van incubar durant 45 minuts a temperatura ambient amb un anticòs secundari anti-ratolí conjugat a peroxidasa de rave (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) o un anticòs secundari anti-conill conjugat a peroxidasa de rave (Calbiochem, La Jolla, CA, USA). Finalment, les membranes es van revelar utilitzant el kit comercial de revelat SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate de Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA) i les imatges es van adquirir mitjançant el sistema FluorChem SP (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). Les membranes es van tornar a incubar amb un anticòs dirigit en contra de la β -actina (clon C-2, dilució 1/200; Santa Cruz Biotechnology) per tal de controlar la càrrega de proteïna i la seva transferència.

h) Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic es va dur a terme utilitzant el programa estadístic SPSS per a Windows (versió 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Les variables quantitatives es van expressar com a mitjana i error estàndard (SE). La normalitat de les dades es va comprovar utilitzant el test de Kolmogorov-Smirnov. Les diferències entre les dades que presentaven una distribució normal i variàncies homogènies es va analitzar utilitzant el test paramètric de la t d'Student, mentre que en els altres casos el test aplicat va ser el de Mann-Whitney. En comparar resultats, es va considerar significatiu un valor de $p < 0.05$.

**Anàlisi de la vehiculització
de compostos metàl·lics
com a agents antitumorals
i de la família HER-EGF en la
resistència als tractaments
oncològics**

4 Resultats

4.1 Vehiculització de compostos metàl·lics com a nova estratègia antitumoral

En la primera part d'aquesta tesi es va estudiar si la unió de complexos metàl·lics de Pt(II), Pt(IV), Ru(II) i Os(II) a derivats de l'octreotide i de l'àcid fòlic, permetia obtenir uns compostos biològicament actius i que tinguessin una major selectivitat per les cèl·lules tumorals respecte la resta de cèl·lules de l'organisme.

4.1.1 Vehiculització de compostos metàl·lics de Pt(II), Ru(II) i Os(II) a través de la unió a anàlegs de l'octreotide

Inicialment es va treballar amb conjugats constituïts per complexos metàl·lics de Pt(II), Ru(II) i Os(II) i pel pèptid octreotide o per un anàleg dicarba d'aquest pèptid.

4.1.1.1. Síntesi i caracterització química dels pèptids, els conjugats i els complexos metàl·lics

A continuació, es descriuen breument els resultats obtinguts en la síntesi i caracterització dels conjugats **Cj1**, **Cj2**, **Cj3**, **Cj4**, **Cj5**, **Cj6** i **Cj7**. Els experiments van ser realitzats pel Dr Vicente Marchán i la Dra Flavia Barragán del Departament de Química Orgànica i per la Dra Virtudes Moreno del Departament de Química Inorgànica de la Facultat de Química de la Universitat de Barcelona.

a) Síntesi i caracterització química del conjugat $[PtCl_2Dap]$ -[octreotide] (Cj1)

El primer conjugat que es va sintetitzar, el **Cj1** (figura 4.1), estava constituït per l'octreotide i pel complex metàl·lic $[PtCl_2(dap)]$.

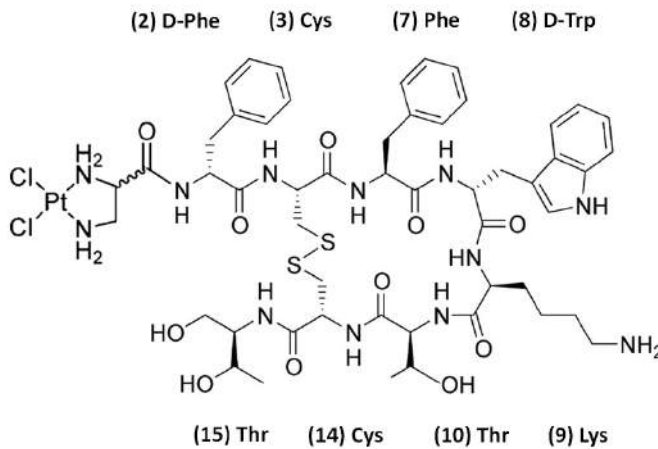


Figura 4.1. Estructura del conjugat Cj1. S'indica l'estereoquímica i els elements estructurals. La numeració indicada fa referència a la de l'hormona nativa ⁽²⁵³⁾.

La síntesi del **Cj1** es va dur a terme mitjançant la formació d'un enllaç amida entre el grup carboxil del complex de platí **Cx5** i l'extrem amino terminal de l'octreotide. Per tal de comprovar quin producte s'havia format, el cru de la reacció del producte obtingut es va purificar per HPLC i es va analitzar per espectrometria de masses MALDI-TOF i electrospray. Els resultats de l'HPLC (figura 4.2) van indicar la formació d'un producte majoritari que corresponia al compost $[PtCl_2Dap]$ -[octreotide]. La seva caracterització posterior (resultats no mostrats) no va permetre verificar si es tractava del producte unit a l'extrem N-terminal del pèptid o a la cadena lateral de la lisina, per la qual cosa, no es va poder confirmar l'obtenció del producte desitjat.

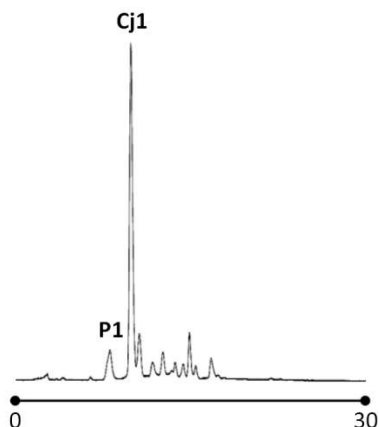


Figura 4.2. Perfil cromatogràfic del cru de reacció entre l'octreotide (P1) i el Cx5 després de 24h.

Seguidament, per tal d'avaluar l'estabilitat en medi aquós del compost $[PtCl_2Dap]-[octreotide]$, el producte es va incubar en una dissolució aquosa durant 30 minuts o 24 hores i el cru de la reacció es va analitzar per HPLC en fase reversa. Els resultats van demostrar que el pic corresponent al compost inicial evolucionava ràpidament i donava lloc a la formació d'una mescla complexa de productes (figura 4.3), la qual cosa indicava que el conjugat **Cj1** és molt inestable en solució aquosa.

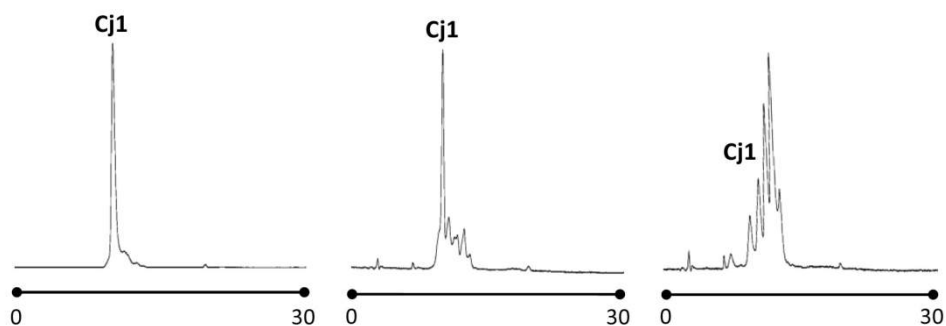


Figura 4.3. Perfils cromatogràfics del Cj1 en medi aquós. Perfils cromatogràfics del conjugat pur en medi aquós a les 0h (esquerra) i després de 30 minuts (centre) i 24h (dreta).

A partir dels resultats obtinguts per aquest conjugat **Cj1** es va descartar seguir utilitzant l'octreotide com a agent transportador de complexos metàl·lics i es va decidir utilitzar dos anàlegs estructurals de l'octreotide: el pèptid **P2** i el pèptid **P3**.

b) Síntesi i caracterització química del conjugat $[PtCl_2Dap] - L1 - P2$ (**Cj2**)

El següent compost sintetitzat, el conjugat **Cj2** (figura 4.4), es va obtenir seguint una estratègia lineal en fase sòlida i es va purificar per HPLC en fase reversa (figura 4.5, A). En aquest cas, les dades de la caracterització per EM-MALDI-TOF (resultats no mostrats) van confirmar l'obtenció del producte desitjat.

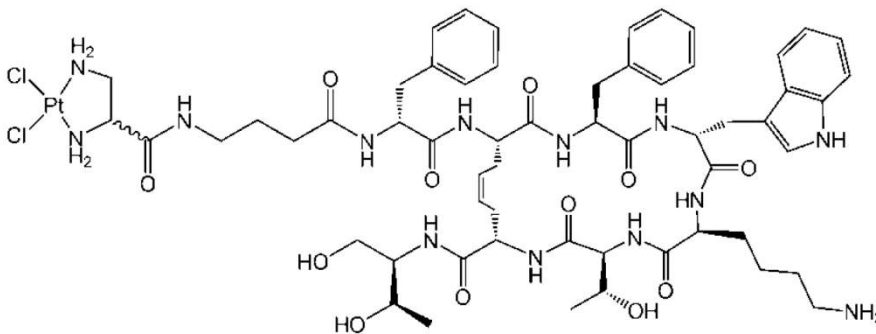


Figura 4.4. Estructura química del conjugat **Cj2**.

Per aquest conjugat es va avaluar la seva solubilitat, l'estabilitat en dissolució aquosa i la capacitat d'unió al DNA. Pel que fa a la solubilitat, es va demostrar qualitativament que el conjugat **Cj2** presentava una baixa solubilitat en aigua, una solubilitat intermitja en aigua lleugerament àcida i una solubilitat moderada en mesclades aquoses lleugerament àcides en presència de dissolvents orgànics com l'ACN o el MeOH.

Els assajos d'estabilitat en dissolució aquosa van indicar que el conjugat **Cj2** és més estable que el **Cj1**, ja que després de deixar-lo 24h en medi aquós, el seu perfil cromatogràfic va mostrar que un 52% del conjugat es mantenia inalterat (figura 4.5, B), mentre que en el cas del **Cj1**, només es mantenia inalterat un 10% del producte (figura 4.3). Tot i això, en aquestes condicions també es van identificar les espècies mono i diaquo del conjugat **Cj2**. Seguidament, es va demostrar que el conjugat **Cj2** era completament estable en una solució aquosa que contenia una concentració 150 mM de NaCl durant 4 dies (figura 4.5, C). En aquestes condicions, a més, no es van observar els pics corresponents a les espècies mono o diaquo que s'havien observat en l'assaig d'estabilitat en aigua.

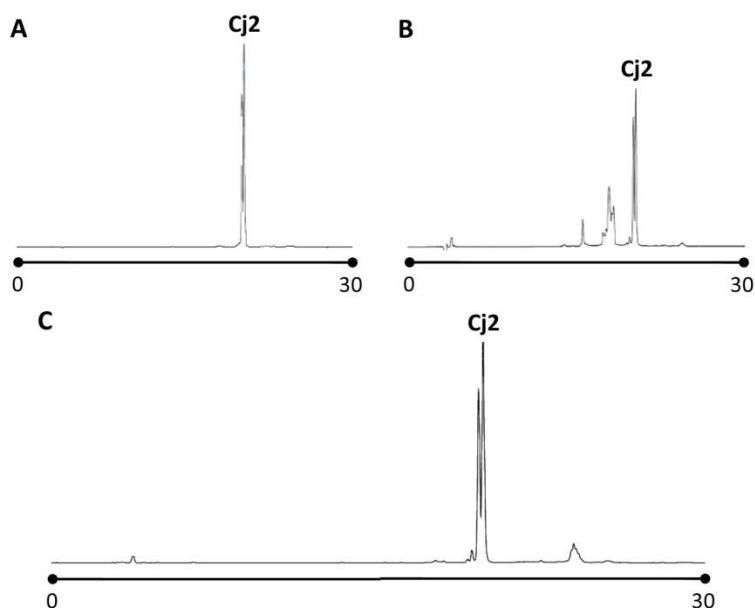


Figura 4.5. Perfils cromatogràfics del Cj2. A. Perfil cromatogràfic del conjugat pur. B. Perfil cromatogràfic del **Cj2** en medi aquós després de 24h. C. Perfil cromatogràfic del **Cj2** en una dissolució 150 mM NaCl, després de 4 dies.

Finalment, es va analitzar si el conjugat **Cj2** conservava la capacitat d'unió al DNA que presenten el cisplatí i els seus derivats. Per aquest estudi es va utilitzar com a model la seqüència oligonucleotídica ^{5'}d(CATGGCT) ja que presenta un parell GG central que permet identificar els adductes bifuncionals 1,2-intracadena pels quals el cisplatí presenta una elevada afinitat. La incubació del conjugat i la seqüència oligonucleotídica es va realitzar en una solució que imitava la concentració de clorur del nucli cel·lular (4 mM de NaCl) per tal d'afavorir la formació de les espècies aquo més reactives en unes condicions molt similars a les fisiològiques. L'anàlisi dels productes de la reacció per HPLC en fase reversa va evidenciar la formació d'uns pics amb un temps de retenció més elevat que el que s'havia observat per l'oligonucleòtid de partida (figura 4.6, A). L'anàlisi per EM-MALDI-TOF dels pics obtinguts (resultats no mostrats) va indicar la presència d'un únic producte amb una massa que corresponia a la calculada per l'adducte format entre l'oligonucleòtid i el **Cj2** considerant la pèrdua dels dos lligands clorur. Aquests resultats van demostrar que el fragment metàl·lic s'havia coordinat de manera bifuncional a la cadena de DNA.

Tot seguit, es va determinar en quin punt de la seqüència oligonucleotídica s'havia unit l'àtom de platí mitjançant la digestió amb dues exonucleases, la fosfodiesterasa de melsa de boví (SpPD) i la fosfodiesterasa de verí de serp (SVPD). Aquestes exonucleases degraden els oligonucleòtids en sentit 5' – 3' i en sentit 3' – 5', respectivament, però no reconeixen un substrat metàl·lic, per la qual cosa, van degradant l'oligonucleòtid fins arribar a la base modificada pel complex metàl·lic que, al no ser reconeguda, provoca una aturada en la degradació. L'anàlisi posterior dels fragments no digerits per EM-MALDI-TOF permet conèixer la posició de l'àtom metàl·lic a la seqüència oligonucleotídica i identificar la formació d'adductes mono- o bi-funcionals. A través d'aquest

experiment es va confirmar que el platí del conjugat **Cj2** formava un quelat bifuncional Pt-5'G/3'G amb les dues guanines consecutives de la cadena de DNA tal i com s'indica en l'esquema de la figura 4.6, B.

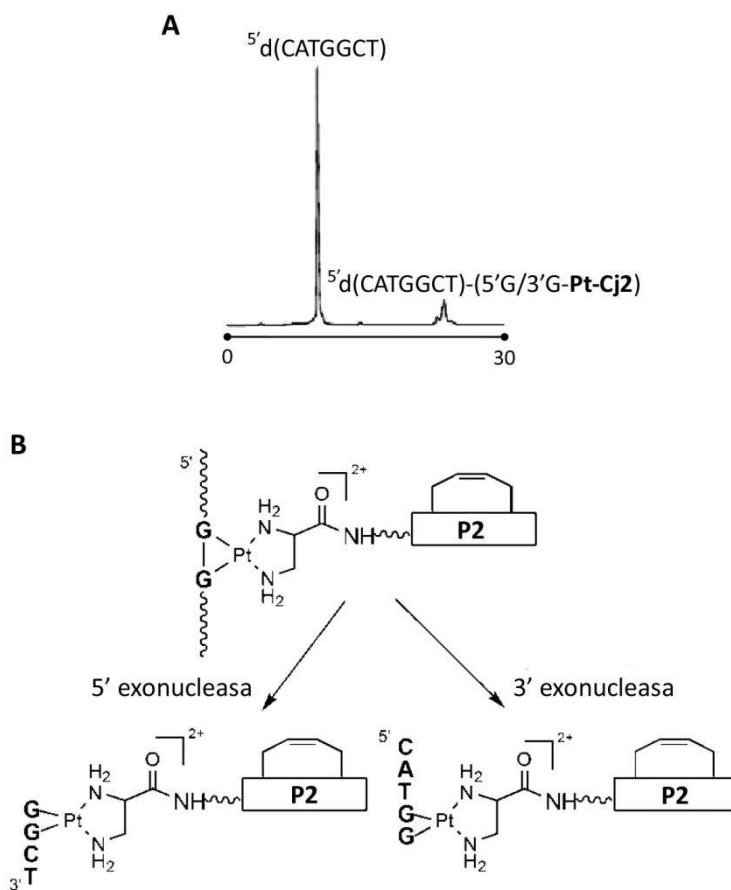


Figura 4.6. Unió al DNA del Cj2. **A.** Perfil cromatogràfic corresponent a la reacció entre la seqüència oligonucleotídica $5'd(\text{CATGGCT})$ i el conjugat **Cj2**. **B.** Esquema on es mostra la complexació entre $5'd(\text{CATGGCT})$ i el **Cj2**, i els productes obtinguts després de la digestió enzimàtica.

c) Síntesi i caracterització química del conjugat $[PtCl_2Dap]-L1-P3$ (Cj3)

En la síntesi del següent conjugat **Cj3** es va emprar l'anàleg dicarba saturat de l'octreotide **P3** (figura 4.7).

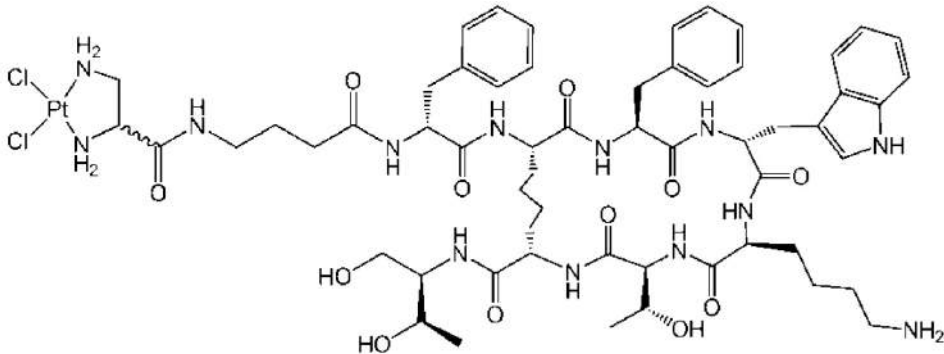


Figura 4.7. Estructura química del conjugat Cj3.

La síntesi d'aquest conjugat també es va dur a terme seguint una estratègia lineal en fase sòlida. La seva purificació per HPLC en fase reversa (figura 4.8) i posterior caracterització per EM-MALDI-TOF (resultats no mostrats) van demostrar que s'havia format el compost esperat. El fet que l'estudi qualitatiu de la seva solubilitat demostrés que presentava una baixa solubilitat en medi aquós, va descartar que es prosseguís amb la caracterització biològica d'aquest conjugat i va promoure que es canviés la molècula espaiadora dels futurs compostos a estudiar amb l'objectiu de millorar la seva solubilitat.

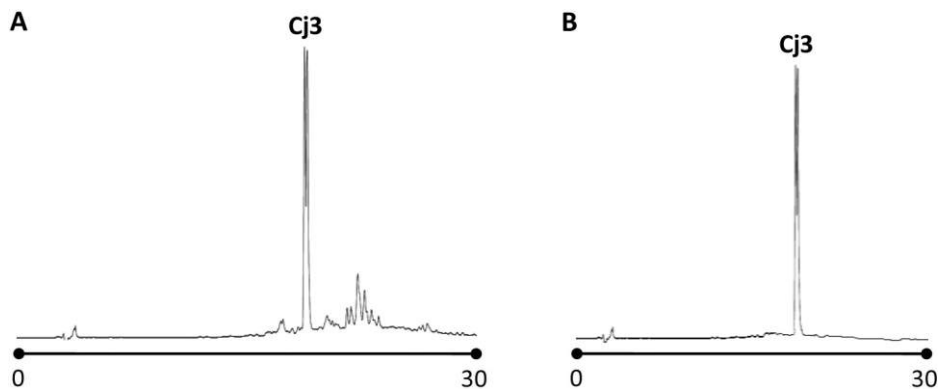


Figura 4.8. Perfils cromatogràfics del **Cj3**. **A.** Perfil cromatogràfic del cru de reacció. **B.** Perfil cromatogràfic del **Cj3** purificat.

- d) Síntesi i caracterització química dels conjugats $[PtCl_2Dap] - L2 - P3$ (**Cj4**), $[(\eta^6\text{-bifenil})OsCl(pico)] - L2 - P3$ (**Cj5**), $[(\eta^6\text{-}p\text{-Cym})RuCl(PPh_3)(ImB)] - L2 - P3$ (**Cj6**) i $[(\eta^6\text{-}p\text{-Cym})RuClDap] - L2 - P3$ (**Cj7**)

Els següents quatre conjugats sintetitzats tenien una estructura molt similar però diferien entre ells en el complex metàl·lic, ja que el **Cj4** estava format pel complex metàl·lic de Pt(II) utilitzat fins al moment, el **Cj5** per un complex d'Os(II), i els conjugats **Cj6** i **Cj7** per complexos de Ru(II) (figura 4.9). Per tal de millorar la seva solubilitat, es va introduir el polietilenglicol (PEG) com a molècula espaiadora.

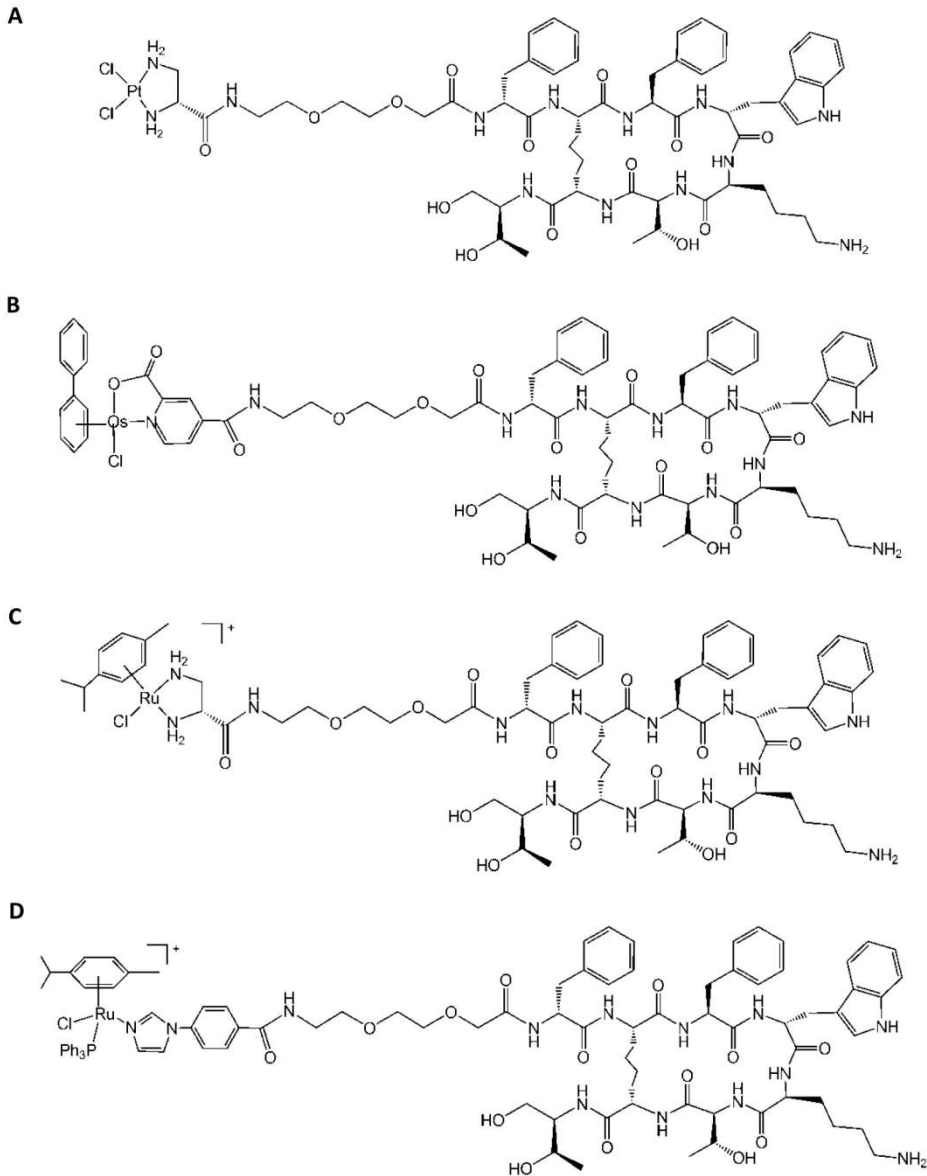


Figura 4.9. Estructura química del conjugats Cj4 (A), Cj5 (B), Cj6 (C) i Cj7 (D).

La síntesi d'aquests compostos es va dur a terme seguint diverses estratègies en fase sòlida. Un cop sintetitzats, les anàlisis posteriors per HPLC en fase reversa i espectrometria de masses van confirmar l'obtenció dels productes

desitjats (figura 4.10). Pels conjugats **Cj5** i **Cj6** es va detectar la formació d'un segon pic que corresponia a la forma diaquo dels conjugats (figura 4.10, B i C), la qual cosa indicava que durant el procés de purificació per HPLC es produïa una ràpida activació de l'enllaç metall-Cl en medi aquós.

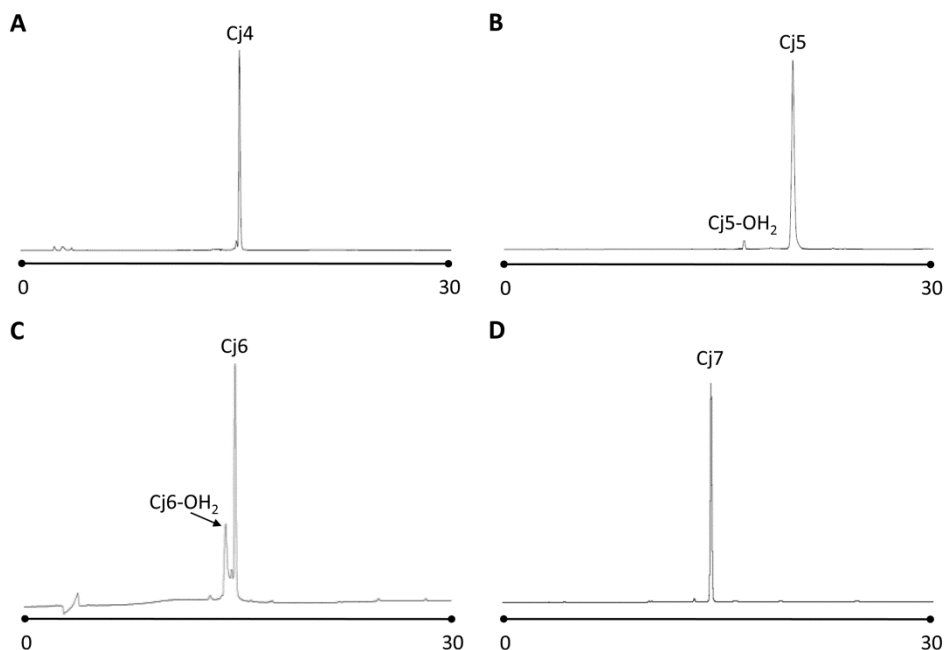


Figura 4.10. Perfils cromatogràfics dels conjugats **Cj4** (A), **Cj5** (B), **Cj6** (C) i **Cj7** (D).

A continuació, es van avaluar la solubilitat, l'activació, l'estabilitat en medi aquós i la capacitat d'unió al DNA dels conjugats **Cj4**, **Cj5**, **Cj6*** i **Cj7**. En primer lloc, l'estudi qualitatiu de la solubilitat dels quatre conjugats va demostrar que aquests compostos tenien una solubilitat major en dissolucions aquoses que els conjugats sintetitzats amb anterioritat. També es va observar que els conjugats de Ru(II) **Cj6** i **Cj7** presentaven una major solubilitat que els conjugats de Pt(II) i

*Pel conjugat **Cj6**, aquests experiments es van realitzar amb el conjugat unit al pèptid **P2** (conjugat **Cj6a**) enlloc del pèptid **P3**. Els resultats obtinguts son extrapolables al conjugat **Cj6**; per això, en el text es parla del **Cj6**.

Os(II), la qual cosa es podia atribuir a la càrrega positiva que presentaven els conjugats de ruteni al centre metàl·lic.

A continuació, es va avaluar l'activació dels conjugats mitjançant la hidròlisi de l'enllaç M-Cl. A tal efecte, els conjugats es van incubar amb diferents concentracions de clorur amb l'objectiu d'imitar les condicions fisiològiques del plasma sanguini (100 mM), el citoplasma cel·lular (22.7 mM) i el nucli cel·lular (4 mM); en tots els casos, els productes obtinguts es van aïllar i caracteritzar per HPLC i espectrometria de masses, respectivament. En primer lloc, es va observar que el conjugat **Cj4** es transformava en l'espècie monoquo corresponent després d'estar 24 h en presència d'una baixa concentració de ió clorur. Els resultats també van demostrar que en augmentar la concentració de NaCl el percentatge de l'espècie hidrolitzada disminuïa, sent pràcticament nul·la a 100 mM (taula 4.1).

CONJUGAT	% de producte hidrolitzat			% adducte de DNA
	4 mM	22,7 mM	100 mM	4 mM
Cj4	16	7	3	42
Cj5	95	35	12	49
Cj6a	97	83	74	37
Cj7	0	0	0	0

Taula 4.1. Avaluació de l'estabilitat en medi aquós i de la capacitat de formar adductes amb el DNA dels conjugats Cj4, Cj5, Cj6a i Cj7. Percentatge de formació d'adductes aquo en solucions d'aigua amb diferents concentracions de clorur que imiten la del plasma sanguini (100 mM), del citoplasma cel·lular (22.7 mM) i del nucli cel·lular (4 mM), i percentatge de formació d'adductes conjugat-DNA en una solució aquosa amb 4 mM de NaCl després de 24h.

Pel què fa al conjugat d'Os(II), els resultats van indicar que la hidròlisi de l'enllaç Os-Cl també seguia una cinètica molt dependent de la concentració de ions clorur en el medi, ja que a una baixa concentració pràcticament s'observava tot el conjugat en la seva forma aquo, mentre que en augmentar la concentració, la formació de l'espècie aquo disminuïa (taula 4.1).

Els resultats obtinguts amb els conjugats **Cj6** i **Cj7** van revelar que en la hidròlisi dels conjugats de Ru(II) tenen un paper més important els lligands que formen part del complex metàl·lic que la concentració de ions clorur del medi. Així, pel conjugat **Cj6** es va observar que la formació de l'espècie aquo es produïa molt ràpidament i que era pràcticament l'única espècie detectada a concentracions baixes de clorur, mentre que pel conjugat **Cj7** no es va observar la hidròlisi en cap de les concentracions de NaCl avaluades (taula 4.1).

Seguidament, es va analitzar la capacitat d'interacció dels quatre conjugats amb el DNA. Amb aquesta finalitat, els conjugats **Cj4**, **Cj5**, **Cj6** i **Cj7** es van incubar amb la seqüència oligonucleotídica 5'd(CATGGCT) en una solució aquosa 4 mM de NaCl a 37°C durant 24 hores. Els resultats van demostrar, en primer lloc, que la reacció del conjugat **Cj4** amb la seqüència oligonucleotídica generava un quelat entre el fragment de platí del conjugat i la cadena de DNA amb un 42% de rendiment (taula 4.1). L'anàlisi per EM-MALDI-TOF (resultats no mostrats) dels productes de la digestió enzimàtica amb les exonucleases SpPD i SVPD, va confirmar la coordinació a les dues guanines de la seqüència i la formació de l'adducte bifuncional 1,2-intracadena entre el **Cj4** i la cadena de DNA (figura 4.11).

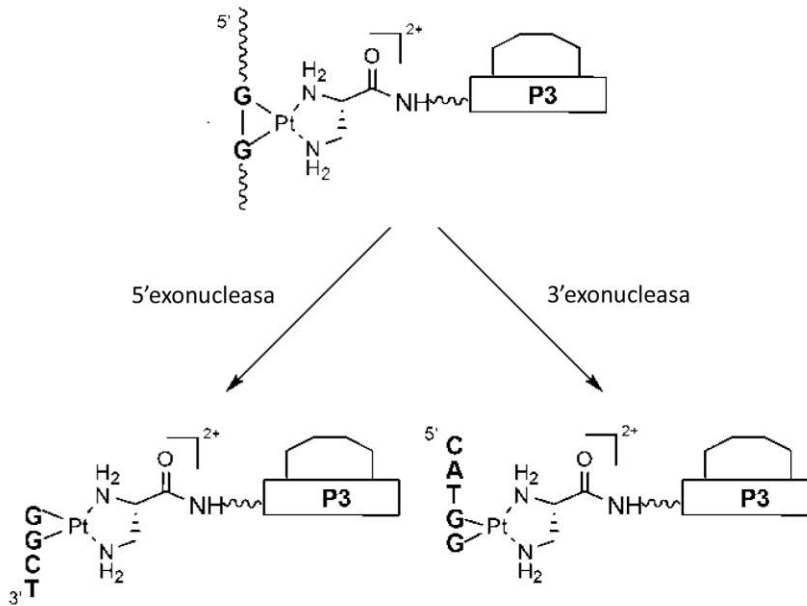


Figura 4.11. Unió al DNA del conjugat Cj4. Esquema que indica la complexació entre la seqüència oligonucleotídica ^{5'}d(CATGGCT) i el Cj4, i els productes obtinguts després de la digestió enzimàtica.

Pel què fa al conjugat d'Os(II), la seva reacció amb la seqüència oligonucleotídica va donar lloc a la formació d'un adducte amb un 49% de rendiment (taula 4.1). La caracterització posterior d'aquest producte per EM-MALDI-TOF (resultats no mostrats) va confirmar que es tractava de l'adducte monofuncional del Cj5 amb la cadena de DNA. Seguidament, la digestió de l'adducte amb les dues exonucleases SVPD i SpPD va revelar que la coordinació de l'àtom d'Os s'havia produït a través de la guanina de la posició 5' (figura 4.12).

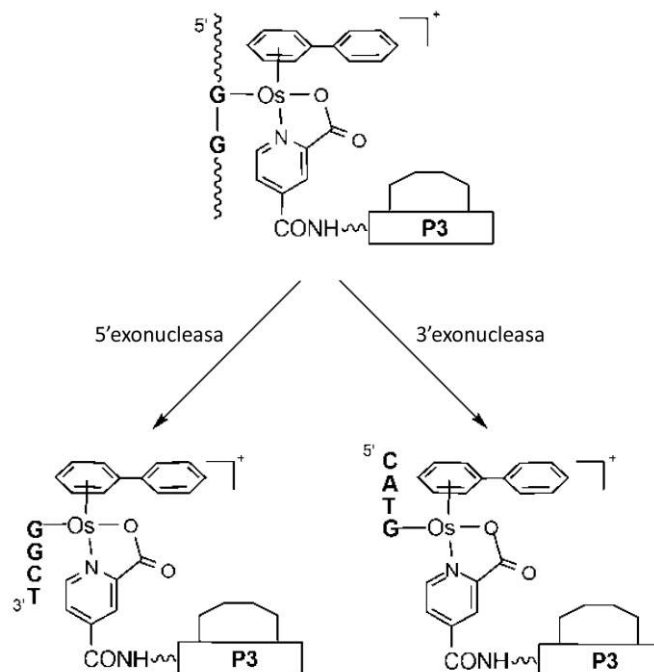


Figura 4.12. Unió al DNA del conjugat Cj5. Esquema que indica la complexació entre la seqüència oligonucleotídica 5'd(CATGGCT) i el Cj5, i els productes obtinguts després de la digestió enzimàtica.

Per últim, i pel què fa als conjugats de Ru(II), primerament es va observar que el **Cj6** reaccionava ràpidament amb la seqüència oligonucleotídica i formava un nou producte que, 24 hores després de l'inici de la incubació, representava el 37% del cru de la reacció (taula 4.1). La caracterització posterior d'aquest producte va demostrar que era l'adducte monofuncional del conjugat amb la seqüència oligonucleotídica; la seva digestió enzimàtica amb les exonucleases SpPD i SVPD, va indicar que el ruteni es coordinava amb la guanina de la posició 5' (figura 4.13, A). D'altra banda, pel conjugat **Cj7** no es va detectar que reaccionés amb la seqüència 5'd(CATGGCT) (taula 4.1), la qual cosa assenyalava que no existia coordinació entre l'àtom de ruteni d'aquest conjugat i les bases nitrogenades de l'oligonucleòtid (figura 4.13, B).

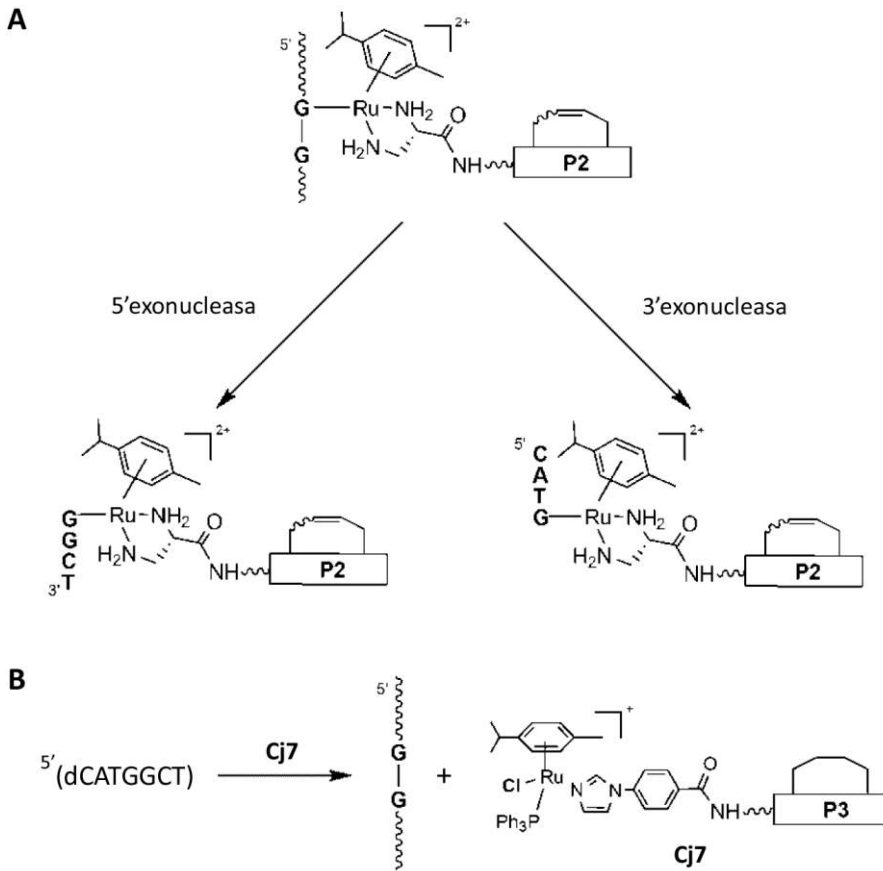


Figura 4.13. Unió al DNA dels conjugats Cj6a i el Cj7. Esquema que indica la complexació entre la seqüència oligonucleotídica 5'd(CATGGCT) i el Cj6a (A) o el Cj7 (B), i els productes obtinguts després de la digestió enzimàtica.

4.1.1.2. Avaluació de la citotoxicitat i la selectivitat dels conjugats metall-anàleg dicarba de l'octreotide

Un cop sintetitzats i caracteritzats els conjugats metall-anàleg de l'octreotide, es va fer la caracterització biològica de cinc conjugats que havien demostrat tenir unes propietats químiques que els asseyalaven com a bons candidats a fàrmacs antitumorals, els conjugats **Cj2**, **Cj4**, **Cj5**, **Cj6** i **Cj7**.

a) Anàlisi de l'activitat citotòxica del conjugat $[PtCl_2Dap] - L1 - P2$ (Cj2) en la línia cel·lular MCF-7

Inicialment es va avaluar el conjugat **Cj2**, el primer conjugat que havia resultat ser estable i que presentava unes propietats que permetien analitzar la seva activitat biològica. L'experiment es va realitzar en les cèl·lules MCF-7, una línia de carcinoma de mama que sobreexpressa el receptor SSTR2⁽¹¹⁸⁾.

Les cèl·lules es van tractar amb el conjugat **Cj2** i amb el pèptid i el complex que constitueixen el **Cj2**, el pèptid **P2** i el complex **Cx1** (figura 4.14), respectivament, ja que es va voler comprovar si la unió del complex al pèptid **P2** millorava la seva activitat citotòxica.

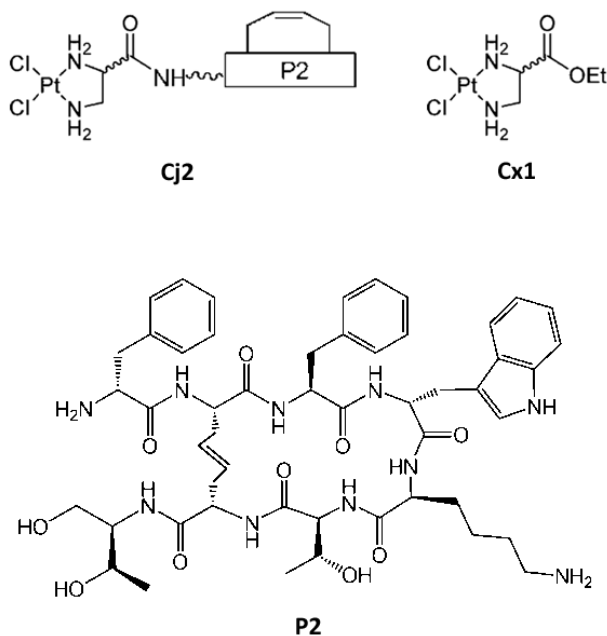


Figura 4.14. Estructura del Cj2, el Cx1 i el P2.

Les cèl·lules MCF-7 es van tractar amb un ampli rang de concentracions (entre 0 i 250 μM) del conjugat **Cj2**, el pèptid **P2** i el complex **Cx1** i es va determinar la concentració que inhibia el creixement cel·lular en un 50% (IC_{50}). Els compostos que no van mostrar una inhibició del 50% del creixement cel·lular a la concentració màxima utilitzada (250 μM) es van considerar inactius. Els resultats van demostrar que el **Cj2** i el **P2** no tenien efecte en aquesta línia cel·lular ja que, tot i que es va detectar un lleuger descens de la viabilitat cel·lular degut al tractament amb aquests compostos, la dosi màxima utilitzada no va arribar a produir una mortalitat del 50% (figura 4.15). D'altra banda, el complex **Cx1** sí que va resultar ser actiu, ja que va produir una disminució en el creixement cel·lular d'aquesta línia que va permetre determinar una IC_{50} per aquest compost de $67.00 \pm 19.01 \mu\text{M}$.

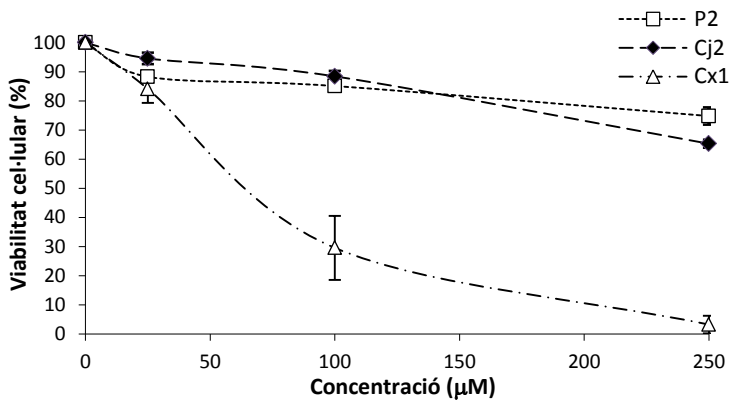


Figura 4.15. Efecte citotòxic del pèptid **P2**, el conjugat **Cj2** i el complex **Cx1** en la línia cel·lular **MCF-7**. Els resultats representen la mitjana \pm error estàndard de tres experiments realitzats independentment.

Els resultats obtinguts en aquest apartat van indicar que la síntesi del conjugat **Cj2** provocava una pèrdua d'activitat en el complex metàl·lic de Pt(II). Tenint en compte aquests resultats i considerant que el **Cj2** havia mostrat una baixa

solubilitat en dissolucions aquoses i que l'anàleg saturat de l'octreotide **P3** tenia una major afinitat pel receptor SSTR2 que l'anàleg insaturat **P2**⁽²⁴³⁾, es va decidir abandonar l'estudi dels compostos constituïts per **P2** i seguir amb la caracterització biològica dels compostos constituïts per **P3**, els conjugats **Cj4**, **Cj5**, **Cj6** i **Cj7**.

b) Internalització de l'anàleg saturat de l'octreotide P3 en la línia cel·lular MCF-7

Abans d'analitzar l'efecte citotòxic dels conjugats en estudi es va comprovar la capacitat del pèptid **P3** d'internalitzar a l'interior de les cèl·lules tumorals que sobreexpressen el receptor SSTR2. Amb aquesta finalitat i amb l'objectiu de poder comparar la capacitat d'internalitzar del pèptid **P3** amb la de l'octreotide (**P1**), tots dos pèptids es van marcar amb fluoresceïna, obtenint els pèptids **P3-F** i **P1-F**, respectivament.

En primer lloc, es va estudiar la capacitat d'internalitzar del dicarba anàleg de l'octreotide **P3-F** mitjançant la tècnica de la microscòpia confocal. Les cèl·lules MCF-7 es van tractar durant 1, 3 i 6 hores a una concentració 50 µM de pèptid **P3-F** i es van observar amb el microscopi confocal Leica TCS-SF2. Els resultats van demostrar que després d'una hora de tractament al citoplasma de la majoria de cèl·lules s'observaven unes vesícules fluorescents (probablement, endosomes) que confirmaven l'entrada del pèptid a l'interior de les cèl·lules (figura 4.16, A). Després de 3 i 6 hores de tractament, es va observar que el nombre i la intensitat de fluorescència de les vesícules havia augmentat de forma notable, la qual cosa revelava una important internalització del pèptid durant aquests temps (figura 4.16, A). A les 6 hores de tractament, però, les vesícules no s'apreciaven amb tanta claredat com a temps inferiors, ja que la

fluorescència de les cèl·lules era molt més difusa; aquests resultats indicaven que en aquest període de temps el pèptid començava a ser degradat.

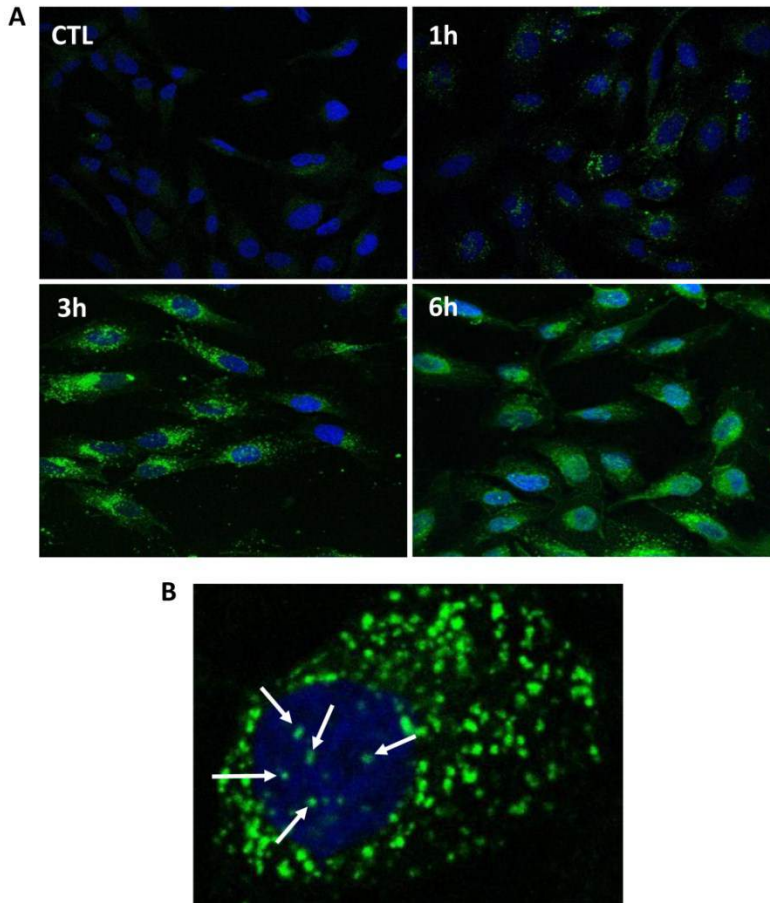


Figura 4.16. Imatge obtinguda per microscòpia confocal de la internalització del pèptid P3-F en les cèl·lules MCF7. A. Les cèl·lules MCF7 es van incubar amb el pèptid P3-F o amb medi sol com a control (CTL). El nucli cel·lular es va marcar amb Hoechst (color blau). La localització del pèptid marcat amb fluorescència s'indica de color verd. **B.** Amplificació de la imatge (1000x) de les cèl·lules MCF7 incubades amb el pèptid P3-F durant 3 hores. Les fletxes indiquen la localització nuclear del pèptid.

D'altra banda, els resultats també van demostrar que les vesícules s'agrupaven principalment a la perifèria del nucli cel·lular; l'augment del tamany de la imatge (1000x) de les cèl·lules exposades al pèptid **P3-F** durant 3 hores (figura 4.16, B) va evidenciar que el pèptid tenia la capacitat d'accedir fins al nucli cel·lular, ja que tot i que les cèl·lules presentaven la major part de les vesícules al citoplasma, una petita proporció de la fluorescència es localitzava a l'interior del nucli.

Seguidament, les observacions qualitatives obtingudes per microscòpia confocal es van confirmar amb les dades quantitatives obtingudes mitjançant la tècnica de la citometria de flux. Com es troba representat en la figura 4.17 A, la intensitat mitjana de fluorescència intracel·lular corresponent a la internalització del pèptid **P3-F** augmentava amb el temps, ja que a 1 hora la intensitat de fluorescència detectada era de 77.60 ± 16.46 , a les tres hores era de 111.08 ± 17.16 i a les 6 hores, de 182.28 ± 39.11 ; aquests resultats van confirmar que en aquests períodes de temps es produïa una captació cel·lular activa del pèptid. A continuació, per tal de comparar el pèptid **P3** amb l'octreotide, les cèl·lules MCF7 es van incubar amb el pèptid **P1-F** a les mateixes condicions utilitzades pel pèptid **P3-F**. Com ja s'esperava considerant que l'octreotide té més afinitat pel receptor SSTR2 que el pèptid **P3**, la captació de l'octreotide va ser entre un 40% i un 57% més elevada que l'obtinguda pel seu anàleg saturat. En relació a la cinètica d'internalització, els resultats van manifestar que aquesta cinètica era paral·lela entre els dos pèptids estudiats (figura 4.17, B). En conjunt, aquests resultats van demostrar que el pèptid **P3** tenia la capacitat d'entrar a l'interior de les cèl·lules i el van afirmar com a bon agent transportador.

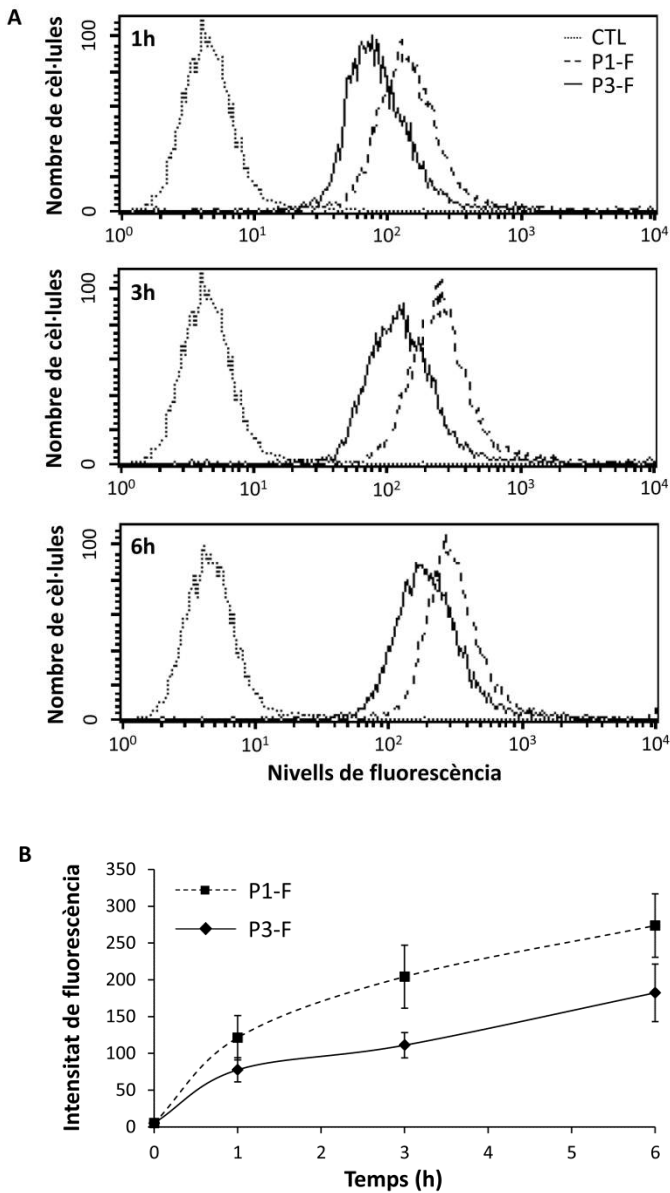


Figura 4.17. Eficiència de la internalització de l'octreotide (P1-F) i el pèptid P3 (P3-F) en les cèl·lules MCF-7. A. Els histogrames representen la intensitat mitjana de fluorescència obtinguda després de realitzar tres experiments de forma independent analitzant 10000 cèl·lules en cada un. La intensitat de fluorescència es mostra en escala logarítmica. **B.** Cinètica de la internalització dels pèptids **P1-F** i **P3-F**. Cada punt de la gràfica representa la mitjana de la intensitat de fluorescència intracel·lular de tres experiments independents \pm l'error estàndard.

c) Avaluació de l'activitat citotòxica dels conjugats Cj4, Cj5, Cj6 i Cj7 en la línia cel·lular MCF-7

A continuació, es va procedir a avaluar la capacitat citotòxica dels conjugats **Cj4**, **Cj5**, **Cj6** i **Cj7** i del pèptid **P3** (figura 4.18) en la línia cel·lular MCF-7. Amb aquest objectiu, les cèl·lules es van tractar amb un ampli rang de concentracions (entre 0 i 250 μM) dels compostos i es va determinar la seva IC_{50} .

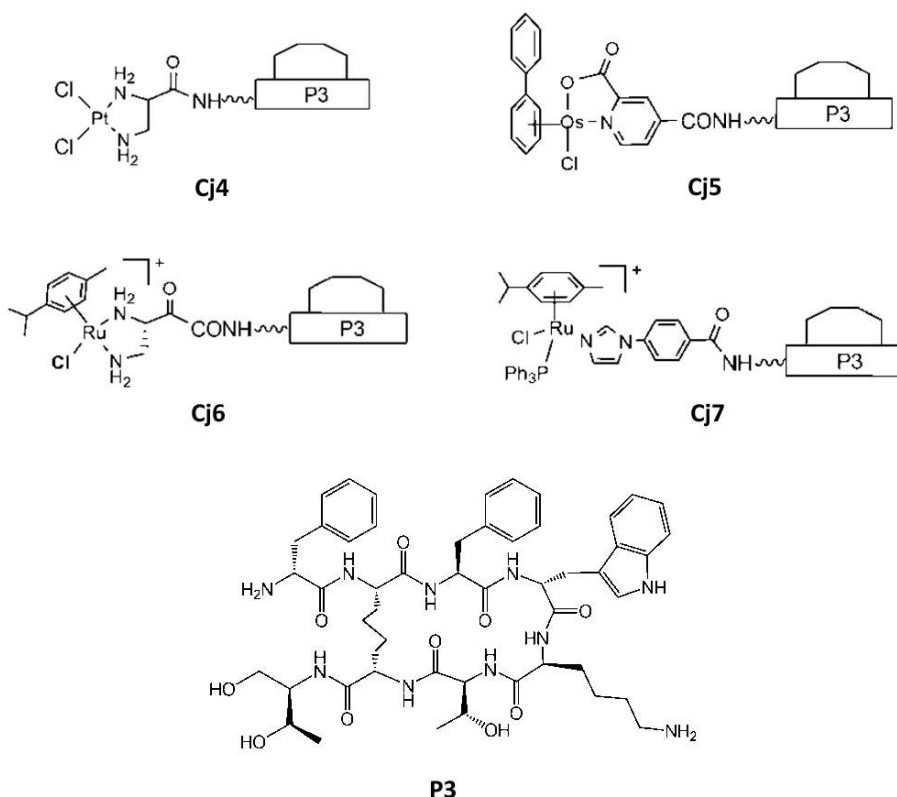


Figura 4.18. Estructura dels conjugats Cj4, Cj5, Cj6 i Cj7 i del pèptid P3.

Els resultats van demostrar que dels 5 compostos analitzats, només el conjugat **Cj7** tenia la capacitat d'inhibir en un 50% el creixement de les cèl·lules a una concentració inferior a 250 μM (taula 4.2) i que la seva IC_{50} era de $63,00 \pm 1,53$

μM , un valor moderat si es comparava amb la del cisplatí en aquesta línia cel·lular ($\text{IC}_{50} = 3.04 \pm 0.25 \mu\text{M}$).

PÈPTIDS	P3			
IC_{50} (μM)	> 250			
CONJUGATS	Cj4	Cj5	Cj6	Cj7
IC_{50} (μM)	> 250	> 250	> 250	$63,00 \pm 1,53$
COMPLEXES	Cx1	-	Cx2	Cx3
IC_{50} (μM)	$67,00 \pm 19,01$	-	> 250	$3,32 \pm 0,54$

Taula 4.2. Valors de IC_{50} del pèptid P3, els conjugats Cj4 - Cj7 i dels complexos metàl·lics control Cx1 – Cx3 en les cèl·lules MCF-7.

En vista d'aquests resultats, a continuació es va plantejar si la poca activitat citotòxica dels conjugats podia ser deguda a què els complexos metàl·lics sense unir al pèptid ja eren poc actius o si, per contra, havien perdut la seva activitat en unir-se al pèptid transportador. Per tal de comprovar-ho, es van considerar els resultats que s'havien obtingut prèviament pel complex **Cx1** i es va avaluar l'activitat citotòxica dels complexos $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{RuCl}(\text{DAP})]^+$ (**Cx2**) i $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{RuCl}(\text{Im-BzCOOMe})(\text{PPh}_3)]^+$ (**Cx3**) (figura 3.1). D'altra banda, el complex d'osmi $[(\eta^6\text{-bip})\text{OsCl}(4\text{-CO}_2\text{Et-Pico})\text{Cl}]$ (complex **Cx4**, figura 3.1) no es va valorar en el present treball ja que no es disposava d'aquest complex. Tot i això, un estudi previ havia demostrat que aquest complex era moderadament actiu en dues línies cel·lulars de carcinoma d'ovari humà amb elevada expressió del receptor SSTR2, les A2780 i la respectiva línia resistent al cisplatí A2780cis, ja que la IC_{50} determinada per aquest complex va ser $44 \mu\text{M}$ i $61 \mu\text{M}$, respectivament ⁽²⁴²⁾.

Els resultats van demostrar que el complex **Cx3** era molt citotòxic en aquesta línia cel·lular ja que el valor de IC_{50} obtingut era $3.32 \pm 0.54 \mu\text{M}$ (Taula 4.2), un valor molt similar al del cisplatí en aquesta mateixa línia ($IC_{50} = 3,04 \pm 0,25 \mu\text{M}$). D'altra banda, el complex **Cx2** va resultar ser inactiu en aquesta línia cel·lular i el complex **Cx1**, tal i com s'havia determinat prèviament, tenia una activitat moderada ($IC_{50} = 67,00 \pm 19,01 \mu\text{M}$) (Taula 4.2).

d) Estudi de la capacitat d'unió al DNA del complex Cx3

Els bons resultats obtinguts pel complex **Cx3** van promoure que es decidís avaluar la seva capacitat d'unir-se al DNA fent-lo reaccionar amb el plàsmid pBR322. Aquest plàsmid presenta dues conformacions que estan en equilibri, la forma circular (*OC, open circular*) i la forma tancada covalentment (*CCC, covalently closed circular*), però quan el plàsmid és tractat amb un complex capaç d'unir-se al DNA com el cisplatí, s'indueixen uns canvis en la seva estructura terciària que generen unes noves conformacions amb una mobilitat electroforètica diferent a la de la OC i la CCC.

En aquest experiment el plàsmid es va tractar amb diferents condicions. En primer lloc, es van preparar dos controls negatius, un amb el plàsmid pBR322 sense tractament i un amb el plàsmid en presència del vehicle (aigua-5% DMSO). A continuació, es van preparar dos controls positius que contenien el plàsmid pBR322 i el cisplatí en absència i en presència del vehicle (aigua-5% DMSO). Finalment, el plàsmid pBR322 es va tractar amb el **Cx3** i el vehicle (aigua-5% DMSO).

Els resultats van demostrar que en les mostres que contenien el plàsmid o el plàsmid amb el vehicle, únicament s'observaven dues bandes que corresponien

a les formes OC i CCC del plàsmid (figura 4.19). D'altra banda, en els controls positius tractats amb el cisplatí es van generar dues bandes intermitges degut a la formació d'adductes entre el cisplatí i el DNA plasmídic, especialment en presència de DMSO. Pel què fa al tractament del plàsmid amb el complex **Cx3**, no es va observar cap canvi en les conformacions OC i CCC, la qual cosa va indicar que aquest complex no interaccionava amb el DNA.

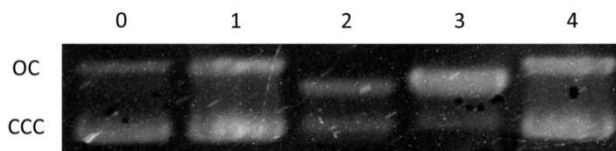


Figura 4.19. Gel d'electroforesi del DNA plasmídic pBR322 tractat amb diferents condicions. Mostra 0, DNA plasmídic pBR322 (control negatiu); mostra 1, DNA + aigua miliQ-5% DMSO (control negatiu); mostra 2, DNA + Cisplatí (control positiu); mostra 3, DNA + Cisplatí + aigua miliQ-5% DMSO (control positiu); mostra 4, DNA + complex **Cx3** + aigua miliQ-5% DMSO. (OC, forma circular oberta; CCC, forma circular tancada covalentment).

e) **Avaluació de l'acumulació de ruteni a l'interior de les cèl·lules tumorals MCF-7**

Tot seguit, amb l'objectiu d'avaluar l'eficàcia del pèptid **P3** com a agent transportador, es va analitzar si la unió del complex **Cx3** al pèptid **P3** millorava la seva acumulació a l'interior de les cèl·lules que expressen el receptor SSTR2. Les cèl·lules MCF-7 es van tractar amb el conjugat **Cj7** i el complex de ruteni **Cx3** i al cap de 24 hores es van analitzar els nivells de ruteni a l'interior de les cèl·lules tumorals per ICP-MS (*inductively coupled plasma - mass spectrometry*), un tipus d'espectrometria de masses molt sensible que permet determinar i quantificar elements amb uns límits de detecció molt baixos (ppb – ppt). Els resultats van indicar que els nivells intracel·lulars de ruteni eren més del doble després de tractar les cèl·lules amb el conjugat **Cj7** que amb el complex de

ruteni **Cx3**, ja que els valors obtinguts van ser de 143.14 ± 16.6 pmol Ru/ 10^6 cèl·lules i 68.01 ± 2.2 pmol Ru/ 10^6 cèl·lules, respectivament. Aquests resultats van confirmar que la unió entre el pèptid anàleg de l'octreotide i el complex de ruteni tenia un efecte positiu en la internalització del complex metàl·lic.

f) Estudi de la selectivitat del conjugat **Cj7**

L'objectiu principal en aquest treball era generar conjugats que actuessin específicament sobre les cèl·lules tumorals que sobreexpressessin el receptor SSTR2. Els resultats obtinguts fins al moment demostraven que la unió del complex metàl·lic a un anàleg de l'octreotide disminuïa l'activitat citotòxica del complex metàl·lic però que millorava la seva acumulació a l'interior de les cèl·lules. A continuació, es va estudiar si aquesta pèrdua d'activitat es podia compensar amb una entrada més selectiva del conjugat **Cj7** a les cèl·lules tumorals que expressessin el SSTR2. Amb aquesta finalitat, es va analitzar l'activitat citotòxica del conjugat **Cj7** en la línia cel·lular de carcinoma de pròstata DU-145 i en la línia cel·lular no tumoral CHO, dues línies cel·lulars que tenien una expressió més elevada de SSTR2 que les cèl·lules MCF-7, ja que la intensitat de fluorescència (IF) determinada per citometria de flux va ser 347.5 ± 54.6 i 344.0 ± 50.56 per les cèl·lules DU-145 i CHO, respectivament, mentre que per les cèl·lules MCF-7 va resultar ser 206.7 ± 14.27 (figura 4.20).

A continuació, l'anàlisi de l'activitat citotòxica del conjugat **Cj7** en les tres línies cel·lulars va demostrar que les cèl·lules DU-145 eren més sensibles que les cèl·lules MCF-7 i les cèl·lules CHO (figura 4.21), ja que la IC_{50} observada per aquesta línia tumoral (26.00 ± 3.46 μ M) era unes 2.4 vegades inferior a l'obtinguda per les cèl·lules MCF-7 (63.00 ± 1.53 μ M) i unes 1.7 vegades inferior a l'obtinguda per les cèl·lules CHO (45.17 ± 2.61 μ M).

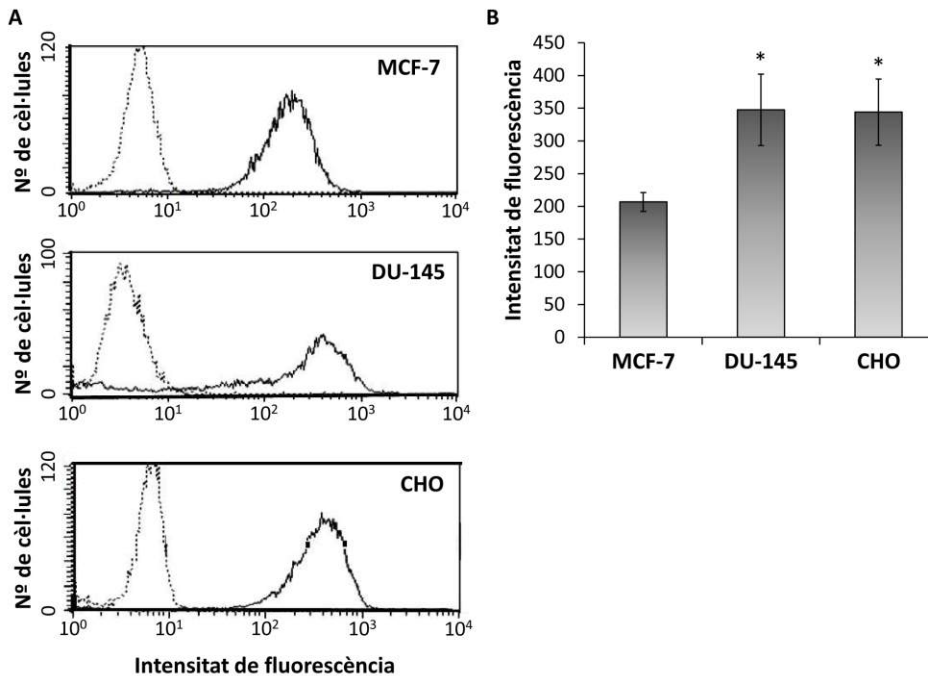


Figura 4.20. Expressió del receptor SSTR2 en les línies cel·lulars MCF-7, DU-145 i CHO.

A. Els histogrames representen la intensitat mitjana de fluorescència obtinguda després de realitzar tres experiments de forma independent analitzant 10000 cèl·lules en cada un. La intensitat de fluorescència es mostra en escala logarítmica. La línia contínua indica les cèl·lules incubades amb l'anticòs primari i la línia discontinua indica el control negatiu. **B.** Nivell d'expressió proteica del receptor SSTR2 en les cèl·lules MCF-7, DU-145 i CHO. Els resultats representen la mitjana \pm error estàndard d'un mínim de tres experiments realitzats independentment. (* Indica diferències significatives considerant una $P < 0.05$).

Els resultats també van indicar que aquest major efecte del conjugat **Cj7** no es relacionava amb un major efecte citotòxic del complex metàl·lic de Ru(II), ja que aquest era més efectiu en les cèl·lules MCF-7 ($3.32 \pm 0.54 \mu\text{M}$) que en les cèl·lules DU-145 ($6.80 \pm 0.99 \mu\text{M}$) i les cèl·lules CHO ($5.8 \pm 0.01 \mu\text{M}$). Aquests resultats van indicar que l'efecte del conjugat estava relacionat amb l'expressió de SSTR2, ja que les cèl·lules que mostraven una major expressió del receptor eren les més sensibles al conjugat.

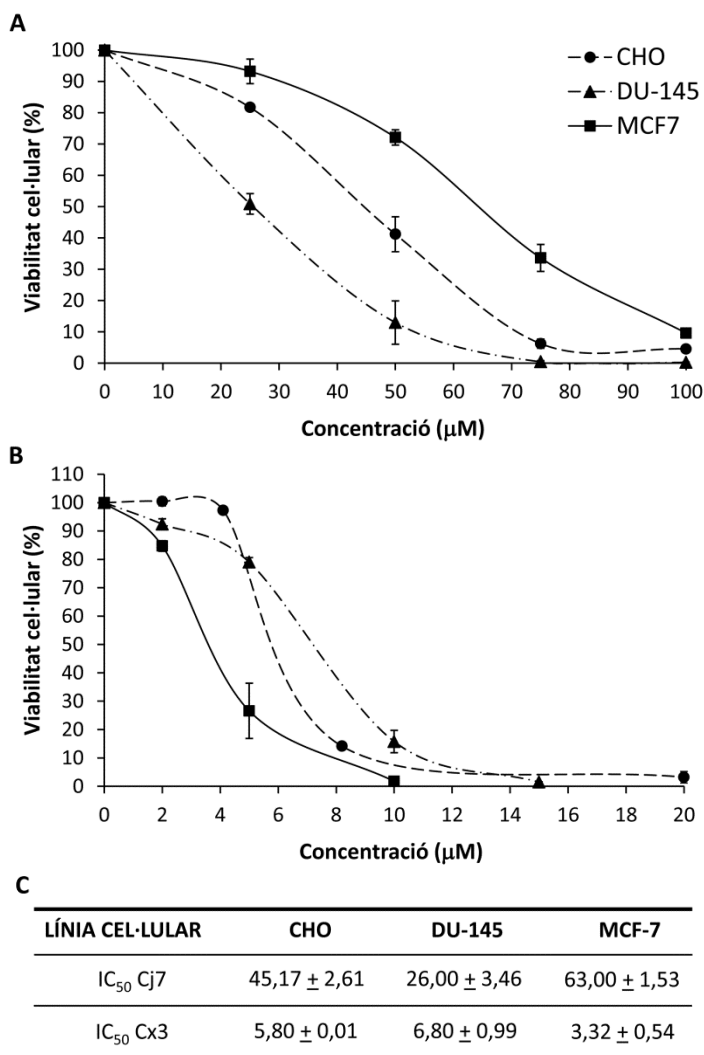


Figura 4.21. Efecte citotòxic i valors de IC₅₀ del conjugat Cj7 i el complex Cx3 en les línies cel·lulars CHO, DU-145 i MCF-7. **A i B.** Representació gràfica de la viabilitat cel·lular en tractar les cèl·lules amb el conjugat Cj7 (**A**) i el complex Cx3 (**B**). Cada punt del gràfic representa la mitjana ± error estàndard de tres experiments realitzats independentment. **C.** Valors de IC₅₀ dels compostos estudiats. Els valors representen la mitjana ± error estàndard de tres experiments realitzats independentment.

4.1.2 Vehiculització de compostos metàl·lics de Pt(IV) a través de la unió a anàlegs de folat

Dins d'aquest apartat, es va analitzar una altra estratègia per vehiculitzar compostos citotòxics cap a les cèl·lules tumorals. En concret, es va avaluar l'activitat antitumoral d'un conjugat constituït per un complex metàl·lic de Pt(IV) i un anàleg del folat.

a) Síntesi d'un conjugat de picoplatí unit a un anàleg de l'àcid fòlic

Per la síntesi del conjugat **Cj8** es van utilitzar un complex metàl·lic de Pt(IV) anàleg del picoplatí (el complex **Cx10**) i l'anàleg de l'àcid fòlic **F2**, al qual se li havia introduït una molècula de PEG que feia la funció de molècula espaciadora i millorava la solubilitat del producte final (figura 4.22). Els experiments van ser realitzats per l'Esther Escribano i la Dra Virtudes Moreno del Departament de Química Inorgànica de la Facultat de Química de la Universitat de Barcelona.

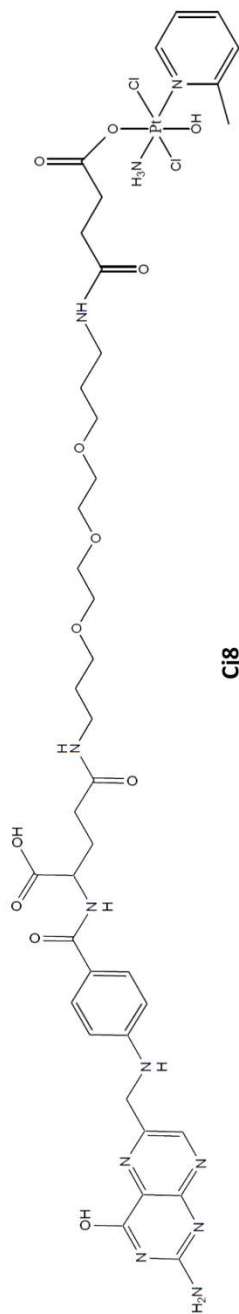
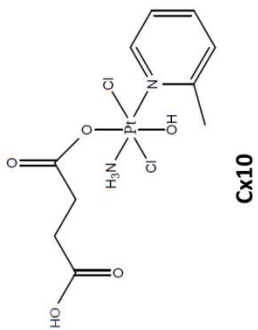
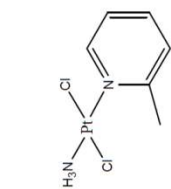
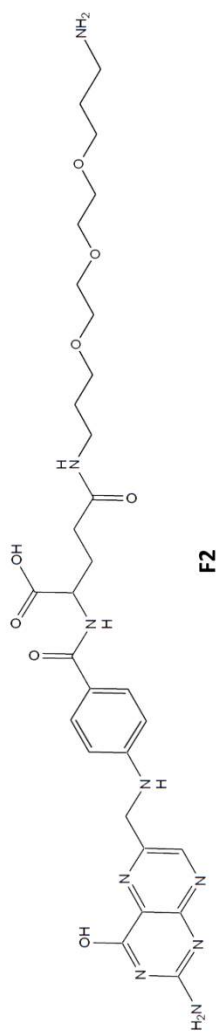


Figura 4.22. Estructura química de l'anàleg de folat F2, els complexos Cx9 i Cx10 i el conjugat Cj8

La síntesi del conjugat **Cj8** es va dur a terme a través de la formació d'un enllaç amida entre el grup carboxílic del complex **Cx10** i el grup amino de la molècula de PEG de l'anàleg de folat **F2**. Un cop sintetitzat el conjugat **Cj8**, la seva purificació i caracterització es va realitzar a través de la tècnica de l'HPLC-MS la qual cosa va corroborar que s'havia obtingut el producte desitjat (figura 4.23).

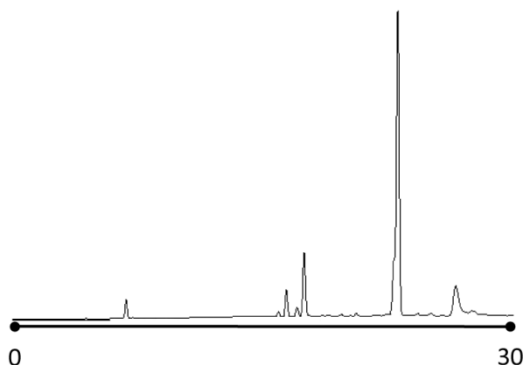


Figura 4.23. Perfil cromatogràfic del conjugat **Cj8** obtingut per HPLC.

b) **Avaluació de l'activitat citotòxica del conjugat **Cj8**, l'anàleg de folat **F2** i els complexos **Cx9** i **Cx10****

A continuació, es va determinar si el conjugat sintetitzat tenia activitat antitumoral sobre una línia cel·lular de càncer de mama humà que sobreexpressa el receptor FR, la línia MDA-MB-231 ^(254,255). A més, les cèl·lules també es van tractar amb l'anàleg de folat **F2**, el complex **Cx9** i el complex **Cx10** amb l'objectiu de comprovar si la unió del complex a l'anàleg millorava la seva activitat citotòxica i si hi havia diferències entre els dos complexos de platí.

Les cèl·lules es van tractar amb un ampli rang de concentracions (0 - 200 μM) dels quatre compostos, la qual cosa va demostrar que el conjugat **Cj8** tenia una activitat moderada ja que la seva IC_{50} va resultar ser $164,25 \pm 3,25 \mu\text{M}$ (figura 4.24). L'anàleg de folat **F2** es va considerar inactiu ja que el seu tractament

només va provocar una disminució molt lleu del creixement cel·lular. Pel què fa als complexos metàl·lics, tots dos van demostrar ser citotòxics sobre aquesta línia; tot i això el picoplatí era el més actiu, ja que la seva IC_{50} ($23,67 \pm 2,40 \mu\text{M}$) era més baixa que la detectada pel complex **Cx10** ($51,67 \pm 2,05 \mu\text{M}$) i que la del cisplatí ($25,75 \pm 2,19 \mu\text{M}$).

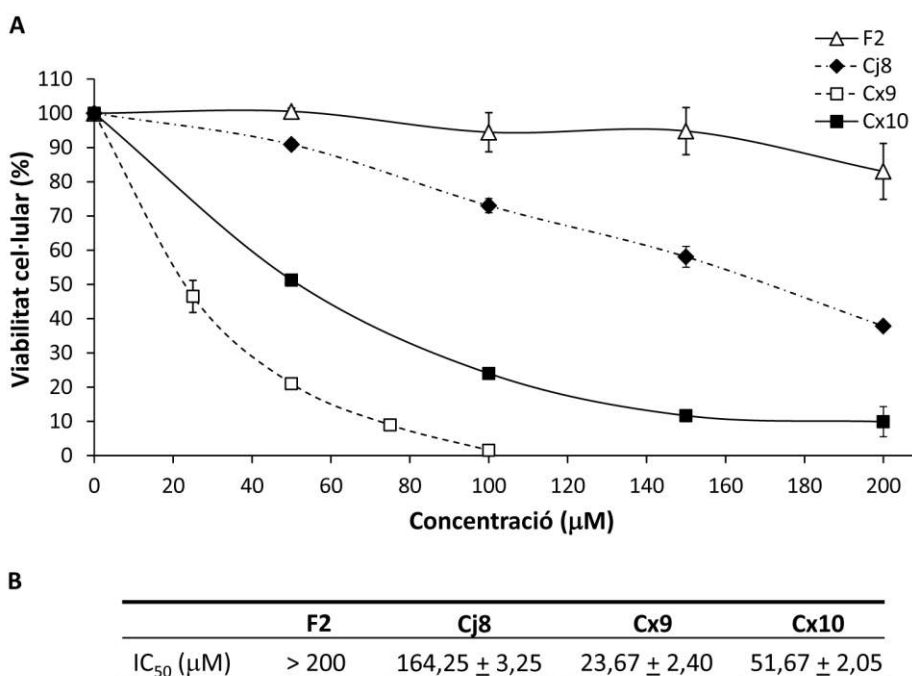


Figura 4.24. Efecte citotòxic dels complexos Cx9 i Cx10, de l'anàleg de folat F2 i del conjugat Cj8 en les cèl·lules MDA-MB-231. A. Cada punt de la gràfica representa la mitjana \pm error estàndard de tres experiments realitzats independentment. **B.** Valors de la IC_{50} de l'anàleg de folat **F2**, del conjugat **Cj8** i dels complexos **Cx9** i **Cx10** en les cèl·lules MDA-MB-231. Els resultats representen la mitjana \pm error estàndard d'un mínim de tres experiments realitzats independentment.

4.2 Resistència de les cèl·lules tumorals de càncer de pròstata a les teràpies dirigides a inhibir la família HER-EGF

La segona part d'aquest treball es va centrar en avaluar un possible mecanisme de resistència a les teràpies dirigides a inhibir la via de receptors i lligands HER-EGF en les cèl·lules de PCa. Aquest mecanisme de resistència es basava en l'augment de l'expressió de receptors i lligands d'aquesta via per tal de compensar la inhibició exercida sobre l'EGFR, un dels receptors de la via.

a) Expressió basal dels receptors i lligands de la família HER-EGF en línies de càncer de pròstata

L'estudi es va iniciar caracteritzant l'expressió basal dels quatre receptors de la via HER-EGF (EGFR, HER2, HER3 i HER4) i de set dels seus lligands (EGF, TGF- α , AMF, BTC, EREG, NRG-1, i HB-EGF) en dues línies de càncer de pròstata androgen-independents, les DU-145 i les PC-3. L'estudi de l'expressió gènica a nivell de mRNA, que es va realitzar utilitzant la tècnica de la PCR a temps real, va demostrar que totes dues línies cel·lulars expressaven els quatre receptors HER, tot i que, per HER4, els nivells de mRNA eren molt baixos (figura 4.25). La comparació entre les dues línies cel·lulars va indicar que les cèl·lules DU-145 tenien una major expressió dels receptors EGFR i HER2 que les cèl·lules PC-3, mentre que l'expressió de HER3 era molt similar en ambdues línies. Aquests resultats es van confirmar determinant l'expressió proteica dels receptors a nivell de la membrana cel·lular mitjançant la tècnica de la citometria de flux. Els resultats van corroborar que l'expressió de EGFR i HER2 era més elevada en les cèl·lules DU-145 que en les PC-3, mentre que totes dues línies mostraven una expressió molt similar per HER3 (figura 4.26). Els resultats van confirmar la

baixa expressió de HER4 observada a nivell gènic, ja que per citometria de flux també es van detectar uns nivells molt baixos d'aquest receptor en les dues línies cel·lulars.

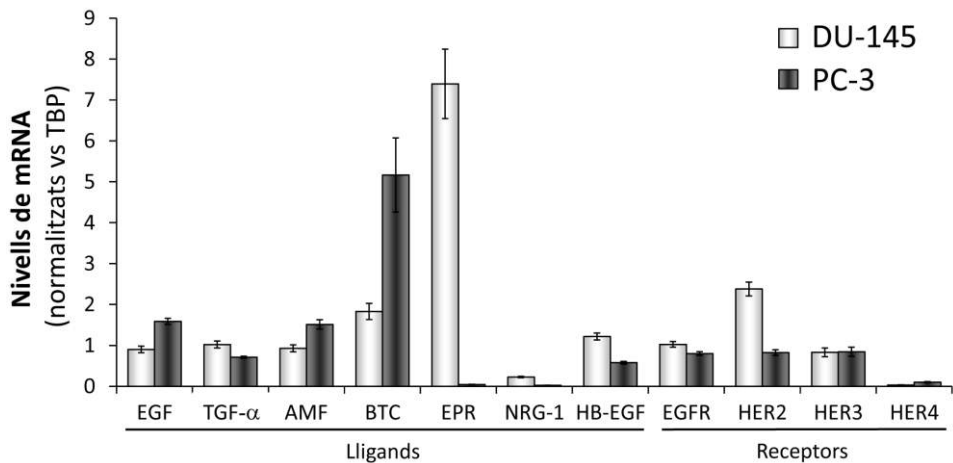


Figura 4.25. Nivells d'expressió gènica basal dels membres de la família HER-EGF en les línies cel·lulars de carcinoma de pròstata DU-145 i PC-3. El nivell de mRNA de cada gen va ser analitzada mitjançant la tècnica de la PCR a temps real. Cada valor va ser normalitzat en relació amb el nivell de mRNA d'un gen constitutiu, la proteïna d'unió a TATA (TBP, *TATA box binding protein*). Els resultats representen la mitjana \pm error estàndard d'un mínim de tres experiments realitzats independentment.

Pel que fa als lligands, es va detectar que totes dues línies cel·lulars expressaven els lligands de la via HER-EGF analitzats (figura 4.25). Com en el cas dels receptors, cada línia cel·lular presentava el seu propi patró d'expressió, ja que mentre en la línia DU-145 el lligand més sobreexpressat va resultar ser la EPI, en les cèl·lules PC-3 era la BTC. Aquesta és una propietat típica de moltes cèl·lules tumorals endotelials, que solen tenir un o més membres de la via HER-EGF sobreexpressats ⁽²⁵⁶⁾. Un altre resultat destacable va ser la baixa expressió de la NRG-1 en ambdues línies cel·lulars, que va ser pràcticament indetectable en les cèl·lules PC-3 (0.024 ± 0.004).

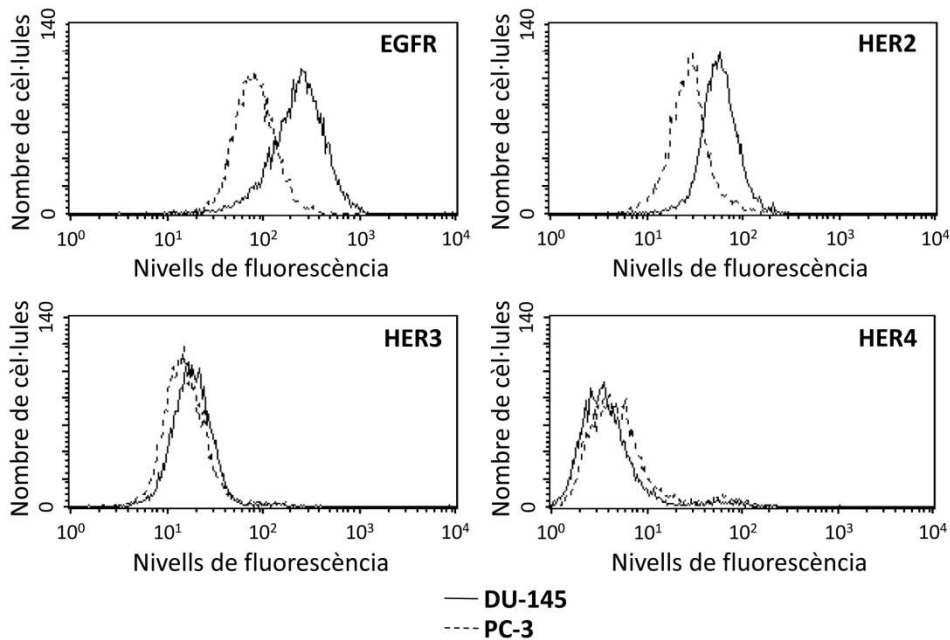


Figura 4.26. Nivells d'expressió proteica basal dels quatre receptors HER obtinguts per citometria de flux en les línies cel·lulars DU-145 i PC-3. Els histogrames representen la intensitat mitjana de fluorescència obtinguda després de realitzar tres experiments de forma independent analitzant 10000 cèl·lules en cada un. La intensitat de fluorescència es mostra en escala logarítmica. La línia contínua fa referència a les cèl·lules DU-145 i la línia discontinua a les cèl·lules PC-3.

En vista d'aquests resultats, es va estudiar si l'expressió basal dels receptors i lligands de la via HER-EGF permetia mantenir el creixement de les dues línies cel·lulars de forma autònoma, és a dir, sense necessitat d'addicionar una concentració òptima de factors de creixement en el medi. Així, les cèl·lules es van fer créixer en medi de creixement complementat amb diferents percentatges de sèrum fetal (DMEM-10% FBS i DMEM-0.1% FBS) durant 72 hores i, a continuació, es va determinar la seva capacitat de proliferació. Els resultats van demostrar que totes dues línies cel·lulars podien créixer en un medi suplementat amb una mínima quantitat de factors de creixement (DMEM-0.1% FBS) (figura 4.27), tot i que en menor grau que quan

s'addicionaven factors de creixement a la concentració òptima (DMEM-10% FBS), la qual cosa demostrava que l'expressió basal de factors de creixement permetia que les cèl·lules continuessin creixent tot i que l'aportació exògena de factors de creixement fos mínima.

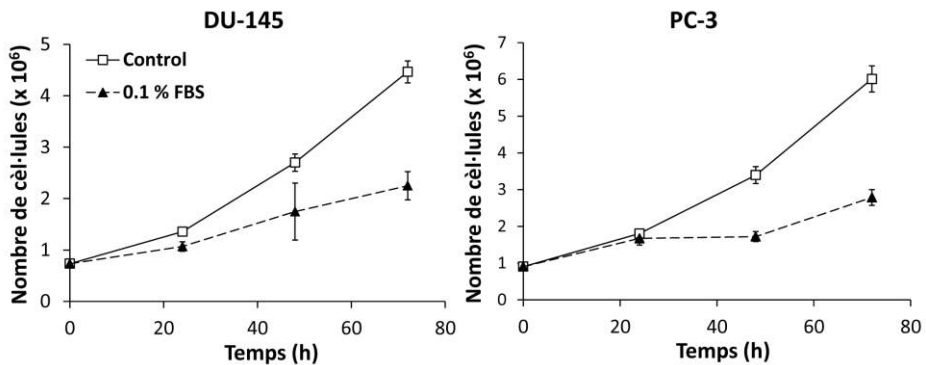


Figura 4.27. Capacitat de proliferar de les línies cel·lulars DU-145 i PC-3 en medi de cultiu suplementat a la concentració òptima o mínima de factors de creixement. Les cèl·lules es van deixar créixer en DMEM-10% FBS (control) i en DMEM-0.1% FBS, i passades 0, 24, 48 i 72 hores des de l'inici del tractament, el nombre de cèl·lules viables es va determinar fent un triple comptatge mitjançant el mètode d'exclusió de blau de tripà. Els resultats representen el valor de la mitjana \pm error estàndard de tres experiments realitzats independentment.

b) Sensibilitat de les cèl·lules de càncer de pròstata androgen-independents als inhibidors de l'EGFR

Seguidament, es va determinar la sensibilitat de les dues línies cel·lulars a tres fàrmacs inhibidors de la via HER-EGF: l'erlotinib i el gefitinib, dos TKI del receptor EGFR, i el cetuximab, un anticòs monoclonal dirigit contra el receptor EGFR.

A tal efecte, les dues línies cel·lulars es van tractar amb un rang de concentracions entre 0 – 15 μM pels dos TKI i entre 0 – 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pel cetuximab. La utilització d'aquests rangs era justificat ja que, en el cas dels TKI, la preparació de solucions a una concentració superior a 15 μM comportava la precipitació dels compostos. D'altra banda, la concentració màxima pel cetuximab va ser de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ja que una concentració superior hagués suposat la utilització d'un volum molt elevat de solució d'anticòs, la qual cosa podria haver afectat el creixement cel·lular.

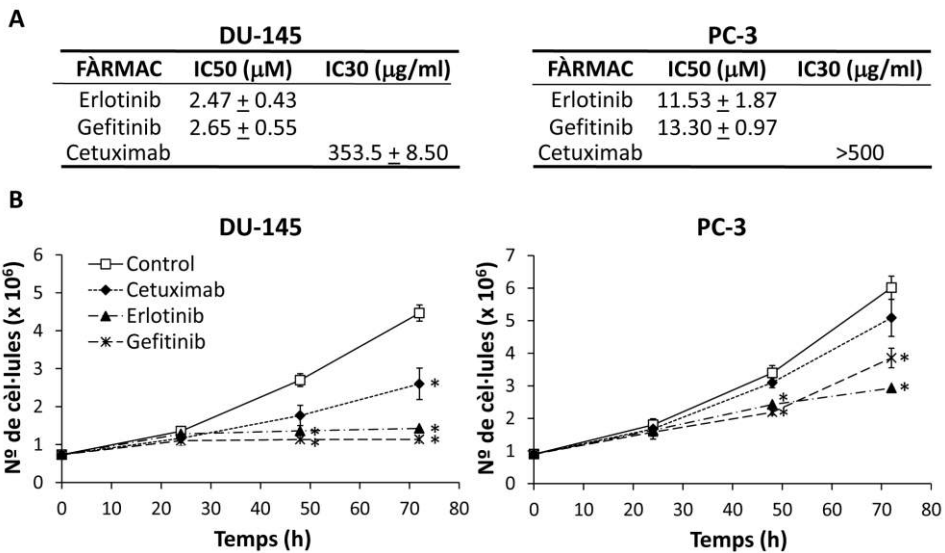


Figura 4.28. Sensibilitat de les línies cel·lulars DU-145 i PC-3 a l'erlotinib, el gefitinib i el cetuximab. A. Valors de IC₅₀ de l'erlotinib i el gefitinib i valor de IC₃₀ del cetuximab a les cèl·lules DU-145 i PC-3. Els valors representen la mitjana \pm error estàndard de tres experiments realitzats independentment. **B.** Efecte de l'erlotinib, el gefitinib i el cetuximab sobre el creixement de les cèl·lules DU-145 i PC-3. Els resultats representen el valor de la mitjana \pm error estàndard d'un mínim de tres experiments realitzats independentment.

El tractament de les cèl·lules amb aquestes concentracions va permetre determinar la IC_{50} per l'erlotinib i el gefitinib en ambdues línies i la IC_{30} pel cetuximab, ja que la dosi màxima utilitzada per aquest anticòs no va provocar una inhibició del 50% del creixement cel·lular en cap de les dues línies. Els resultats obtinguts van mostrar unes IC_{50} molt similars pels dos TKI en les cèl·lules DU-145, sent de $2.47 \pm 0.43 \mu\text{M}$ per l'erlotinib i de $2.65 \pm 0.55 \mu\text{M}$ pel gefitinib (figura 4.28, A). Per altra banda, en les cèl·lules PC-3 es van observar uns valors entre quatre i cinc vegades més elevats, ja que la IC_{50} de l'erlotinib va resultar ser $11.53 \pm 1.87 \mu\text{M}$ i la del gefitinib, $13.30 \pm 0.97 \mu\text{M}$. Pel què fa al cetuximab, els resultats van corroborar que les cèl·lules DU-145 eren més sensibles a aquests tractaments que les cèl·lules PC-3, ja que mentre per les primeres es va determinar un valor de IC_{30} de $353.5 \pm 8.5 \mu\text{g/mL}$, per les PC-3 la IC_{30} va resultar ser superior a $500 \mu\text{g/mL}$, ja que la concentració màxima utilitzada no va produir una disminució del 30% en el seu creixement.

Per corroborar la major sensibilitat de les cèl·lules DU-145 als fàrmacs, a continuació es va analitzar el seu efecte sobre la proliferació de les dues línies cel·lulars. Amb aquesta finalitat, les cèl·lules es van tractar durant 72 hores a la concentració màxima utilitzada per cadascun dels tres fàrmacs estudiats ($15 \mu\text{M}$ per l'erlotinib i el gefitinib i $500 \mu\text{g/mL}$ pel cetuximab). Els resultats van posar de manifest que el creixement de les cèl·lules DU-145 es veia molt afectat en ser tractades amb l'erlotinib i el gefitinib ja que, a les 72h, les cèl·lules creixien entre un 70 i un 75% menys, respectivament, que les cèl·lules control (figura 4.28, B). L'efecte del cetuximab en aquesta línia, però, va resultar ser més lleu ja que només va comportar una reducció del 40% del creixement cel·lular després de les 72h de tractament. Per altra banda, en la línia cel·lular PC-3 es va observar un efecte més moderat, ja que en ser tractades amb

l'erlotinib i el gefitinib, les cèl·lules van créixer entre un 50% i un 35% menys, respectivament, que les cèl·lules control, mentre que el cetuximab no va provocar canvis significatius en el creixement d'aquesta línia.

En conjunt, doncs, es va confirmar que les cèl·lules DU-145 són més sensibles a aquests fàrmacs que les cèl·lules PC-3. Aquests resultats són justificables considerant que les cèl·lules menys sensibles, les PC-3, tenen el gen de la PTEN inactiu ⁽²⁵⁷⁻²⁵⁹⁾. La PTEN és una proteïna supressora de tumors que inhibeix la via de la PI3K/Akt, una via de transducció de la senyal activada pel receptor EGFR. Quan aquest gen es troba inactiu, la via PI3K/Akt es manté activada independentment de la seva estimulació per mitjà dels receptors implicats ⁽²⁵⁷⁻²⁵⁹⁾. En aquest treball, es van confirmar aquests resultats previs estudiant l'expressió del gen de la PTEN mitjançant la tècnica de la PCR convencional, la qual cosa va demostrar que les cèl·lules PC-3 no expressen l'RNA del gen de la PTEN, però que les cèl·lules DU-145 són PTEN-positives (figura 4.29).

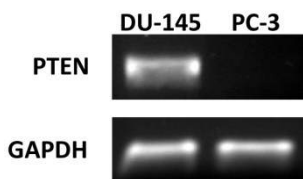


Figura 4.29. Expressió gènica de PTEN en les cèl·lules DU-145 i PC-3. El nivell de l'expressió gènica de PTEN va ser analitzada mitjançant la tècnica de la PCR semiquantitativa. Els resultats de la figura representen l'expressió del gen de la PTEN i del GAPDH (gen utilitzat com a control intern).

c) Efecte dels inhibidors de l'EGFR sobre el patró d'expressió dels receptors i lligands de la família HER-EGF

Seguidament, es va determinar si el tractament de les dues línies cel·lulars amb els dos TKI i amb el cetuximab induïa canvis en l'expressió gènica dels membres

de la família HER-EGF. Les cèl·lules es van tractar amb una concentració anàloga de la IC_{50} de l'erlotinib i el gefitinib, de la IC_{30} del cetuximab o amb vehicle sol com a control i, al cap de 24 hores, l'expressió gènica dels components de la família HER-EGF es va determinar mitjançant la tècnica de la PCR a temps real.

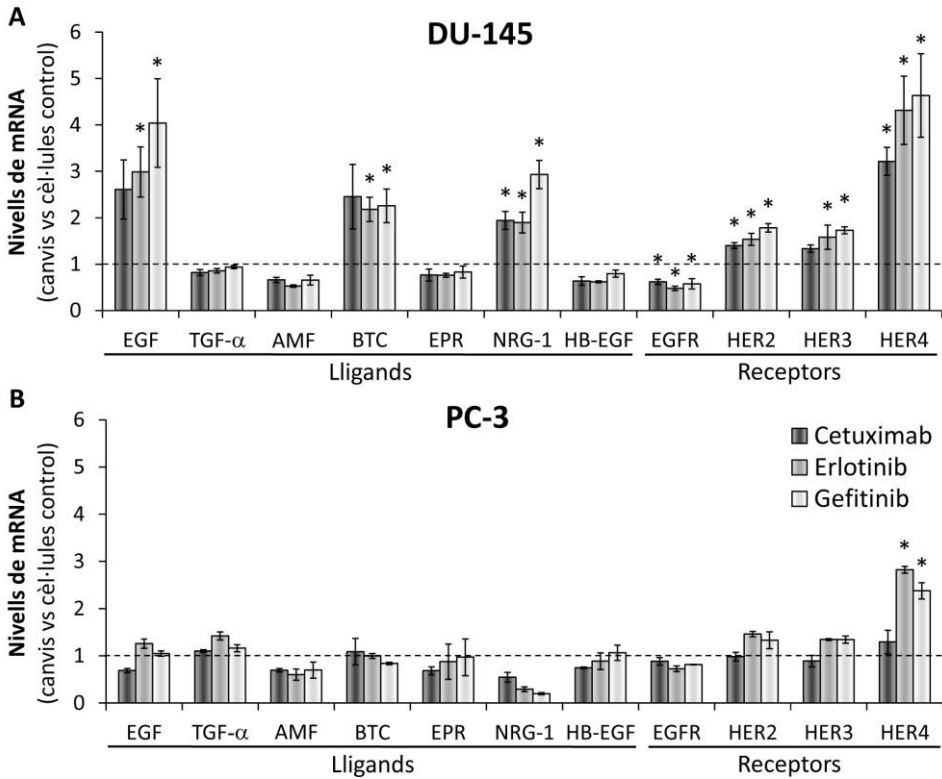


Figura 4.30. Canvis en els nivells d'expressió dels membres de la família HER-EGF en les línies cel·lulars DU-145 (A) i PC-3 (B) després del seu tractament amb cetuximab, erlotinib i gefitinib. Els resultats representen la mitjana \pm error estàndard d'un mínim de tres experiments realitzats independentment. El canvi en l'expressió de cada gen induït pels tractaments es va determinar fent la relació entre els valors normalitzats de les cèl·lules tractades i el corresponent valor normalitzat de les cèl·lules control. Les barres que es troben per sobre de la línia de punts indiquen un augment en l'expressió gènica deguda als tractaments en comparació amb les cèl·lules control, mentre que les barres que es troben per sota de la línia de punts representen una disminució en l'expressió gènica deguda als tractaments en comparació amb les cèl·lules control. (* $p < 0,05$ en relació a les cèl·lules control).

En general, els resultats van demostrar que el tractament amb els tres fàrmacs inhibidors del receptor EGFR induïa canvis significatius en el patró d'expressió de les cèl·lules DU-145 però que pràcticament no provocava variacions en el patró d'expressió de les cèl·lules PC-3 (figura 4.30). A més, també es va observar que l'efecte que induïen era molt similar, tot i que el gefitinib era el fàrmac que provocava els canvis més rellevants.

Els resultats demostraven que en inhibir el EGFR en la línia cel·lular DU-145 es produïa una sobreexpressió de l'EGF, la BTC i la NRG-1, tres lligands que presentaven una capacitat diferent per activar els receptors de la via; així, mentre l'EGF s'unia exclusivament a l'EGFR, la BTC podia activar tant l'EGFR com el HER4 ⁽²⁶⁰⁾ i la NRG-1 podia activar els receptors HER3 i HER4 ⁽²⁶¹⁾. D'altra banda, en aquesta línia no es van observar canvis a nivell de l'expressió gènica de la EPI, que era el lligand de la via que es trobava més sobreexpressat de forma basal (figura 4.30). Pel què fa als receptors, es va detectar un augment moderat en l'expressió de HER2 i HER3, una disminució en l'expressió del receptor EGFR i un augment important en l'expressió gènica del receptor HER4, que era entre quatre i cinc vegades superior als nivells observats inicialment. D'altra banda, i pel què fa a la línia cel·lular PC-3, els resultats van mostrar que només el receptor HER4 patia canvis significatius en la seva expressió degut al tractament amb els TKI, mostrant un augment en l'expressió del receptor entre dues i tres vegades superior com a resposta als tractaments. En relació a l'expressió de HER4 en ambdues línies cel·lulars, però, tot i l'important augment que s'havia observat degut als tractaments, els seus nivells d'expressió van continuar sent molt baixos en comparació amb la resta de receptors de la via.

En conjunt, els resultats obtinguts en aquest apartat van demostrar que les cèl·lules DU-145, que són PTEN-positives, tenien la capacitat d'adaptar el patró d'expressió gènica dels components de la via HER-EGF després d'inhibir el EGFR. Per altra banda, les cèl·lules PC-3, que tenien la via PI3K/Akt permanentment activada degut a la inactivació del gen regulador de la PTEN, pràcticament no van veure alterat el patró d'expressió dels components d'aquesta via, ja que podien mantenir el seu creixement independentment de l'activació dels receptors HER a través de la unió dels seus lligands.

d) Expressió dels receptors i lligands de la família HER-EGF en una línia DU-145 resistent a l'erlotinib

En l'experiment previ, havíem analitzat els canvis en els nivells d'expressió dels membres de la família HER-EGF en resposta al tractament agut (24h) de dues línies cel·lulars de PCa. A continuació, per tal d'analitzar si els canvis detectats a nivell de l'expressió gènica dels factors d'aquesta via en les cèl·lules DU-145 estaven involucrats en l'adquisició de resistència als tractaments, es va establir una línia cel·lular resistent a l'erlotinib (DUER). Amb aquesta finalitat, les cèl·lules parentals DU-145 es van fer créixer, inicialment, en presència d'una concentració d'erlotinib anàloga a la seva IC_{50} (2.5 μ M). Posteriorment, la concentració d'erlotinib al medi va anar-se augmentant, passant a ser 5 μ M un mes més tard, i 10 μ M 2 mesos després d'haver iniciat el tractament. Tres mesos després, les cèl·lules es van exposar a la concentració màxima utilitzada per aquest fàrmac (15 μ M), i es va mantenir aquest tractament durant tres mesos. Finalment, a partir del sisè més des de l'inici de l'exposició, la línia cel·lular DUER es va considerar resistent i es va procedir a fer la seva caracterització.

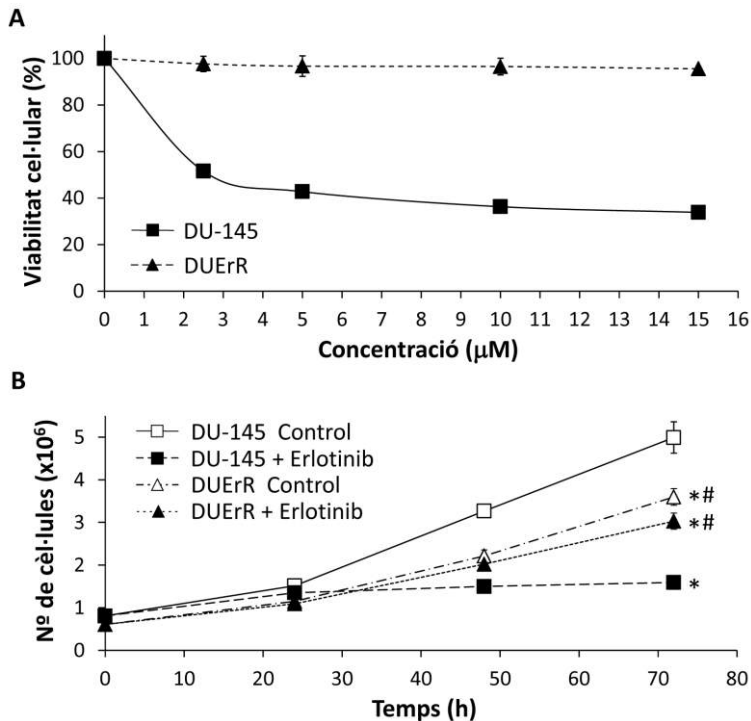


Figura 4.31. Perfil de creixement de les cèl·lules DU-145 i DUERr exposades a erlotinib. **A.** Viabilitat de les cèl·lules DU-145 i DUERr exposades a diferents concentracions d'erlotinib (0 – 15 µM) durant 72 hores. **B.** Efecte d'una concentració 15 µM de l'erlotinib (+ erlotinib) o de vehicle sol (control) en les cèl·lules DU-145 i DUERr. Els resultats representen el valor de la mitjana ± error estàndard d'un mínim de tres experiments realitzats independentment. (* P <0,05 vs les cèl·lules DU-145 control; # P <0,05 vs les cèl·lules DU-145 tractades amb erlotinib).

En primer lloc, es va avaluar la capacitat de la línia cel·lular DUERr de créixer en presència de diferents concentracions d'erlotinib en el medi i es va estudiar si presentava un creixement diferent respecte les cèl·lules parentals DU-145. Així, les cèl·lules DU-145 i DUERr es van tractar amb diferents concentracions d'erlotinib (entre 0 i 15 µM) i es va determinar la seva viabilitat mitjançant un assaig de MTT. Els resultats van confirmar que l'erlotinib no afectava el creixement de les cèl·lules DUERr, ja que mentre en les cèl·lules DU-145 parentals s'observava una important disminució en el seu creixement degut al

tractament amb diverses concentracions d'erlotinib, en les cèl·lules resistents pràcticament no s'observava cap efecte en la seva viabilitat com a conseqüència dels tractaments (figura 4.31, A). D'altra banda, es va analitzar la proliferació d'ambdues línies cel·lulars en presència d'una concentració 15 μ M d'erlotinib o amb vehicle sol, la qual cosa va confirmar que la proliferació de les cèl·lules resistents pràcticament no es veia afectada per la presència d'erlotinib en el medi (figura 4.31, B). A més, aquests resultats van mostrar que, al tornar-se resistents, el creixement de les cèl·lules DUER s'alentia en comparació amb el creixement de les cèl·lules DU-145 parentals, la qual cosa posava de manifest que en el procés de desenvolupament de la resistència, el creixement d'aquesta línia cel·lular es veia modificat.

Un cop es va haver confirmat que les cèl·lules DUER eren resistents a l'erlotinib es va determinar l'expressió gènica dels receptors i lligands de la via HER-EGF mitjançant la tècnica de la PCR a temps real en aquestes cèl·lules, i els seus resultats es van comparar amb els de la línia parental DU-145. Els resultats obtinguts van demostrar que, en les cèl·lules DUER, els nivells de mRNA de la NRG-1 i el TGF- α es trobaven significativament augmentats en comparació amb els de les cèl·lules DU-145 parentals mentre que, per l'HB-EGF, es va detectar una disminució en els seus nivells gènics (figura 4.32). D'altra banda, i pel que fa als receptors, es va observar que HER2 i HER3 pràcticament doblaven l'expressió determinada per la línia parental, que HER4 només patia un lleuger augment en la seva expressió i que EGFR mantenia uns nivells gènics pràcticament iguals que en les cèl·lules control (figura 4.32).

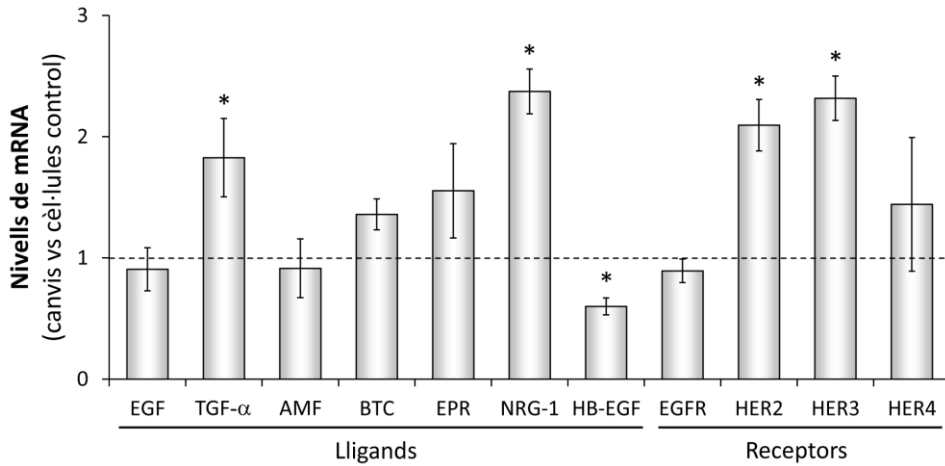


Figura 4.32. Canvis en els nivells d'expressió gènica dels membres de la família HER-EGF en la línia cel·lular DUERr. Els resultats representen la mitjana \pm error estàndard d'un mínim de tres experiments realitzats independentment. El canvi en l'expressió de cada gen en les cèl·lules DUERr es va determinar fent la relació entre els seus valors normalitzats i el corresponent valor normalitzat de les cèl·lules DU-145 control. Les barres que es troben per sobre de la línia de punts indiquen un augment en l'expressió gènica en comparació amb les cèl·lules control, mentre que les barres que es troben per sota de la línia de punts representen una disminució en l'expressió gènica en comparació amb les cèl·lules control (* $p < 0,05$ en relació a les cèl·lules control).

Aquests resultats es van confirmar a nivell proteic mitjançant la tècnica del western blott (figura 4.33). Així, tal i com s'havia observat a nivell gènic, en les cèl·lules DUERr es va detectar un augment en l'expressió proteica dels receptors HER2, HER3 i HER4, que va ser molt destacable per HER3. D'altra banda, en les cèl·lules DU-145 parentals tractades 48h amb erlotinib, es va observar una major expressió dels receptors HER2, HER3 i HER4 en comparació amb les cèl·lules DU-145 control; tot i això, aquest augment va ser més notable en la línia DUERr que en les cèl·lules DU-145 tractades amb erlotinib. Pel que fa al receptor EGFR, tot i que a nivell gènic en les cèl·lules DUERr l'expressió pràcticament no havia variat, a nivell proteic es va observar una major expressió d'aquest receptor en la línia resistent que en la línia DU-145 control. Aquest augment també es va detectar en les cèl·lules DU-145 tractades amb

erlotinib, tot i que, com en el cas dels altres tres receptors HER, l'augment va ser més notable en les cèl·lules resistents. Per últim, es va avaluar l'expressió proteica de la NRG-1 ja que era el lligand pel qual s'havia observat un augment més important en la seva expressió gènica; els resultats van confirmar que, tant en les cèl·lules DUERr com en les cèl·lules DU-145 tractades amb erlotinib, es produïa un increment en la seva expressió proteica en comparació amb les cèl·lules DU-145 control, la qual cosa concordava amb els resultats obtinguts a nivell de l'expressió gènica.

e) Activació dels receptors HER i de vies de senyalització intracel·lular en les línies DU-145 i DUERr

A continuació, es va analitzar l'activació dels receptors EGFR, HER2 i HER3 i les proteïnes de senyalització intracel·lular activades per aquests receptors Akt i ERK1/2, en les cèl·lules DU-145, les cèl·lules DUERr i les cèl·lules DU-145 tractades amb erlotinib. Tal i com s'observa en la figura 4.33, el tractament amb erlotinib va inhibir la fosforilació del receptor EGFR tant en les cèl·lules DU-145 com en les cèl·lules DUERr. Pel què fa a la línia DUERr, es van detectar uns nivells més elevats de HER3 fosforilat, Akt fosforilada i ERK1/2 fosforilada, molt especialment d'Akt, que és una via de transducció de la senyal activada principalment per HER3 ^(190,262,263). Per altra banda, el tractament agut de les cèl·lules DU-145 no va provocar un augment en la fosforilació de HER2, HER3 i HER4, tot i que sí que va induir un augment en els nivells totals d'aquests receptors. Així, l'activació de HER3 només es va observar en la línia que podia créixer en presència de erlotinib, mostrant que l'activació d'aquest receptor era un possible mecanisme de resistència als inhibidors de l'activitat tirosina quinasa de l'EGFR en el PCa.

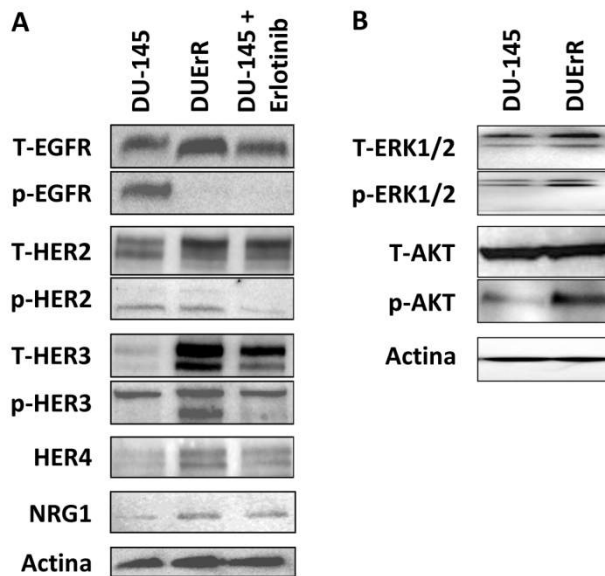


Figura 4.33. Expressió i activació dels receptors HER i de proteïnes implicades en vies de transducció de la senyal a les cèl·lules DU-145 i DUERr. A partir de la mateixa quantitat de llistats proteics de les cèl·lules DU-145 control (DU-145) o tractades amb 2.5 μ M d'erlotinib (DU-145+erlotinib) i de les cèl·lules DUERr, es va analitzar per Western Blott els nivells dels receptors HER i de la NRG-1 (**A**) i de les proteïnes ERK1/2 i Akt (**B**) totals o fosforilats utilitzant els anticossos descrits a materials i mètodes. Els nivells d'actina van ser utilitzats com a control de càrrega.

f) Efecte del bloqueig dels receptors HER2 i HER3 i de la NRG-1 sobre el creixement cel·lular

Per tal d'avaluar la importància de HER2 i de HER3 en el manteniment de la proliferació cel·lular en absència de l'activació de l'EGFR, les cèl·lules DU-145 parentals i les cèl·lules DUERr es van exposar a dos anticossos bloquejants dels receptors HER2 i HER3 (el trastuzumab i l'anticòs H3.105.5, respectivament) a una concentració de 10 μ g / ml durant 72 hores⁽²⁶⁴⁾, en presència o en absència de l'erlotinib.

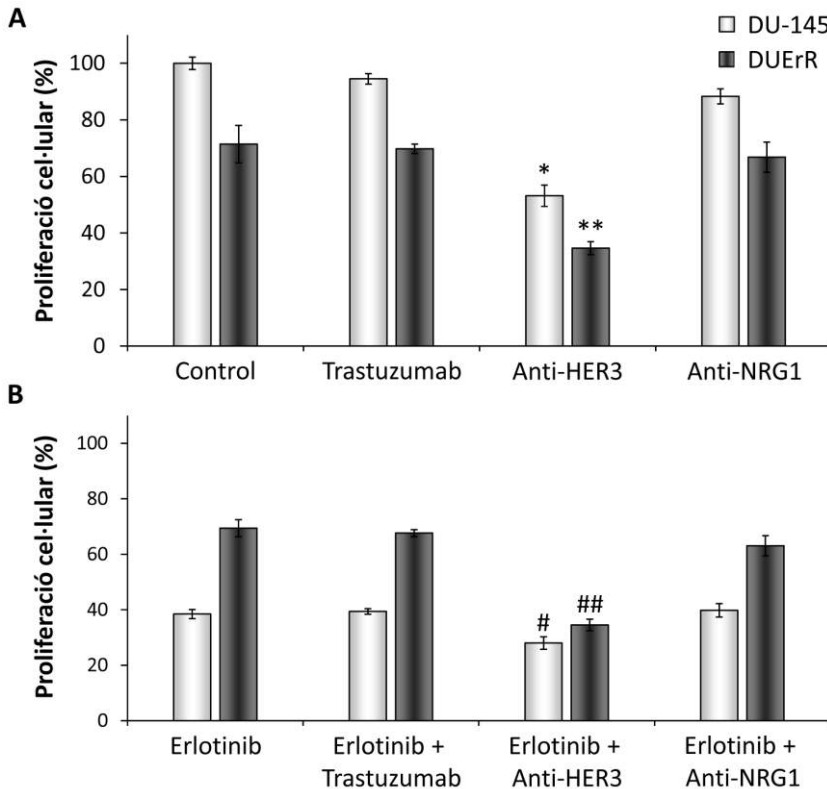


Figura 4.34. Efecte del bloqueig dels receptors EGFR, HER2 i HER3 i de la NRG-1 en les cèl·lules DU-145 i DUER. Les cèl·lules DU-145 i DUER van ser tractades amb anticossos dirigits contra el receptor HER2 (trastuzumab), HER3 (anti-HER3) o la neuregulina-1 (anti-NRG1) sols (A) o en combinació amb l'erlotinib (B). Els resultats representen la mitjana \pm error estàndard d'un mínim de tres experiments realitzats independentment. (* $p < 0,05$ en relació a les cèl·lules DU-145 control; ** $p < 0,05$ en relació a les cèl·lules DUER control; # $p < 0,05$ en relació a les cèl·lules DU-145 tractades amb erlotinib; ## $p < 0,05$ en relació a les cèl·lules DUER tractades amb erlotinib).

Els resultats van demostrar que la inhibició de HER2 no influïa en el creixement cel·lular de cap de les dues línies, en absència ni en presència de l'erlotinib (figura 4.34). D'altra banda, però, el tractament amb l'anticòs dirigit contra HER3 va inhibir el creixement de les dues línies cel·lulars de forma significativa (figura 4.34 A), la qual cosa va demostrar que aquest receptor tenia un paper molt important en la proliferació d'aquestes cèl·lules. A més, el bloqueig de

HER3 en combinació amb l'erlotinib va induir una disminució en el creixement de les cèl·lules DU-145 parentals que va resultar ser un 25% superior que la produïda pel tractament amb erlotinib sol en aquestes mateixes cèl·lules.

En les cèl·lules DUErR, el bloqueig de HER3 i EGFR va provocar un creixement un 50% inferior que l'observat en fer el tractament amb erlotinib sol. Aquests resultats van demostrar que, en inhibir-se els dos receptors, el creixement de la línia resistent i el de les cèl·lules DU-145 parentals era molt similar, la qual cosa indicava que el bloqueig del receptor HER3 permetia restaurar l'efecte citotòxic de l'erlotinib en aquesta línia resistent. Aquests resultats, confirmaven la importància de HER3 en el manteniment de la proliferació de les cèl·lules de pròstata en inhibir-se el receptor EGFR.

D'altra banda, també es va avaluar l'efecte del bloqueig de la NRG-1 sobre el creixement de les cèl·lules DU-145 i DUErR, ja que s'havia demostrat prèviament que la seva expressió gènica i proteica incrementava en el tractament agut amb erlotinib de les cèl·lules DU-145 així com, també, en les cèl·lules DUErR. Els resultats (figura 4.34) van demostrar que després d'incubar les cèl·lules amb un anticòs dirigit contra la NRG-1, només s'observava una reducció moderada en la proliferació cel·lular d'ambdues línies. Aquests resultats indicaven que la NRG-1 tenia un paper relatiu en la supervivència de les cèl·lules de PCa.

Anàlisi de la vehiculització
de compostos metàl·lics
com a agents antitumorals
i de la família HER-EGF en la
resistència als tractaments
oncològics

5 Discussió

5.1 Vehiculització de compostos metàl·lics com a nova estratègia antitumoral

La vehiculització de fàrmacs antineoplàstics a l'interior de les cèl·lules tumorals és una estratègia de gran interès en la recerca oncològica actual. La primera part d'aquesta tesi s'ha centrat en la síntesi i caracterització de compostos metàl·lics units a dos portadors biològics, l'octreotide i l'àcid fòlic, amb la finalitat de conferir-los selectivitat vers a cèl·lules canceroses que sobreexpressen els seus receptors.

5.1.1 Vehiculització de compostos metàl·lics de Pt(II), Ru(II) i Os(II) a través de la unió a anàlegs de l'octreotide

L'octreotide és un pèptid anàleg de la STT que és més estable en sèrum que el seu precursor i que té una elevada afinitat pel receptor SSTR2, el receptor de la SST que es troba més sobreexpressat en les cèl·lules tumorals i que internalitza després de la unió amb el pèptid ^(98,107). Aquestes característiques han potenciat el desenvolupament de diferents conjugats de l'octreotide amb radioisòtops i agents quimioterapèutics pel diagnòstic i tractament de determinats tipus de tumors ⁽⁹⁸⁾. Considerant aquests antecedents, en aquesta tesi ens hem proposat utilitzar l'octreotide com a agent vehiculitzador de diferents complexos que contenen metalls en la seva estructura (Pt(II), Ru(II) i Os(II)) i que tenen potencial activitat citotòxica. Per l'estudi, s'han sintetitzat un total de 7 conjugats constituïts per complexos metàl·lics i per l'octreotide o un anàleg dicarba d'aquest pèptid, els conjugats **Cj1**, **Cj2**, **Cj3**, **Cj4**, **Cj5**, **Cj6** i **Cj7**.

El primer conjugat sintetitzat, el conjugat **Cj1**, està constituït per l'octreotide i pel complex metàl·lic **Cx5**. La utilització d'aquest complex de Pt(II) ha resultat interessant ja que té un grup carboxil que permet fer la unió a l'octreotide a través de la formació d'un enllaç amida i perquè, a més, al tenir una estructura semblant a la del cisplatí, s'esperava que el seu mecanisme d'acció fos similar al d'aquest fàrmac.

L'estudi d'aquest conjugat ha demostrat que té unes propietats que dificulten la seva utilització en clínica. En primer lloc, no s'ha pogut corroborar de forma inequívoca la síntesi del conjugat **Cj1** ja que, degut a que l'octreotide té dues funcions amino en la seva estructura (una a l'extrem *N*-terminal del pèptid i l'altra a la cadena lateral de la Lys₉), la unió al complex metàl·lic pot donar lloc a dos regioisòmers diferents, dels quals, només el que es troba unit al grup amino de l'extrem *N*-terminal proporcionaria el conjugat desitjat; l'HPLC del producte final ha demostrat que el complex metàl·lic s'uneix a l'octreotide, però la caracterització posterior no ha permès confirmar si es tracta del conjugat **Cj1** o d'una barreja dels dos conjugats possibles. D'altra banda, s'ha demostrat que és un compost amb una alta inestabilitat en medi aquós, la qual cosa s'ha relacionat amb l'elevada preferència cinètica dels complexos de platí per unir-se a les espècies que contenen sulfurs ^(265,266); aquesta propietat hauria comportat que el complex interaccionés amb el pont disulfur de l'octreotide i facilités la seva degradació. En conjunt, aquests resultats han provocat que es descartés aquest compost com a candidat a fàrmac antitumoral i que s'abandonés l'estudi de l'octreotide natiu com a transportador de complexos metàl·lics.

Tot i això, considerant que l'octreotide té qualitats adequades com a agent vehiculitzador, s'ha seguit treballant en la síntesi de conjugats constituïts per anàlegs estructurals de l'octreotide més estables que la molècula nativa i amb

una bona afinitat pel receptor SSTR2. En aquest sentit, s'han utilitzat dos anàlegs estructurals de l'octreotide en els quals la funció disulfur s'ha substituït per un grup isòster de tipus -CH=CH- o $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, ja que estudis anteriors havien demostrat que conserven una elevada afinitat d'unió al receptor SSTR2 ⁽²⁴³⁾. En aquests conjugats també s'ha introduït una cadena espaciadora entre el complex metàl·lic i el pèptid amb la finalitat de mantenir allunyades les dues molècules i evitar alteracions en l'estructura del pèptid. L'elecció d'aquestes molècules, a més, permet modular propietats del conjugat com la solubilitat en medi aquós, que és una característica molt important a l'hora de determinar la viabilitat terapèutica dels fàrmacs en estudi.

El següent conjugat sintetitzat, el **Cj2**, està constituït pel complex **Cx5**, l'àcid δ -aminobutíric i el pèptid **P2**, un anàleg dicarba de l'octreotide que conté el grup -CH=CH- . La caracterització química d'aquest conjugat ha demostrat que és una molècula amb una baixa solubilitat, fet atribuïble a la unió del complex metàl·lic al pèptid i a la presència de l'àcid δ -aminobutíric, ja que és una molècula de naturalesa hidrofòbica. Els resultats també han indicat que el canvi pel grup -CH=CH- i la introducció de l'espaiador milloren molt l'estabilitat general del producte final, ja que en solució aquosa s'observa una menor formació de les espècies mono i diaquo del compost i en una solució aquosa 150 nM de NaCl aquestes espècies no es detecten, la qual cosa demostra que el mecanisme d'activació d'aquest conjugat depèn, com en el cisplatí ⁽²²⁾, de la concentració de ions clorur en el medi. A més, també s'ha demostrat que el conjugat **Cj2** té la capacitat d'unir-se al DNA a través de la formació d'uns adductes molt similars als que s'han descrit pel cisplatí i per altres complexos de platí ⁽²⁶⁷⁾.

Considerant aquests resultats, s'ha decidit avaluar l'activitat citotòxica del conjugat **Cj2** i de les dues molècules que el constitueixen, el pèptid **P2** i el complex metàl·lic **Cx1**, en la línia cel·lular de càncer de mama humà MCF-7.

Estudis previs i els nostres propis estudis han demostrat que les cèl·lules MCF-7 sobreexpressen el receptor SSTR2⁽²⁶⁸⁾, el principal receptor responsable de la internalització de la somatostatina i els seus anàlegs a l'interior de les cèl·lules⁽¹¹⁰⁾, per la qual cosa, s'ha considerat que és una línia adient per tal de dur a terme aquests experiments. Els resultats han posat de manifest que el conjugat **Cj2** i el pèptid **P2** són inactius en aquesta línia cel·lular i que el complex metàl·lic **Cx1** és actiu a concentracions elevades, ja que la seva IC₅₀ ha resultat ser unes 22 vegades superior a la detectada pel cisplatí en aquesta mateixa línia.

Aquests resultats han demostrat que la unió del complex metàl·lic al pèptid provoca una pèrdua en l'activitat del complex que no es veu compensada per una major entrada del conjugat a l'interior de les cèl·lules. Aquesta manca d'activitat és atribuïble, d'una banda, al fet que la unió pot induïr canvis en el complex metàl·lic que impedeixin la seva interacció amb la diana biològica i que provoquin la pèrdua de la seva activitat inicial. D'altra banda, també s'ha relacionat amb l'afinitat que presenta el pèptid **P2** pel receptor SSTR2 ja que, tot i que aquest pèptid manté una certa afinitat pel receptor⁽²⁴³⁾, aquesta afinitat no seria prou elevada o podria haver disminuït com a conseqüència de la unió al complex metàl·lic. En definitiva, la manca d'activitat citotòxica del conjugat **Cj2** ha promogut que no es realitzessin més estudis amb aquest compost, que es descartés la seva utilització com a agent antitumoral i que s'abandonés l'estudi de l'anàleg d'octreotide **P2** com a pèptid vehiculitzador.

A partir d'aquests resultats, s'han sintetitzat altres conjugats amb l'objectiu de millorar les propietats del conjugat **Cj2**. En aquest sentit, el conjugat **Cj3** s'ha sintetitzat utilitzant el pèptid **P3**, un anàleg dicarba de l'octreotide que presenta una afinitat més elevada pel receptor SSTR2⁽²⁴³⁾. La caracterització d'aquest conjugat ha demostrat que té una baixa solubilitat en aigua, la qual

cosa ha dificultat l'avaluació de la seva activitat biològica i ha provocat que es descartés la seva utilització en assaigs posteriors. Amb l'objectiu de millorar aquesta solubilitat, en els següents conjugats s'ha utilitzat com a molècula espaciadora el polietilenglicol, ja que és un bon modulador de fàrmacs basats en pèptids i proteïnes que permet millorar algunes de les seves propietats com, per exemple, la solubilitat ^(269,270).

En total s'han sintetitzat quatre conjugats constituïts pel pèptid **P3**, el PEG i per complexos metàl·lics de platí, ruteni i osmi. Com a complex de Pt(II) s'ha continuat treballant amb el complex **Cx5**, ja que s'ha volgut millorar la citotoxicitat del conjugat **Cj2** unint aquest complex a un pèptid amb una major afinitat pel receptor SSTR2. Pel què fa el conjugat d'osmi, s'ha utilitzat un derivat del complex $[(\eta^6\text{-bip})\text{Os}(\text{pico})\text{Cl}]$, el $[(\eta^6\text{-bip})\text{Os}(4\text{-CO}_2\text{-pico})\text{Cl}]$, ja que té una activitat prometedora en línies cel·lulars de càncer d'ovari humà ^(271,272). Pel què fa als complexos de Ru(II), s'han utilitzat dos complexos diferents: el $\{[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2\}$, que és un areno-complex de Ru(II) amb l'estructura general $[(\eta^6\text{-areno})\text{RuCl}(\text{XY})]^+$ (on XY és una lligand quelant com l'etilendiamina), i el $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2][\text{PF}_6]$, un areno-complex de Ru(II) amb l'estructura $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{RuCl}(\text{Im-Ph})(\text{PPh}_3)]$ (on Im-Ph és 1-fenil-imidazol). El complex $\{[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2\}$ és interessant ja que s'havia demostrat prèviament que aquests complexos tenen una elevada activitat citotòxica en línies cel·lulars de càncer d'ovari humà i formen adductes monofuncionals amb bases nitrogenades del DNA ⁽⁸⁴⁾. D'altra banda, s'ha utilitzat l'areno-complex $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2][\text{PF}_6]$ ja que assaigs previs havien demostrat que els complexos amb un lligand heteroaromàtic i un lligand fosfina en lloc d'un lligand quelant tenen molt bona activitat citotòxica en línies cel·lulars humanes de leucèmia ⁽²⁷³⁾.

L'estudi de la solubilitat dels conjugats **Cj4**, **Cj5**, **Cj6** i **Cj7** ha demostrat que són més solubles en dissolucions aquoses que els conjugats estudiats amb anterioritat, la qual cosa s'ha atribuït a la major hidrofilitat de la cadena de PEG. D'altra banda, s'ha estudiat l'activació dels conjugats mitjançant la hidròlisi de l'enllaç M-Cl en medi aquós ja que, en general, l'activitat citotòxica dels fàrmacs anticancerosos basats en metalls de transició està relacionada amb els processos que intervenen en la seva activació en medis aquosos i que generen les espècies aquo que promouen la interacció dels complexos metàl·lics (o els conjugats dels quals formen part) amb la seva diana biològica (58,84,242,271,274). Aquest assaig també ha permès determinar l'estabilitat dels fàrmacs en aquestes condicions, una característica fonamental per tal de garantir la continuïtat d'aquestes teràpies en el desenvolupament clínic. La capacitat d'hidròlisi de l'enllaç M-Cl s'ha analitzat en solucions aquoses amb diferents concentracions de clorur amb l'objectiu d'imitar les condicions fisiològiques del plasma sanguini, el citoplasma cel·lular i el nucli cel·lular. Actualment, es coneix que la hidròlisi de l'enllaç M-Cl de la majoria de complexos metàl·lics no es produeix a l'espai extracel·lular on la concentració de clorur és alta (100 mM), sinó que el fàrmac arriba a l'interior de la cèl·lula en la seva forma inactiva i és en aquest espai intracel·lular on es troben unes concentracions menors de clorur (4 i 22,7 mM, al nucli i al citoplasma cel·lulars, respectivament) que promouen la formació de les espècies aquo més reactives (275). La utilització d'aquestes concentracions de clorur permet corroborar en quines condicions s'hidrolitza l'enllaç M-Cl i preveure en quina localització s'activarà el compost. En aquest experiment, pel conjugat **Cj4** s'ha detectat una major hidròlisi en les concentracions més baixes de clorur, la qual cosa ha suggerit que aquest conjugat s'activaria a l'interior del nucli cel·lular però que es trobaria inalterat en el citoplasma cel·lular i en el plasma sanguini. Pel conjugat **Cj5** s'han obtingut uns resultats similars, ja que s'ha demostrat que

pot ser activat selectivament a l'interior del nucli cel·lular mentre que, fora del nucli, es trobaria majoritàriament en la seva forma neutra no reactiva. Aquests resultats, que ja havien estat observats amb anterioritat per diversos complexos d'osmi⁽²⁷²⁾, han demostrat que la unió al pèptid **P3** no interfeix en l'activació d'aquests tipus de complexos i que l'espècie activa formada no reacciona amb l'estructura del pèptid. D'altra banda, s'ha demostrat que la hidròlisi del conjugat **Cj6** es pot produir a l'espai extracel·lular, el citoplasma i al nucli, fet que podria provocar que interaccionés amb altres molècules abans d'arribar al nucli i que, per tant, la seva activitat no depengués de la unió al DNA o que fos desactivat a través d'alguna d'aquestes interaccions. Per últim, pel conjugat **Cj7** no s'ha observat la hidròlisi de l'enllaç M-Cl, per la qual cosa es podria esperar que la seva activitat no depengués de la unió amb el DNA.

La caracterització dels conjugats ha prosseguit analitzant la seva capacitat de formar adductes amb el DNA. En primer lloc, s'ha confirmat que l'activitat dels conjugats **Cj4**, **Cj5** i **Cj6** és atribuïble a l'acció realitzada sobre el DNA, ja que s'ha observat que poden unir-se a la seqüència oligonucleotídica. Aquesta conjugació, però, és diferent pel conjugat **Cj4** que pels conjugats **Cj5** i **Cj6**, ja que mentre el primer forma un adducte entre les dues guanines de l'oligonucleòtid, pels conjugats **Cj5** i **Cj6** s'ha observat la formació d'un adducte monofuncional entre el fragment del metall del conjugat i la guanina de la posició G4 de la seqüència nucleofílica. Aquests resultats corroboren resultats previs obtinguts per alguns areno-complexos de ruteni^(86,276,277) i per complexos d'osmi que tenen el lligand picolinat⁽⁹²⁾, els quals demostraven la seva interacció amb el DNA a través de l'àtom metàl·lic. Pel què fa al conjugat **Cj7**, tal i com es podia esperar considerant que no es produeix la hidròlisi de l'enllaç Ru-Cl, no s'ha observat la formació d'un adducte entre aquest conjugat i la seqüència oligonucleotídica, la qual cosa corrobora que la diana d'aquest

conjugat de ruteni no és el DNA. No obstant això, no es pot descartar que el conjugat **Cj7** actui en condicions fisiològiques coordinant-se a residus de sofre que es troben en els aminoàcids del centre actiu d'algunes proteïnes, com la catepsina N ⁽⁸⁷⁾ o el glutatió S-transferasa ⁽⁸⁸⁾, com s'ha descrit per altres complexos metàl·lics de ruteni.

En conjunt, aquests resultats han indicat que tots els compostos són solubles en medi aquós i que la hidròlisi de l'enllaç M-Cl té molta importància en la unió del metall amb la molècula de DNA, ja que els conjugats que hidrolitzen el seu enllaç són els que s'uneixen a la seqüència oligonucleotídica. També han demostrat que les espècies aquo d'aquests conjugats tenen preferència per unir-se a les bases de guanina de l'oligonucleòtid, sobretot per les que es troben situades a l'extrem 5' de la seqüència GG.

Un cop realitzada la caracterització d'aquests conjugats, s'ha procedit a fer la seva avaluació biològica. En primer lloc, s'ha analitzat la capacitat del pèptid **P3** d'internalitzar en les cèl·lules tumorals per tal de confirmar les seves propietats com a agent vehiculitzador. Estudis previs amb l'octreotide (pèptid **P1**) i el pèptid **P3** havien apuntat que l'afinitat d'unió d'aquest anàleg pels receptors SSTR2, SSTR4 i SSTR5 era menor que l'observada per l'octreotide. Aquesta disminució, però, no era tant important pel receptor SSTR2 com per la resta de receptors, ja que la introducció del grup isostèric CH₂ - CH₂ provocava que l'afinitat d'unió disminuís unes 23 vegades, aproximadament, pel receptor SSTR2, unes 36 vegades pel receptor SSTR4 i unes 48 vegades pel receptor SSTR5 ^(110,243). Tot i això, el pèptid **P3** continuava mantenint una alta afinitat d'unió al receptor SSTR2 (44 nM), la qual cosa assenyalava que podia fer la funció de transportador de conjugats metàl·lics a través de la seva unió a aquest receptor. Per tal de determinar la capacitat d'internalitzar del pèptid **P3**,

les cèl·lules MCF-7 s'han tractat amb el pèptid **P3** marcat amb fluoresceïna (el pèptid **P3-F**). Els resultats han confirmat que el pèptid internalitza en les cèl·lules tumorals formant unes vesícules que es localitzen al citoplasma de les cèl·lules i al nucli cel·lular. Aquestes observacions concorden amb les d'estudis anteriors que havien avaluat la capacitat d'internalitzar de l'octreotide i havien descrit la capacitat d'alguns anàlegs de la somatostatina de poder acumular-se en el nucli cel·lular ^(278,279); aquest mecanisme, però, encara està per elucidar. Aquests resultats s'han confirmat quantitativament per citometria de flux, el què ha demostrat que el pèptid **P3** segueix una cinètica d'internalització paral·lela a la de l'octreotide i que té una bona capacitat d'internalització, tot i que és menor a la de l'octreotide degut a la seva menor afinitat pels SSTR ^(110,243).

La capacitat del pèptid **P3** d'actuar com a agent vehiculitzador s'ha corroborat demostrant que el conjugat **Cj7** permet acumular més ruteni a l'interior de les cèl·lules MCF-7 que el complex metàl·lic **Cx3** quan es troba lliure. Així, s'ha posat de manifest que la unió entre el pèptid **P3** i el complex metàl·lic té un efecte positiu en la internalització d'aquest compost. En definitiva, tots aquests resultats han constatat que el pèptid **P3** internalitza a l'interior de les cèl·lules tumorals, tot i que amb una capacitat menor que la de l'octreotide, i han confirmat que és un bon transportador de complexos metàl·lics.

A continuació, s'ha determinat l'activitat antitumoral dels conjugats **Cj4**, **Cj5**, **Cj6** i **Cj7** en la línia cel·lular MCF-7. Els resultats han demostrat que dels 4 conjugats sintetitzats, només el conjugat **Cj7** té activitat citotòxica i que, a més, aquesta activitat és moderada si es compara amb l'obtinguda pel cisplatí en aquesta línia. També s'ha estudiat l'activitat citotòxica dels corresponents complexos metàl·lics que conformen els conjugats **Cj4**, **Cj6** i **Cj7**, fet que ha indicat que només dos d'aquests complexos són actius en aquesta línia

cel·lular: el complex **Cx1** i el complex **Cx3**, que és el complex que forma part del conjugat **Cj7** i que ha demostrat tenir una activitat citotòxica molt similar a l'obtinguda pel cisplatí. A més, cal tenir present el complex d'osmi **Cx4** ja que tot i que no ha sigut analitzat en aquest treball, estudis previs havien demostrat una activitat citotòxica moderada per aquest complex en dues línies cel·lulars de carcinoma d'ovari ⁽²⁴²⁾, per la qual cosa es podria preveure que aquest complex seria actiu en aquesta línia cel·lular i que la manca d'activitat observada pel conjugat **Cj5** hauria de ser atribuïble al fet d'haver unit aquest complex al pèptid **P3**. D'altra banda, i pel què fa al conjugat **Cj6** i el complex **Cx2**, cap dels dos compostos ha demostrat tenir activitat citotòxica; aquests resultats es poden atribuir a la ràpida hidròlisi detectada per l'enllaç Ru-Cl en el conjugat **Cj6**, ja que això pot provocar la desactivació d'aquests compostos com a conseqüència de la seva interacció amb altres molècules i impedir que duguin a terme una acció letal sobre les cèl·lules.

L'anàlisi de la citotoxicitat d'aquests compostos juntament amb els obtinguts pel conjugat **Cj2** han demostrat que, per tal que els conjugats siguin eficaços com a agents antitumorals, és molt important que el complex metàl·lic del conjugat tingui una elevada activitat citotòxica quan es troba lliure. També s'ha demostrat que la síntesi dels conjugats provoca una disminució en l'activitat citotòxica inicial del complex metàl·lic, la qual cosa es podria relacionar amb un efecte inhibidor del pèptid sobre el fragment metàl·lic i la seva diana biològica. La unió del pèptid al complex metàl·lic també pot provocar canvis en la conformació inicial del pèptid que es podrien traduir en una pèrdua de l'afinitat pels receptors SSTR; en aquest sentit, estudis previs havien demostrat que en la unió de l'octreotide als receptors de la somatostatina hi juguen un paper essencial els aminoàcids Phe⁷-Trp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰ de la seva estructura, ja que permeten adoptar una conformació en làmina β que és fonamental perquè

aquest pèptid es pugui unir als SSTR^(102,110,280-283). En el cas del pèptid **P3** s'havia demostrat que, tot i que el canvi del pont disulfur pel grup $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ no provoca alteracions importants en l'estructura secundària de la zona activa del pèptid, sí que afecta alguns aminoàcids de la seva seqüència⁽²⁸²⁾, fet que s'ha relacionat amb la menor afinitat que presenta aquest pèptid pels receptors SSTR⁽²⁴³⁾. Tenint en compte aquesta informació prèvia, s'ha analitzat per ressonància magnètica nuclear si la unió covalent dels complexos metàl·lics al pèptid **P3** a través del grup PEG afecta la conformació activa del pèptid (resultats no mostrats). Amb aquest estudi s'ha demostrat que en cap dels conjugats s'observa una alteració important en l'estructura global del pèptid però que, tot i això, els lligands aromàtics dels conjugats **Cj5** i **Cj6** tenen una certa tendència a interaccionar amb les cadenes laterals més pròximes del pèptid. Aquest fet, que s'ha vist afavorit per l'alta flexibilitat de la cadena espaciadora de PEG, provoca que el pèptid pugui adquirir diverses conformacions que presenten una menor afinitat pels SSTR i que poden dificultar la disponibilitat del complex metàl·lic a l'hora d'actuar sobre la seva diana terapèutica. Els resultats observats en l'acumulació de ruteni del conjugat **Cj7** i del complex de ruteni **Cx3**, però, han demostrat que el dicarba-anàleg de l'octreotide **P3** continua mantenint l'habilitat d'internalitzar els complexos metàl·lics després d'haver fet la seva conjugació, fet que confirma que manté afinitat pel receptor SSTR2.

Tot seguit, s'ha comprovat la capacitat del complex **Cx3** d'unir-se al DNA per tal de determinar si la unió amb el pèptid hi influeix. Els resultats han demostrat que el complex **Cx3** no interacciona amb el DNA plasmídic, la qual cosa ha permès concloure que ni el complex metàl·lic més actiu en les cèl·lules MCF-7 ni l'únic conjugat actiu en aquesta línia duen a terme la seva acció unint-se al

DNA. Aquests resultats deixen la porta oberta a estudiar el mecanisme d'acció d'aquests dos compostos, que podria basar-se en la unió a residus de sofre d'alguns aminoàcids que es troben en el centre actiu de determinades proteïnes^(87,88) o altres mecanismes que encara estiguin per elucidar.

En aquest treball també s'ha analitzat si la disminució de l'activitat antiproliferativa del **Cj7** en comparació amb el complex **Cx3** es veu compensada amb una distribució més efectiva i eficient del conjugat per les cèl·lules diana. Així, s'ha determinat l'activitat citotòxica del conjugat **Cj7** en la línia de carcinoma de pròstata DU-145 i en la línia cel·lular no tumoral CHO, per tal de comprovar la selectivitat d'aquest conjugat per les cèl·lules tumorals. Els resultats han demostrat que les cèl·lules DU-145 són més sensibles a aquest compost que les cèl·lules MCF-7 i les cèl·lules CHO; aquesta major sensibilitat, però, no s'ha relacionat amb una major activitat del complex metàl·lic **Cx3**, ja que les cèl·lules més sensibles a aquest complex han resultat ser les MCF-7. L'anàlisi de l'expressió del receptor SSTR2 en les tres línies ha posat de manifest que les cèl·lules que presenten una major expressió del receptor SSTR2 són les cèl·lules DU-145, seguides per les cèl·lules CHO i, per últim, les cèl·lules MCF-7. Així, s'ha confirmat que les cèl·lules que tenen una major expressió del receptor SSTR2 són les més sensibles al **Cj7**, mentre que les que presenten una expressió més baixa són les que tenen una IC_{50} més elevada. També s'ha observat una acció més important del conjugat **Cj7** sobre les cèl·lules tumorals, ja que tot i que els nivells d'expressió del SSTR2 són similars per les cèl·lules DU-145 i per les cèl·lules CHO, el conjugat ha mostrat un major efecte citotòxic en la línia tumoral DU-145. Cal destacar, a més, que s'ha detectat una expressió important del SSTR2 en la línia no tumoral CHO; treballs previs havien descrit que aquestes cèl·lules tenen una baixa expressió d'aquest receptor⁽²⁸⁴⁾, però

els nostres resultats són coherents amb altres estudis que indiquen que els receptors de la SST es poden trobar en molts teixits normals i en cèl·lules del sistema immunitari ⁽²⁸⁵⁾.

En conjunt, els resultats globals d'aquest treball han posat de manifest que la conjugació d'agents metàl·lics a pèptids que, com l'octreotide, s'uneixen a receptors que es troben sobreexpressats en les cèl·lules tumorals, té un gran potencial per millorar l'entrada dels agents metàl·lics a l'interior d'aquestes cèl·lules. Amb aquests resultats, a més, s'han detectat certes limitacions que permetran millorar l'activitat dels conjugats sintetitzats seguint aquesta estratègia. En aquest sentit, la utilització de complexos metàl·lics amb una bona activitat citotòxica ha resultat ser un element molt important per tal que el conjugat sintetitzat sigui actiu; a més, ha resultat evident que la unió del complex metàl·lic al pèptid pot dificultar la interacció del fàrmac amb la seva diana biològica, per la qual cosa, utilitzar molècules enllaçadores que permetin l'alliberació del fàrmac a l'interior de la cèl·lula seria una bona alternativa per tal de millorar l'acció citotòxica de l'agent metàl·lic un cop internalitzat ⁽²⁸⁶⁾. D'altra banda, també s'ha demostrat que existeix una bona correlació entre l'efecte dels conjugats i l'expressió de SSTR2, la qual cosa confirma la seva selectivitat per les cèl·lules tumorals que sobreexpressen aquest receptor. En definitiva, doncs, és d'esperar que aquesta estratègia sigui considerada en el futur en la síntesi de fàrmacs amb menys efectes adversos i amb una major selectivitat per les cèl·lules diana, ja que són unes propietats que aquests conjugats poden aportar i que permetrien millorar les teràpies antineoplàstiques actuals.

5.1.2 Vehiculització de compostos metàl·lics de Pt(IV) a través de la unió a anàlegs de folat

L'àcid fòlic és una vitamina hidrosoluble essencial per la proliferació i el manteniment de les cèl·lules de l'organisme que també s'ha estat estudiant com a molècula vehiculitzadora. Com en el cas de l'octreotide, l'àcid fòlic pot dirigir agents units a la seva estructura cap a les cèl·lules tumorals a través de la unió al receptor de folats, un receptor pel qual té una elevada afinitat i que es troba expressat en alguns tipus de tumors^(99,287). Aquestes característiques han promogut el desenvolupament de conjugats conformats per l'àcid fòlic i molècules radioactives o quimioterapèutiques amb l'objectiu de fer el diagnòstic i el tractament de les cèl·lules neoplàstiques que sobreexpressen el receptor de folats⁽⁹⁹⁾. Tenint en compte aquests antecedents, s'ha sintetitzat i caracteritzat l'activitat citotòxica d'un conjugat conformat pel folat i per un complex de Pt(IV) amb l'objectiu de determinar si la unió d'un complex metàl·lic al folat genera un conjugat actiu pel tractament de tumors que sobreexpressen el receptor de folats i millora, així, la seva especificitat.

El conjugat sintetitzat en aquest treball, el conjugat **Cj8**, està conformat per l'àcid fòlic unit a una molècula de PEG (**F2**) i pel cis,cis,trans-[PtCl₂(2-metilpiridina)-(NH₃)(OH)(O₂CCH₂CH₂CO₂H₂)] (**Cx10**), un complex metàl·lic de Pt(IV) anàleg del picoplatí. El picoplatí (**Cx9**) és un complex de Pt(II) que actualment es troba en la fase III dels assaigs clínics⁽²⁰⁾. Es caracteritza per presentar una estructura que genera uns adductes molt voluminosos sobre el DNA i que dificulta la seva interacció amb molècules desactivadores com el glutatió⁽²⁸⁸⁾ o les metalotionines⁽²⁸⁹⁾ la qual cosa li permet superar mecanismes de resistència descrits pel cisplatí^(18,50) i ser actiu en línies resistents a aquest

fàrmac ⁽²⁹⁰⁾. Per altra banda, els complexos de Pt(IV) són unes espècies amb un gran potencial com a fàrmacs antitumorals, ja que tenen menys efectes adversos i més selectivitat per les cèl·lules neoplàstiques que els complexos de Pt(II) ⁽⁵¹⁾. A més, al presentar dos lligands més que aquestes espècies, en el complex **Cx10** s'ha pogut incorporar un grup carboxil que ha permès fer la unió a l'anàleg de l'àcid fòlic; amb aquesta unió, s'ha previst vehiculitzar l'entrada del complex a l'interior de les cèl·lules tumorals per tal que, un cop allà, el complex metàl·lic sigui alliberat de la molècula vehiculitzadora i sigui reduït a la corresponent espècie activa de Pt(II), el picoplatí, que serà l'encarregada d'unir-se al DNA i de dur a terme l'activitat citotòxica.

En total, s'han sintetitzat quatre compostos: el conjugat **Cj8**, la molècula vehiculitzadora **F2** i els complexos metàl·lics **Cx9** i **Cx10**. La seva activitat citotòxica s'ha avaluat en la línia cel·lular de càncer de mama humana MDA-MB-231. La utilització d'aquesta línia cel·lular ha resultat interessant ja que el càncer de mama és un tipus de tumor que sobreexpressa el receptor FR ^(99,291), perquè la línia cel·lular MDA-MB-231 en concret expressa aquest receptor ^(254,255) i, a més, perquè altres autors que estudiaven el folat com a agent vehiculitzador també havien utilitzat aquesta línia cel·lular ^(292,293).

L'avaluació de l'activitat citotòxica dels compostos ha demostrat, en primer lloc, que l'anàleg de folat **F2** és una molècula vehiculitzadora que no afecta la proliferació de les cèl·lules. Pel que fa als complexos metàl·lics, tots dos compostos han mostrat activitat citotòxica en aquestes cèl·lules. En el cas del complex **Cx9**, el seu efecte ha resultat ser similar al del cisplatí en aquesta línia cel·lular, la qual cosa ha posat de manifest que aquestes cèl·lules són menys sensibles als compostos de platí que altres línies cel·lulars com, per exemple, les cèl·lules MCF-7 descrites en l'apartat anterior. D'altra banda, s'ha demostrat

que el complex **Cx10** és unes dues vegades menys citotòxic que el corresponent complex de Pt(II). Aquest fet és atribuïble a què els complexos de Pt(IV) són reduïts a l'interior de la cèl·lula pels reductors citoplasmàtics i que això els pot fer menys actius que la corresponent espècie de Pt(II). De fet, estudis previs que avaluaven l'activitat citotòxica de complexos de Pt(IV) havien descrit un menor efecte per aquests complexos que pel complex de Pt(II) corresponent, la qual cosa s'havia relacionat, justament, amb la necessitat del complex de Pt(IV) de ser reduït donant lloc a aquesta espècie activa ^(294,295).

Pel què fa al conjugat **Cj8**, aquest compost ha mostrat activitat en aquesta línia cel·lular, però ha resultat ser unes sis vegades menys actiu que el complex **Cx9** i unes tres vegades menys actiu que el complex **Cx10**. Així, la unió del complex metàl·lic al folat no ha millorat l'activitat citotòxica del complex **Cx10**. Aquesta menor activitat es pot explicar a través de diferents hipòtesis. En primer lloc, i tenint en compte que en aquesta estratègia és fonamental que la molècula espaciadora permeti l'alliberament del fàrmac a l'interior de la cèl·lula, cal tenir present que l'espaiador utilitzat és el PEG. Aquesta molècula, que ha estat escollida per tal de millorar la solubilitat del compost final, podria dificultar l'alliberament del complex metàl·lic. De fet, en estudis previs on s'utilitzaven molècules que, com el PEG, depenen del pH àcid de l'endosoma per alliberar el fàrmac del folat, els conjugats eren menys efectius que el fàrmac lliure ⁽²⁹⁶⁾ o que el fàrmac unit al folat a través d'una molècula espaciadora que contingués un pont disulfur ⁽²⁹⁷⁾. Altres estudis havien demostrat, a més, que l'acidesa que adquireix l'endosoma durant el procés d'internalització pot ser insuficient per hidrolitzar ràpidament els grups éster d'aquestes molècules espaciadores, la qual cosa dificultaria l'alliberament del fàrmac en aquests tipus de conjugats ⁽²⁹⁸⁾. L'ús de molècules que contenen un pont disulfur ha demostrat que millora

molt l'activitat dels conjugats sintetitzats ^(124,126,297); en aquest treball, però, el fet que el compost metàl·lic contingui un àtom de Pt no ha permès utilitzar aquests tipus d'espaiadors, ja que la interacció que es pot produir entre el platí i els ponts disulfur ^(265,266) hauria fet perillar l'estructura del producte final.

En segon lloc, cal considerar que tot i que el receptor FR es troba expressat en diversos tipus de tumors, la seva expressió no és molt elevada ⁽²⁹⁹⁾ per la qual cosa, estudis previs han descrit que per tal que els conjugats de folat siguin realment efectius els agents citotòxics utilitzats han de ser molt potents ⁽⁹⁹⁾. En aquest sentit, i considerant que els complexos **Cx9** i **Cx10** tenen un efecte moderat en aquesta línia cel·lular, caldrà administrar una concentració molt elevada del conjugat **Cj8** per tal que s'alliberi una quantitat suficient de complex **Cx10** que li permeti dur a terme la seva acció un cop s'hagi reduït donant lloc al complex **Cx9**. A més, la menor activitat del conjugat també podria estar relacionada amb el procés d'internalització i alliberament del complex metàl·lic, ja que podria ser que no s'internalitzés tot el conjugat o que, un cop internalitzat i alliberat, el complex metàl·lic quedés retingut a l'interior de l'endosoma.

En conjunt, s'ha demostrat que la conjugació d'un complex de Pt(IV) anàleg del picoplatí al folat permet generar un producte final que, tot i ser menys citotòxic que el complex metàl·lic sense conjuguar, continua mostrant una certa activitat antitumoral. Aquests resultats, que són molt preliminars, han permès realitzar certes observacions que millorarien les característiques d'aquests tipus de conjugats. D'una banda, s'ha deduït que la utilització de complexos metàl·lics que no reaccionin amb els ponts disulfur permetria incorporar una molècula enllaçadora amb aquesta estructura que augmentaria la velocitat de l'alliberament del fàrmac i milloraria, així, la seva eficiència. D'altra banda,

utilitzar complexos metàl·lics que tinguin una bona activitat antitumoral quan es troben lliures permetria alliberar un complex metàl·lic més actiu en la seva forma no conjugada i, per tant, milloraria l'efectivitat del conjugat sintetitzat. Finalment, és important afegir que aquest estudi s'hauria de completar amb la caracterització bioquímica del conjugat en línies cel·lulars amb diferents nivells d'expressió del FR, la qual cosa permetria demostrar la seva selectivitat per aquelles cèl·lules que, com les cèl·lules tumorals, sobreexpressen aquest receptor.

5.2 Resistència de les cèl·lules tumorals de càncer de pròstata a les teràpies dirigides a inhibir la família HER-EGF

La família HER-EGF és una via de factors de creixement que s'ha relacionat extensament amb el desenvolupament i la proliferació de molts tipus de tumors⁽¹⁴³⁾. Amb l'objectiu de millorar el tractament d'aquestes patologies, en les darreres dècades s'han estudiat diversos agents que inhibeixen de forma selectiva alguns components d'aquesta via⁽¹⁴⁶⁾. En l'actualitat, aquests agents s'estan utilitzant en el tractament oncològic del càncer colorectal, el HNSCC, el càncer de mama, el càncer d'estómac o el NSCLC⁽³⁰⁰⁻³⁰⁷⁾. Tot i això, aquestes teràpies tenen una eficàcia clínica limitada ja que un elevat percentatge de pacients desenvolupen resistències a aquests fàrmacs⁽³⁰⁸⁻³¹²⁾. S'han descrit diversos mecanismes que estan implicats en el desenvolupament d'aquestes resistències⁽¹⁷¹⁻¹⁷³⁾. Un d'ells es basa en el fet que els receptors i lligands de la via HER-EGF poden actuar de forma cooperativa de manera que, quan un dels receptors és inhibit, es poden activar rutes alternatives d'aquesta via per tal de mantenir el creixement i la proliferació cel·lulars^(134,313). En aquest sentit, diversos estudis han demostrat que la inhibició d'un receptor de la via es pot veure compensat amb l'augment en l'expressió de receptors i lligands alternatius a aquest^(170,186-188) i que, en molts casos, la sobreexpressió de dos o més membres d'aquesta família està associat amb tumors amb un fenotip més agressiu que els tumors que només sobreexpressen un dels membres⁽³¹⁴⁻³¹⁷⁾.

En la darrera part d'aquesta tesi s'ha estudiat si la sobreexpressió de receptors i lligands de la via HER-EGF està implicada en la ineficàcia clínica dels inhibidors del receptor EGFR en el tractament del PCa⁽²³⁵⁻²³⁹⁾. La via HER-EGF té un paper fonamental en el desenvolupament del PCa i en la seva progressió a un estadi androgen-independent i metastàtic^(211,318); tot i això, les teràpies dirigides a

inhibir aquesta via no han resultat tenir l'eficàcia clínica esperada en pacients amb aquests tipus de tumors ⁽²³⁵⁻²³⁹⁾. Els motius d'aquesta baixa resposta terapèutica no han estat clarament establerts, per la qual cosa, estudiar les causes implicades en aquesta manca d'efectivitat és important per tal d'entendre els mecanismes que hi estan involucrats i millorar, així, la resposta terapèutica d'aquests agents en el PCa.

Amb aquest objectiu en ment, inicialment s'ha determinat si els receptors i lligands de la via HER-EGF es troben expressats en dues línies cel·lulars de AIPC, les DU-145 i les PC-3. Així, l'anàlisi dels nivells d'expressió gènica dels components d'aquesta via ha demostrat que totes dues línies expressen de forma constitutiva molts dels receptors i lligands analitzats. Tot i això, el seu perfil d'expressió és diferent en funció de la línia cel·lular, ja que mentre per les cèl·lules DU-145 el lligand majoritari és la EPI, per les cèl·lules PC-3, és la BTC. En tots dos casos, però, el lligand que es troba més sobreexpressat és específic del receptor EGFR, que és el receptor que mostra una major expressió en les dues línies cel·lulars. Aquests resultats han permès deduir que la proliferació cel·lular de les dues línies es podria mantenir de forma autònoma gràcies a l'expressió autocrina dels propis factors de creixement; de fet, aquesta hipòtesi s'ha corroborat al observar que en deixar créixer les dues línies cel·lulars en un medi de cultiu amb un aport molt reduït de factors de creixement exògens totes dues línies mantenen el seu creixement de forma autònoma. Els resultats obtinguts, concorden amb treballs anteriors en els quals es demostrava que les cèl·lules de AIPC sobreexpressen determinats receptors i lligands d'aquesta via. Així, s'havia observat que un augment de l'expressió de l'AMF i l'EPI té un paper molt important en l'evolució cap a l'estadi androgen-independent del càncer de pròstata ⁽³¹⁹⁾ i que lligands com l'HB-EGF, l'AMF, el TGF- α i la EPI es troben sobreexpressats en aquestes línies cel·lulars ⁽²²⁷⁾. A més, també s'havia descrit la

importància del TGF- α i l'EGF, juntament amb la sobreexpressió del seu receptor EGFR, en el desenvolupament del PCa⁽³²⁰⁻³²³⁾.

A continuació, s'ha determinat l'efecte que produeixen un anticòs monoclonal dirigit contra l'EGFR, el cetuximab, i dos TKI de l'EGFR, l'erlotinib i el gefitinib, sobre el creixement cel·lular de les dues línies tumorals. Els resultats han demostrat que tot i que totes dues línies expressen el receptor EGFR, les cèl·lules PC-3 són menys sensibles a aquests agents que les cèl·lules DU-145, la qual cosa es pot atribuir, sobretot, a la pèrdua d'expressió del gen de la PTEN per part de les cèl·lules PC-3. La PTEN és una proteïna supressora de tumors que inhibeix la via PI3K/Akt, per la qual cosa, la seva pèrdua permet mantenir aquesta via de transducció de la senyal activada independentment de la seva activació per mitjà dels receptors implicats⁽²⁵⁷⁻²⁵⁹⁾. La pèrdua del gen de la PTEN és una característica comuna en el PCa, ja que alguns estudis han determinat que aproximadament el 50% d'aquests tipus de tumors no tenen expressió de la PTEN⁽³²⁴⁾. Els resultats d'aquest treball han evidenciat que la sensibilitat als inhibidors de l'EGFR és més elevada per les cèl·lules que expressen el gen de la PTEN, les DU-145, que per les cèl·lules que no l'expressen, les PC-3, els quals concorden amb els obtinguts en un assaig previ i que havien demostrat que la sensibilitat per l'erlotinib és molt dependent de la presència o absència del gen de la PTEN en les cèl·lules de PCa⁽²³³⁾.

També s'ha establert que, en resposta al tractament durant 24h amb el cetuximab, el gefitinib i l'erlotinib, l'expressió gènica dels lligands EGF, BTC i NRG-1 i dels receptors HER2, HER3 i HER4, augmenta en la línia cel·lular DU-145. Per altra banda, pràcticament no s'han observat diferències significatives en l'expressió dels lligands i receptors d'aquesta via en la línia cel·lular PC-3, en la qual només s'ha advertit la sobreexpressió de HER4. Aquesta resposta diferent de les dues línies cel·lulars demostra que la sobreexpressió de

receptors i lligands alternatius a l'inhibit es troba atenuada quan les vies de senyalització que s'activen a través de l'EGFR estan constitutivament activades independentment de la unió del lligand, com en el cas de les cèl·lules PC-3.

Un altre resultat destacable és l'augment que s'ha detectat en l'expressió de HER4, ja que és un fenomen que s'ha advertit en totes dues línies cel·lulars. Actualment existeixen pocs estudis que hagin relacionat el receptor HER4 amb el PCa i, a més, els seus resultats mostren controvèrsia. Alguns d'aquests estudis defensen que la seva sobreexpressió està associada a unes característiques menys agressives del tumor i a una aturada en el creixement de les cèl·lules tumorals ⁽²²²⁻²²⁴⁾. Altres estudis, l'associen a un augment en la proliferació cel·lular i en la capacitat migratòria de les cèl·lules tumorals ^(225,226). En aquest treball, el fet d'haver detectat uns nivells inicials molt baixos demostra que tot i l'augment detectat, la seva expressió continua sent molt baixa, fet que suggereix que la contribució d'aquest receptor en el PCa és poc rellevant.

En conjunt, però, els canvis observats en el patró d'expressió dels receptors i lligands de la via HER-EGF en la línia cel·lular DU-145 han demostrat que el tractament agut d'aquestes cèl·lules indueix uns canvis en l'expressió de determinats membres de la família que permeten activar vies alternatives a la de l'EGFR. Un fet destacable en aquest sentit és que els lligands sobreexpressats presenten diversificació en l'activació dels receptors HER, ja que mentre l'EGF és específic de l'EGFR, la BTC pot activar tant l'EGFR com el HER4 ⁽²⁶⁰⁾ i la NRG-1 pot activar els receptors HER3 i HER4 ⁽²⁶¹⁾, la qual cosa activaria diferents heterodímers que compensarien la pèrdua de la funció de l'EGFR i preservarien la senyalització a través de les vies de transducció de la senyal. Aquests resultats indiquen que la sobreexpressió de lligands i receptors de la via HER-EGF alternatius a l'inhibit podria ser una de les causes de la manca

d'efectivitat d'aquestes teràpies en el PCa, ja que permetrien mantenir el creixement d'aquestes cèl·lules tumorals tot i tenir l'EGFR inhibit.

Per tal d'analitzar si els canvis detectats en les cèl·lules DU-145 es mantenen i contribueixen en el desenvolupament de resistències a les teràpies dirigides contra el receptor EGFR, s'ha desenvolupat una línia resistent a l'erlotinib. La caracterització de la línia resistent DUErR ha demostrat, en primer lloc, que aquestes cèl·lules tenen la capacitat de créixer en presència de diferents concentracions d'erlotinib i, per tant, ha confirmat la seva resistència a aquest fàrmac. Aquests resultats també han demostrat, però, que el seu creixement s'alenteix en comparació amb el de les cèl·lules DU-145 en ser tractades amb el vehicle sol, la qual cosa ha posat de manifest que en el desenvolupament de la resistència, es produeixen canvis en el patró de creixement d'aquesta línia cel·lular. D'altra banda, l'anàlisi de l'expressió gènica dels receptors i lligands de la via HER-EGF en les cèl·lules DUErR, ha donat com a resultat un augment significatiu dels nivells dels receptors HER2 i HER3 i dels lligands TGF- α i NRG-1. Aquests resultats s'han confirmat a nivell proteic, ja que s'ha observat un augment considerable en l'expressió de HER3 i un augment, tot i que no tant important, de HER2 i de la NRG-1. Uns resultats molt semblants, tot i que més lleus, s'han obtingut per les cèl·lules DU-145 tractades 48 hores amb erlotinib. Aquest fet ha confirmat que els canvis detectats en la línia resistent ja s'observen en tractar la línia parental durant un període curt de temps, la qual cosa indica que, en resposta al tractament agut, les cèl·lules DU-145 adopten un patró d'expressió dels membres de la família HER-EGF que es conserva en les cèl·lules resistents i que permet superar la inhibició feta sobre el receptor EGFR per tal de mantenir la seva proliferació.

A continuació, per tal de comprovar si també hi ha una major activació d'aquesta via, s'han determinat els nivells de fosforilació dels receptors EGFR, HER2 i HER3 i de dues vies de transducció de la senyal activades per aquests receptors, la Akt i la ERK1/2. Els resultats han indicat que en les cèl·lules DUErR s'observa una major activació de HER3 i de la via de transducció de la senyal Akt, una via predominantment mediada a través de la fosforilació de HER3 ^(190,262,263), la qual cosa indica que, en el procés de desenvolupament de resistència, hi tenen un paper clau HER3 i la via de transducció de la senyal PI3K/Akt activada per aquest receptor. Aquests resultats concordarien amb resultats previs d'altres treballs on es descrivia la via de senyalització HER3/PI3K/Akt com a una via rellevant per evadir la inhibició del receptor EGFR feta pels TKI en diferents tipus de tumors ^(190,325,326).

Per tal de corroborar la importància de HER2, HER3 i de la NRG-1 en el desenvolupament de la resistència, les cèl·lules DU-145 i DUErR s'han tractat amb trastuzumab (un anticòs dirigit contra el receptor HER2 aprovat en clínica), amb un anticòs dirigit contra el receptor HER3 i amb un anticòs dirigit contra la NRG-1, sols o en combinació amb l'erlotinib. A través d'aquest assaig s'ha demostrat que la inhibició de HER2 pràcticament no té efectes sobre la proliferació i el creixement d'aquestes línies cel·lulars, però que el bloqueig de HER3 sí que provoca una important disminució en el creixement de les cèl·lules DU-145 i DUErR, fet que confirma la importància d'aquest receptor en el manteniment del creixement i la proliferació cel·lulars. A més, el bloqueig concomitant de HER3 i de l'EGFR en ambdues línies, ha demostrat que té un efecte més important aquest doble bloqueig que inhibir un dels dos receptors per separat, la qual cosa ha indicat, en el cas de les cèl·lules DUErR, que el bloqueig de HER3 permet restaurar l'efecte citotòxic de l'erlotinib en aquesta

línia resistent. D'altra banda, el bloqueig de la NRG-1 no ha provocat un efecte significatiu sobre el creixement i la proliferació cel·lulars, la qual cosa indica que la NRG-1 té un paper relatiu en la supervivència de les cèl·lules de PCa. Aquests resultats es poden explicar tenint en compte que altres lligands, com la NRG-2, podrien estar implicats en l'activació de la senyalització a través de HER3 en aquestes cèl·lules, o perquè, tal i com es va demostrar en un estudi previ, el receptor HER3 en les cèl·lules de PCa pot ser activat independentment de la presència de la NRG-1 ⁽³²⁷⁾.

Un dels mecanismes que s'ha relacionat àmpliament amb l'aparició de resistències a les teràpies dirigides a inhibir el receptor EGFR és l'activació de la via de transducció de la senyal de la PI3K/Akt a través de l'heterodimerització dels receptors HER2/HER3 ^(261,328-331). Els resultats obtinguts en aquest treball han confirmat la importància d'aquesta via, sobretot del receptor HER3, en el desenvolupament de la resistència a inhibidors del receptor EGFR en la línia cel·lular DU-145. El receptor HER3 es troba sobreexpressat en la línia resistent DUER i, a través de l'heterodimerització amb el receptor HER2 o, fins i tot, amb els baixos nivells del receptor d'EGFR que hi poguessin haver, pot activar la via de transducció de la senyal de la PI3K/Akt que permetria mantenir la proliferació i la supervivència cel·lulars tot i tenir el receptor EGFR bloquejat.

D'altra banda, i en relació amb els lligands de la via HER-EGF, alguns d'aquests membres de la família també han estat considerats possibles dianes en el tractament oncològic, ja que la pèrdua de funció dels receptors HER es pot equilibrar a través de l'expressió endògena d'aquests lligands. No obstant això, el fet que un mateix lligand pugui activar diferents receptors o que un mateix receptor pugui ser activat per diferents lligands, limita l'eficàcia d'aquesta estratègia i ha conduït al consens general que la inhibició dels receptors HER és

més eficaç que la inhibició de diversos lligands. Els resultats obtinguts en aquest treball donen suport a aquesta hipòtesi, ja que la proliferació de les cèl·lules s'ha vist reduïda de forma important després de bloquejar el receptor HER3, mentre que la inhibició d'un lligand en particular, la NRG-1, ha revelat una eficàcia molt menor en la reducció del creixement cel·lular.

En conjunt, tots aquests resultats han demostrat l'habilitat que tenen les cèl·lules de carcinoma de pròstata humà andrògen-independents d'adaptar l'expressió dels receptors i lligands de la via HER-EGF després de bloquejar el receptor EGFR i l'important paper que juga el receptor HER3 en la modulació de la resistència als inhibidors de l'EGFR. Aquest mecanisme molecular podria ser especialment interessant en les condicions fisiològiques ja que la proliferació de les cèl·lules malignes és molt dependent de la producció autocrina de factors de creixement i de l'expressió dels seus receptors en el microambient del tumor. En definitiva, doncs, l'eficàcia clínica dels tractaments oncològics actuals dirigits a inhibir el receptor EGFR en el PCa podria ser millorada mitjançant la inhibició dual dels receptors EGFR i HER3.

Anàlisi de la vehiculització
de compostos metàl·lics
com a agents antitumorals
i de la família HER-EGF en la
resistència als tractaments
oncològics

6 Conclusions

Els resultats obtinguts en aquesta tesi han permès extreure les següents conclusions:

- I. La síntesi de pèptids en fase sòlida és una estratègia eficient que ha permès sintetitzar set conjugats pèptid-complex metàl·lic (**Cj1 – Cj7**) constituïts per l'octreotide o dos anàlegs *dicarba* de l'octreotide i per un complex metàl·lic de platí, ruteni o osmi.
- II. Els conjugats de platí **Cj2 i Cj4** i els conjugats d'osmi **Cj5** i de ruteni **Cj6** són activats mitjançant la hidròlisi de l'enllaç metall-Cl en unes condicions de concentració de clorur similars a les del nucli cel·lular (4 mM). Aquesta hidròlisi s'ha correlacionat amb la seva capacitat d'unió al DNA, demostrant una gran preferència per les bases de guanina. D'altra banda, el conjugat de ruteni **Cj7** i el complex **Cx3** no s'activen ni s'uneixen al DNA, la qual cosa indica que actuen a través d'un mecanisme d'acció diferent.
- III. El *dicarba* anàleg de l'octreotide **P3** és un bon agent vehiculitzador que interioritza en les cèl·lules tumorals seguint una cinètica paral·lela a la de l'octreotide, tot i que amb una capacitat d'internalització menor. La seva unió a la molècula espaciadora i als complexos metàl·lics no provoca alteracions importants en l'estructura global del pèptid ni afecta la seva afinitat pel SSTR2, fet que s'ha corroborat demostrant que l'acumulació de ruteni a l'interior de les cèl·lules és més elevada pel **Cj7** que pel **Cx3**; aquest resultat també ha demostrat que el conjugat millora la internalització del complex metàl·lic.

- IV. La unió del pèptid vehiculitzador al complex metàl·lic provoca una pèrdua en l'activitat inicial del complex metàl·lic, fet que ha comportat que només el conjugat **Cj7** sigui citotòxic. La utilització de complexos metàl·lics amb elevada activitat citotòxica és un element clau per tal que els conjugats sintetitzats siguin actius biològicament.
- V. L'activitat citotòxica del **Cj7** és major en les cèl·lules DU-145, que tenen una elevada expressió de SSTR2, que en les cèl·lules MCF-7, la qual cosa demostra la selectivitat del conjugat. La seva citotoxicitat també és més elevada en les cèl·lules tumorals DU-145 que en la línia cel·lular no tumoral CHO tot i tenir uns nivells de SSTR2 molt similars, el què indica una major activitat del **Cj7** en les cèl·lules tumorals.
- VI. La conjugació d'un anàleg de picoplatí a un anàleg de l'àcid fòlic provoca una pèrdua de l'activitat citotòxica del complex metàl·lic. Aquest fet confirma la importància d'utilitzar complexos metàl·lics amb elevada citotoxicitat per tal que el conjugat també tingui una bona activitat citotòxica. La baixa citotoxicitat del conjugat també és atribuïble al fet que l'anàleg de picoplatí conté platí (IV) i a la utilització de PEG com a molècula espaciadora, que pot haver limitat l'alliberació del picoplatí dins la cèl·lula.
- VII. Les línies cel·lulars de càncer de pròstata androgen-independents DU-145 i PC-3 expressen basalment diversos receptors i lligands de la via HER-EGF, la qual cosa s'ha relacionat amb la seva capacitat de proliferar de forma independent a l'aport exògen de factors de creixement.

- VIII. Les línies cel·lulars DU-145 i PC-3 expressen l'EGFR i són sensibles als inhibidors d'aquest receptor. Tot i això, les cèl·lules PC-3 han resultat ser menys sensibles, ja que al no expressar el gen de la PTEN, la seva resposta als tractaments és menor.
- IX. La inhibició del EGFR mitjançant cetuximab, erlotinib i gefitinib indueix un canvi en el patró d'expressió dels membres de la família HER-EGF, especialment en les cèl·lules que expressen PTEN, les DU-145. Aquestes cèl·lules sobreexpressen EGF, BTC i NRG-1 i els receptors HER2, HER3 i HER4, fet que demostra el seu intent de compensar el bloqueig del EGFR sobreexpressant lligands i receptors alternatius a l'inhibit.
- X. El desenvolupament d'unes cèl·lules DU-145 resistents a l'erlotinib ha indicat que la sobreexpressió de HER3 té un paper molt important en la resistència, ja que activa aquesta via de senyalització i manté la proliferació cel·lular quan l'EGFR està inhibit. Així, la inhibició dual dels receptors HER3 i EGFR podria millorar l'eficàcia clínica dels actuals tractaments oncològics basats en la inhibició del EGFR.

Anàlisi de la vehiculització
de compostos metàl·lics
com a agents antitumorals
i de la família HER-EGF en la
resistència als tractaments
oncològics

7 Bibliografia

- (1) Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
- (2) Mendelsohn J. *The molecular basis of cancer*. 3rd ed. Philadelphia, Pa. ; London: Saunders; 2008.
- (3) Alberts B. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York etc.: Garland; 2008.
- (4) Vogelstein B, Kinzler KW. *The Genetic basis of human cancer*. 2nd ed. New York etc.: McGraw-Hill, Medical Publishing Division; 2002.
- (5) DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer*. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
- (6) Longo DL, Harrison TR. *Harrison's principles of internal medicine*. 18th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2011.
- (7) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar 4;144(5):646-674.
- (8) Cortés Funes H, Colomer Bosch R, Alba Conejo E, Trigo Pérez JM. *Tratado de oncología*. Barcelona: Permanyer; 2009.
- (9) Chen J, Stubbe J. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2005 Feb;5(2):102-112.
- (10) Arora A, Scholar EM. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 2005 Dec;315(3):971-979.
- (11) Gore SD, Baylin S, Sugar E, Carraway H, Miller CB, Carducci M, et al. Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res* 2006 Jun 15;66(12):6361-6369.
- (12) Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003 Nov 20;349(21):2042-2054.
- (13) Adams J. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist* 2002;7(1):9-16.

- (14) Leonard JP, Furman RR, Coleman M. Proteasome inhibition with bortezomib: a new therapeutic strategy for non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 2006 Sep 1;119(5):971-979.
- (15) Dougan M, Dranoff G. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 2009;27:83-117.
- (16) Finn OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med* 2008 Jun 19;358(25):2704-2715.
- (17) Okarvi SM. Peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxic conjugates: potential tools against cancer. *Cancer Treat Rev* 2008 Feb;34(1):13-26.
- (18) Burger H, Loos WJ, Eechoute K, Verweij J, Mathijssen RH, Wiemer EA. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Resist Updat* 2011 Feb;14(1):22-34.
- (19) Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007 Aug;7(8):573-584.
- (20) Shah N, Dizon DS. New-generation platinum agents for solid tumors. *Future Oncol* 2009 Feb;5(1):33-42.
- (21) Bosl GJ, Motzer RJ. Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med* 1997 Jul 24;337(4):242-253.
- (22) Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans* 2010 Sep 21;39(35):8113-8127.
- (23) Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* 1993 Jun;67(6):1171-1176.
- (24) Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Oct 29;99(22):14298-14302.
- (25) Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev* 1999 Sep 8;99(9):2467-2498.

- (26) Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003 Oct 20;22(47):7265-7279.
- (27) Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 2007 Jan;7(1):3-18.
- (28) Koberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* 2010 Dec;1806(2):172-182.
- (29) Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 2001 Apr;59(4):657-663.
- (30) Huang JC, Zamble DB, Reardon JT, Lippard SJ, Sancar A. HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Oct 25;91(22):10394-10398.
- (31) Zamble DB, Mu D, Reardon JT, Sancar A, Lippard SJ. Repair of cisplatin--DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry* 1996 Aug 6;35(31):10004-10013.
- (32) Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 2000 Aug;57(8-9):1229-1235.
- (33) Humes HD. Insights into ototoxicity. Analogies to nephrotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1999 Nov 28;884:15-18.
- (34) Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol* 2003 Sep;23(5):460-464.
- (35) McWhinney SR, Goldberg RM, McLeod HL. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Mol Cancer Ther* 2009 Jan;8(1):10-16.
- (36) Katano K, Kondo A, Safaei R, Holzer A, Samimi G, Mishima M, et al. Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Res* 2002 Nov 15;62(22):6559-6565.

(37) Kuo MT, Chen HH, Song IS, Savaraj N, Ishikawa T. The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer Metastasis Rev* 2007 Mar;26(1):71-83.

(38) Meijer C, Mulder NH, Timmer-Bosscha H, Sluiter WJ, Meersma GJ, de Vries EG. Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Res* 1992 Dec 15;52(24):6885-6889.

(39) Jansen BA, Brouwer J, Reedijk J. Glutathione induces cellular resistance against cationic dinuclear platinum anticancer drugs. *J Inorg Biochem* 2002 Apr 28;89(3-4):197-202.

(40) Kelley SL, Basu A, Teicher BA, Hacker MP, Hamer DH, Lazo JS. Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science* 1988 Sep 30;241(4874):1813-1815.

(41) Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomioka M, et al. Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004 Jul 15;10(14):4661-4669.

(42) Yoshizawa K, Nozaki S, Kitahara H, Ohara T, Kato K, Kawashiri S, et al. Copper efflux transporter (ATP7B) contributes to the acquisition of cisplatin-resistance in human oral squamous cell lines. *Oncol Rep* 2007 Oct;18(4):987-991.

(43) Zdraveski ZZ, Mello JA, Farinelli CK, Essigmann JM, Marinus MG. MutS preferentially recognizes cisplatin- over oxaliplatin-modified DNA. *J Biol Chem* 2002 Jan 11;277(2):1255-1260.

(44) Gadducci A, Cosio S, Muraca S, Genazzani AR. Molecular mechanisms of apoptosis and chemosensitivity to platinum and paclitaxel in ovarian cancer: biological data and clinical implications. *Eur J Gynaecol Oncol* 2002;23(5):390-396.

(45) Ardizzoni A, Boni L, Tiseo M, Fossella FV, Schiller JH, Paesmans M, et al. Cisplatin- versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2007 Jun 6;99(11):847-857.

- (46) Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther* 2002 Jan;1(3):227-235.
- (47) van Meerten E, Eskens FA, van Gameren EC, Doorn L, van der Gaast A. First-line treatment with oxaliplatin and capecitabine in patients with advanced or metastatic oesophageal cancer: a phase II study. *Br J Cancer* 2007 May 7;96(9):1348-1352.
- (48) Fu S, Kavanagh JJ, Hu W, Bast RC, Jr. Clinical application of oxaliplatin in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2006 Sep-Oct;16(5):1717-1732.
- (49) Mishima M, Samimi G, Kondo A, Lin X, Howell SB. The cellular pharmacology of oxaliplatin resistance. *Eur J Cancer* 2002 Jul;38(10):1405-1412.
- (50) Kelland L. Broadening the clinical use of platinum drug-based chemotherapy with new analogues. Satraplatin and picoplatin. *Expert Opin Investig Drugs* 2007 Jul;16(7):1009-1021.
- (51) Hall MD, Mellor HR, Callaghan R, Hambley TW. Basis for design and development of platinum(IV) anticancer complexes. *J Med Chem* 2007 Jul 26;50(15):3403-3411.
- (52) Hall MD, Dillon CT, Zhang M, Beale P, Cai Z, Lai B, et al. The cellular distribution and oxidation state of platinum(II) and platinum(IV) antitumour complexes in cancer cells. *J Biol Inorg Chem* 2003 Sep;8(7):726-732.
- (53) Hall MD, Hambley TW. Platinum(IV) antitumour compounds: their bioinorganic chemistry. *Coord Chem Rev* 2002 10;232(1-2):49-67.
- (54) Choi S, Cooley RB, Hakemian AS, Larrabee YC, Bunt RC, Maupas SD, et al. Mechanism of two-electron oxidation of deoxyguanosine 5'-monophosphate by a platinum(IV) complex. *J Am Chem Soc* 2004 Jan 21;126(2):591-598.
- (55) Choi S, Cooley RB, Voutchkova A, Leung CH, Vastag L, Knowles DE. Oxidation of guanosine derivatives by a platinum(IV) complex: internal electron transfer through cyclization. *J Am Chem Soc* 2005 Feb 16;127(6):1773-1781.
- (56) Choy H, Park C, Yao M. Current status and future prospects for satraplatin, an oral platinum analogue. *Clin Cancer Res* 2008 Mar 15;14(6):1633-1638.

- (57) Doshi G, Sonpavde G, Sternberg CN. Clinical and pharmacokinetic evaluation of satraplatin. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012 Jan;8(1):103-111.
- (58) Gianferrara T, Bratsos I, Alessio E. A categorization of metal anticancer compounds based on their mode of action. *Dalton Trans* 2009 Oct 7;(37)(37):7588-7598.
- (59) van Rijt SH, Sadler PJ. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discov Today* 2009 Dec;14(23-24):1089-1097.
- (60) Gasser G, Ott I, Metzler-Nolte N. Organometallic anticancer compounds. *J Med Chem* 2011 Jan 13;54(1):3-25.
- (61) Levina A, Mitra A, Lay PA. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. *Metallomics* 2009 Nov;1(6):458-470.
- (62) Bergamo A, Sava G. Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs. *Dalton Trans* 2011 Aug 21;40(31):7817-7823.
- (63) Reedijk J. New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Apr 1;100(7):3611-3616.
- (64) Jakupec MA, Galanski M, Arion VB, Hartinger CG, Keppler BK. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Trans* 2008 Jan 14;(2)(2):183-194.
- (65) Antonarakis ES, Emadi A. Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? *Cancer Chemother Pharmacol* 2010 May;66(1):1-9.
- (66) Kratz F, Messori L. Spectral characterization of ruthenium (III) transferrin. *J Inorg Biochem* 1993 Feb 1;49(2):79-82.
- (67) Zhang CX, Lippard SJ. New metal complexes as potential therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 2003 Aug;7(4):481-489.

- (68) Kapitza S, Jakupec MA, Uhl M, Keppler BK, Marian B. The heterocyclic ruthenium(III) complex KP1019 (FFC14A) causes DNA damage and oxidative stress in colorectal tumor cells. *Cancer Lett* 2005 Aug 26;226(2):115-121.
- (69) Brabec V, Novakova O. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resist Updat* 2006 Jun;9(3):111-122.
- (70) Gava B, Zorzet S, Spessotto P, Cocchietto M, Sava G. Inhibition of B16 melanoma metastases with the ruthenium complex imidazolium trans-imidazoledimethylsulfoxide-tetrachlororuthenate and down-regulation of tumor cell invasion. *J Pharmacol Exp Ther* 2006 Apr;317(1):284-291.
- (71) Sava G, Frausin F, Cocchietto M, Vita F, Podda E, Spessotto P, et al. Actin-dependent tumour cell adhesion after short-term exposure to the antimetastasis ruthenium complex NAMI-A. *Eur J Cancer* 2004 Jun;40(9):1383-1396.
- (72) Bergamo A, Gagliardi R, Scarzia V, Furlani A, Alessio E, Mestroni G, et al. In vitro cell cycle arrest, in vivo action on solid metastasizing tumors, and host toxicity of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther* 1999 Apr;289(1):559-564.
- (73) Vacca A, Bruno M, Boccarelli A, Coluccia M, Ribatti D, Bergamo A, et al. Inhibition of endothelial cell functions and of angiogenesis by the metastasis inhibitor NAMI-A. *Br J Cancer* 2002 Mar 18;86(6):993-998.
- (74) Pluim D, van Waardenburg RC, Beijnen JH, Schellens JH. Cytotoxicity of the organic ruthenium anticancer drug Nami-A is correlated with DNA binding in four different human tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004 Jul;54(1):71-78.
- (75) Cocchietto M, Sava G. Blood concentration and toxicity of the antimetastasis agent NAMI-A following repeated intravenous treatment in mice. *Pharmacol Toxicol* 2000 Nov;87(5):193-197.
- (76) Sava G, Cocchietto M. Blood levels of ruthenium following repeated treatments with the antimetastatic compound NAMI-A in healthy beagle dogs. *In Vivo* 2000 Nov-Dec;14(6):741-744.

(77) Sava G, Capozzi I, Clerici K, Gagliardi G, Alessio E, Mestroni G. Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a novel ruthenium complex. *Clin Exp Metastasis* 1998 May;16(4):371-379.

(78) Kapitza S, Pongratz M, Jakupec MA, Heffeter P, Berger W, Lackinger L, et al. Heterocyclic complexes of ruthenium(III) induce apoptosis in colorectal carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005 Feb;131(2):101-110.

(79) Galanski M, Arion VB, Jakupec MA, Keppler BK. Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes. *Curr Pharm Des* 2003;9(25):2078-2089.

(80) Hostetter AA, Miranda ML, DeRose VJ, McFarlane Holman KL. Ru binding to RNA following treatment with the antimetastatic prodrug NAMI-A in *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro. *J Biol Inorg Chem* 2011 Dec;16(8):1177-1185.

(81) Rademaker-Lakhai JM, van den Bongard D, Pluim D, Beijnen JH, Schellens JH. A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. *Clin Cancer Res* 2004 Jun 1;10(11):3717-3727.

(82) Hartinger CG, Jakupec MA, Zorbas-Seifried S, Groessl M, Egger A, Berger W, et al. KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. *Chem Biodivers* 2008 Oct;5(10):2140-2155.

(83) Aird RE, Cummings J, Ritchie AA, Muir M, Morris RE, Chen H, et al. In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer. *Br J Cancer* 2002 May 20;86(10):1652-1657.

(84) Morris RE, Aird RE, Murdoch Pdel S, Chen H, Cummings J, Hughes ND, et al. Inhibition of cancer cell growth by ruthenium(II) arene complexes. *J Med Chem* 2001 Oct 25;44(22):3616-3621.

(85) Scolaro C, Bergamo A, Brescacin L, Delfino R, Cocchietto M, Laurency G, et al. In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes. *J Med Chem* 2005 Jun 16;48(12):4161-4171.

- (86) Novakova O, Chen H, Vrana O, Rodger A, Sadler PJ, Brabec V. DNA interactions of monofunctional organometallic ruthenium(II) antitumor complexes in cell-free media. *Biochemistry* 2003 Oct 7;42(39):11544-11554.
- (87) Casini A, Gabbiani C, Sorrentino F, Rigobello MP, Bindoli A, Geldbach TJ, et al. Emerging protein targets for anticancer metallodrugs: inhibition of thioredoxin reductase and cathepsin B by antitumor ruthenium(II)-arene compounds. *J Med Chem* 2008 Nov 13;51(21):6773-6781.
- (88) Ang WH, De Luca A, Chapuis-Bernasconi C, Juillerat-Jeanneret L, Lo Bello M, Dyson PJ. Organometallic ruthenium inhibitors of glutathione-S-transferase P1-1 as anticancer drugs. *ChemMedChem* 2007 Dec;2(12):1799-1806.
- (89) Buchel GE, Stepanenko IN, Hejl M, Jakupec MA, Keppler BK, Arion VB. En route to osmium analogues of KP1019: synthesis, structure, spectroscopic properties and antiproliferative activity of trans-[Os(IV)Cl₄(Hazole)₂]. *Inorg Chem* 2011 Aug 15;50(16):7690-7697.
- (90) Peacock AF, Sadler PJ. Medicinal organometallic chemistry: designing metal arene complexes as anticancer agents. *Chem Asian J* 2008 Nov 13;3(11):1890-1899.
- (91) Cebrian-Losantos B, Krokhin AA, Stepanenko IN, Eichinger R, Jakupec MA, Arion VB, et al. Osmium NAMI-A analogues: synthesis, structural and spectroscopic characterization, and antiproliferative properties. *Inorg Chem* 2007 Jun 11;46(12):5023-5033.
- (92) Kostrhunova H, Florian J, Novakova O, Peacock AF, Sadler PJ, Brabec V. DNA interactions of monofunctional organometallic osmium(II) antitumor complexes in cell-free media. *J Med Chem* 2008 Jun 26;51(12):3635-3643.
- (93) Fu Y, Habtemariam A, Pizarro AM, van Rijt SH, Healey DJ, Cooper PA, et al. Organometallic osmium arene complexes with potent cancer cell cytotoxicity. *J Med Chem* 2010 Nov 25;53(22):8192-8196.
- (94) Reubi JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev* 2003 Aug;24(4):389-427.
- (95) Schally AV, Engel JB, Emons G, Block NL, Pinski J. Use of analogs of peptide hormones conjugated to cytotoxic radicals for chemotherapy targeted to receptors on tumors. *Curr Drug Deliv* 2011 Jan;8(1):11-25.

(96) Yoon DJ, Liu CT, Quinlan DS, Nafisi PM, Kamei DT. Intracellular trafficking considerations in the development of natural ligand-drug molecular conjugates for cancer. *Ann Biomed Eng* 2011 Apr;39(4):1235-1251.

(97) Oyen WJ, Bodei L, Giammarile F, Maecke HR, Tennvall J, Luster M, et al. Targeted therapy in nuclear medicine--current status and future prospects. *Ann Oncol* 2007 Nov;18(11):1782-1792.

(98) Sun LC, Coy DH. Somatostatin receptor-targeted anti-cancer therapy. *Curr Drug Deliv* 2011 Jan;8(1):2-10.

(99) Xia W, Low PS. Folate-targeted therapies for cancer. *J Med Chem* 2010 Oct 14;53(19):6811-6824.

(100) Low PS, Kularatne SA. Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Curr Opin Chem Biol* 2009 Jun;13(3):256-262.

(101) Weckbecker G, Lewis I, Albert R, Schmid HA, Hoyer D, Bruns C. Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov* 2003 Dec;2(12):999-1017.

(102) Moller LN, Stidsen CE, Hartmann B, Holst JJ. Somatostatin receptors. *Biochim Biophys Acta* 2003 Sep 22;1616(1):1-84.

(103) Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 1999 Jul;20(3):157-198.

(104) Hoyer D, Lubbert H, Bruns C. Molecular pharmacology of somatostatin receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994 Nov;350(5):441-453.

(105) Patel YC, Srikant CB. Somatostatin receptors. *Trends Endocrinol Metab* 1997 Dec;8(10):398-405.

(106) Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC, Patel YC. Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem* 2000 Mar 17;275(11):7862-7869.

(107) Froidevaux S, Eberle AN. Somatostatin analogs and radiopeptides in cancer therapy. *Biopolymers* 2002;66(3):161-183.

(108) Reichlin S. Somatostatin. *N Engl J Med* 1983 Dec 15;309(24):1495-1501.

- (109) Scarpignato C, Pelosini I. Somatostatin analogs for cancer treatment and diagnosis: an overview. *Chemotherapy* 2001;47 Suppl 2:1-29.
- (110) Janecka A, Zubrzycka M, Janecki T. Somatostatin analogs. *J Pept Res* 2001 Aug;58(2):91-107.
- (111) Culler MD, Oberg K, Arnold R, Krenning EP, Sevilla I, Diaz JA. Somatostatin analogs for the treatment of neuroendocrine tumors. *Cancer Metastasis Rev* 2011 Mar;30 Suppl 1:9-17.
- (112) Krenning EP, Bakker WH, Breeman WA, Koper JW, Kooij PP, Ausema L, et al. Localisation of endocrine-related tumours with radioiodinated analogue of somatostatin. *Lancet* 1989 Feb 4;1(8632):242-244.
- (113) Sun LC, Mackey LV, Luo J, Fuselier JA, Coy DH. Targeted chemotherapy using a cytotoxic somatostatin conjugate to inhibit tumor growth and metastasis in nude mice. *Clin Med Oncol* 2008;2:491-499.
- (114) Engel JB, Schally AV, Halmos G, Baker B, Nagy A, Keller G. Targeted therapy with a cytotoxic somatostatin analog, AN-238, inhibits growth of human experimental endometrial carcinomas expressing multidrug resistance protein MDR-1. *Cancer* 2005 Sep 15;104(6):1312-1321.
- (115) Engel JB, Schally AV, Dietl J, Rieger L, Honig A. Targeted therapy of breast and gynecological cancers with cytotoxic analogues of peptide hormones. *Mol Pharm* 2007 Sep-Oct;4(5):652-658.
- (116) Kiaris H, Schally AV, Nagy A, Szepeshazi K, Hebert F, Halmos G. A targeted cytotoxic somatostatin (SST) analogue, AN-238, inhibits the growth of H-69 small-cell lung carcinoma (SCLC) and H-157 non-SCLC in nude mice. *Eur J Cancer* 2001 Mar;37(5):620-628.
- (117) Radulovic S, Nagy A, Szoke B, Schally AV. Cytotoxic analog of somatostatin containing methotrexate inhibits growth of MIA PaCa-2 human pancreatic cancer xenografts in nude mice. *Cancer Lett* 1992 Mar 15;62(3):263-271.
- (118) Huang CM, Wu YT, Chen ST. Targeting delivery of paclitaxel into tumor cells via somatostatin receptor endocytosis. *Chem Biol* 2000 Jul;7(7):453-461.
- (119) Salazar MD, Ratnam M. The folate receptor: what does it promise in tissue-targeted therapeutics? *Cancer Metastasis Rev* 2007 Mar;26(1):141-152.

(120) Zhao R, Diop-Bove N, Visentin M, Goldman ID. Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. *Annu Rev Nutr* 2011 Aug 21;31:177-201.

(121) Zhao R, Matherly LH, Goldman ID. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med* 2009 Jan 28;11:e4.

(122) Sirotnak FM, Tolner B. Carrier-mediated membrane transport of folates in mammalian cells. *Annu Rev Nutr* 1999;19:91-122.

(123) Leamon CP, Low PS. Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Jul 1;88(13):5572-5576.

(124) Yang J, Chen H, Vlahov IR, Cheng JX, Low PS. Evaluation of disulfide reduction during receptor-mediated endocytosis by using FRET imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Sep 12;103(37):13872-13877.

(125) Feener EP, Shen WC, Ryser HJ. Cleavage of disulfide bonds in endocytosed macromolecules. A processing not associated with lysosomes or endosomes. *J Biol Chem* 1990 Nov 5;265(31):18780-18785.

(126) Leamon CP, Pastan I, Low PS. Cytotoxicity of folate-Pseudomonas exotoxin conjugates toward tumor cells. Contribution of translocation domain. *J Biol Chem* 1993 Nov 25;268(33):24847-24854.

(127) Hilgenbrink AR, Low PS. Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics. *J Pharm Sci* 2005 Oct;94(10):2135-2146.

(128) Lee RJ, Wang S, Low PS. Measurement of endosome pH following folate receptor-mediated endocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1996 Jul 24;1312(3):237-242.

(129) Siegel BA, Dehdashti F, Mutch DG, Podoloff DA, Wendt R, Sutton GP, et al. Evaluation of ¹¹¹In-DTPA-folate as a receptor-targeted diagnostic agent for ovarian cancer: initial clinical results. *J Nucl Med* 2003 May;44(5):700-707.

(130) Fisher RE, Siegel BA, Edell SL, Oyesiku NM, Morgenstern DE, Messmann RA, et al. Exploratory study of ^{99m}Tc-EC20 imaging for identifying patients with folate receptor-positive solid tumors. *J Nucl Med* 2008 Jun;49(6):899-906.

- (131) Dosio F, Milla P, Cattel L. EC-145, a folate-targeted Vinca alkaloid conjugate for the potential treatment of folate receptor-expressing cancers. *Curr Opin Investig Drugs* 2010 Dec;11(12):1424-1433.
- (132) Goldhirsch A, Beer M, Sonntag RW, Tschopp L, Cavalli F, Ryssel HJ, et al. Phase-II-study with vindesine (desacetyl-vinblastine-amide-sulfate) in advanced malignant diseases. *Schweiz Med Wochenschr* 1980 Jul 8;110(27-28):1063-1067.
- (133) Shi F, Telesco SE, Liu Y, Radhakrishnan R, Lemmon MA. ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Apr 27;107(17):7692-7697.
- (134) Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006 Jan 17;366(1):2-16.
- (135) Fuller SJ, Sivarajah K, Sugden PH. ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2008 May;44(5):831-854.
- (136) Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Feb;2(2):127-137.
- (137) Lemmon MA. Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp Cell Res* 2009 Feb 15;315(4):638-648.
- (138) Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004 May;4(5):361-370.
- (139) Janmaat ML, Kruyt FA, Rodriguez JA, Giaccone G. Response to epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells: limited antiproliferative effects and absence of apoptosis associated with persistent activity of extracellular signal-regulated kinase or Akt kinase pathways. *Clin Cancer Res* 2003 Jun;9(6):2316-2326.
- (140) Magne N, Fischel JL, Dubreuil A, Formento P, Poupon MF, Laurent-Puig P, et al. Influence of epidermal growth factor receptor (EGFR), p53 and intrinsic MAP kinase pathway status of tumour cells on the antiproliferative effect of ZD1839 ("Iressa"). *Br J Cancer* 2002 May 6;86(9):1518-1523.

- (141) Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005 May;5(5):341-354.
- (142) Singh AB, Harris RC. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal* 2005 Oct;17(10):1183-1193.
- (143) Vlahovic G, Crawford J. Activation of tyrosine kinases in cancer. *Oncologist* 2003;8(6):531-538.
- (144) Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995 Jul;19(3):183-232.
- (145) Miyamoto S, Fukami T, Yagi H, Kuroki M, Yotsumoto F. Potential for molecularly targeted therapy against epidermal growth factor receptor ligands. *Anticancer Res* 2009 Mar;29(3):823-830.
- (146) Cai Z, Zhang H, Liu J, Berezov A, Murali R, Wang Q, et al. Targeting erbB receptors. *Semin Cell Dev Biol* 2010 Dec;21(9):961-966.
- (147) Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2006 Sep 15;12(18):5268-5272.
- (148) Baselga J. Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *Science* 2006 May 26;312(5777):1175-1178.
- (149) Martinelli E, De Palma R, Orditura M, De Vita F, Ciardiello F. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin Exp Immunol* 2009 Oct;158(1):1-9.
- (150) MacFarlane RJ, Gelmon KA. Lapatinib for breast cancer: a review of the current literature. *Expert Opin Drug Saf* 2011 Jan;10(1):109-121.
- (151) Schmitz KR, Ferguson KM. Interaction of antibodies with ErbB receptor extracellular regions. *Exp Cell Res* 2009 Feb 15;315(4):659-670.
- (152) Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* 2004 Dec;11(4):689-708.

- (153) Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer* 2002 Mar 1;94(5):1593-1611.
- (154) Markman B, Capdevila J, Elez E, Tabernero J. New trends in epidermal growth factor receptor-directed monoclonal antibodies. *Immunotherapy* 2009 Nov;1(6):965-982.
- (155) Vincenzi B, Schiavon G, Silletta M, Santini D, Tonini G. The biological properties of cetuximab. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008 Nov;68(2):93-106.
- (156) Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000 Dec 27;19(56):6550-6565.
- (157) Yang BB, Lum P, Chen A, Arends R, Roskos L, Smith B, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic perspectives on the clinical drug development of panitumumab. *Clin Pharmacokinet* 2010 Nov 1;49(11):729-740.
- (158) Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM, Fox JA. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 1999 Aug;26(4 Suppl 12):60-70.
- (159) Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001 Jun 15;61(12):4744-4749.
- (160) Hubalek M, Brunner C, Mattha K, Marth C. Resistance to HER2-targeted therapy: mechanisms of trastuzumab resistance and possible strategies to overcome unresponsiveness to treatment. *Wien Med Wochenschr* 2010 Nov;160(19-20):506-512.
- (161) Saxena R, Dwivedi A. ErbB family receptor inhibitors as therapeutic agents in breast cancer: current status and future clinical perspective. *Med Res Rev* 2012 Jan;32(1):166-215.
- (162) Baselga J. Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *Science* 2006 May 26;312(5777):1175-1178.
- (163) Lurje G, Lenz HJ. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* 2009;77(6):400-410.

(164) Grunwald V, Hidalgo M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 2003 Jun 18;95(12):851-867.

(165) Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2003 Jul 15;21(14):2787-2799.

(166) Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2001 Mar;8(1):3-9.

(167) Fabian MA, Biggs WH, 3rd, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, et al. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat Biotechnol* 2005 Mar;23(3):329-336.

(168) Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R. EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control* 2007 Jul;14(3):295-304.

(169) Arteaga CL. ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp Cell Res* 2003 Mar 10;284(1):122-130.

(170) Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, Benavente S, et al. Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* 2008 Jun 26;27(28):3944-3956.

(171) Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol* 2010 Sep;7(9):493-507.

(172) Morgillo F, Lee HY. Resistance to epidermal growth factor receptor-targeted therapy. *Drug Resist Updat* 2005 Oct;8(5):298-310.

(173) Camp ER, Summy J, Bauer TW, Liu W, Gallick GE, Ellis LM. Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2005 Jan 1;11(1):397-405.

(174) Bianco R, Troiani T, Tortora G, Ciardiello F. Intrinsic and acquired resistance to EGFR inhibitors in human cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2005 Jul;12 Suppl 1:S159-71.

(175) Xu Y, Liu H, Chen J, Zhou Q. Acquired resistance of lung adenocarcinoma to EGFR-tyrosine kinase inhibitors gefitinib and erlotinib. *Cancer Biol Ther* 2010 Apr;9(8):572-582.

(176) Learn CA, Hartzell TL, Wikstrand CJ, Archer GE, Rich JN, Friedman AH, et al. Resistance to tyrosine kinase inhibition by mutant epidermal growth factor receptor variant III contributes to the neoplastic phenotype of glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 2004 May 1;10(9):3216-3224.

(177) Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, Lango MN, Xi S, Hunt JL, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res* 2006 Sep 1;12(17):5064-5073.

(178) Bianco R, Damiano V, Gelardi T, Daniele G, Ciardiello F, Tortora G. Rational combination of targeted therapies as a strategy to overcome the mechanisms of resistance to inhibitors of EGFR signaling. *Curr Pharm Des* 2007;13(33):3358-3367.

(179) Dehm SM, Bonham K. SRC gene expression in human cancer: the role of transcriptional activation. *Biochem Cell Biol* 2004 Apr;82(2):263-274.

(180) Qin B, Ariyama H, Baba E, Tanaka R, Kusaba H, Harada M, et al. Activated Src and Ras induce gefitinib resistance by activation of signaling pathways downstream of epidermal growth factor receptor in human gallbladder adenocarcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006 Nov;58(5):577-584.

(181) Macaluso M, Russo G, Cinti C, Bazan V, Gebbia N, Russo A. Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *J Cell Physiol* 2002 Aug;192(2):125-130.

(182) Uchida A, Hirano S, Kitao H, Ogino A, Rai K, Toyooka S, et al. Activation of downstream epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling provides gefitinib-resistance in cells carrying EGFR mutation. *Cancer Sci* 2007 Mar;98(3):357-363.

(183) Goldman CK, Kim J, Wong WL, King V, Brock T, Gillespie GY. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell* 1993 Jan;4(1):121-133.

(184) Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 1997 Dec;151(6):1523-1530.

(185) Ciardiello F, Damiano V, Bianco R, Bianco C, Fontanini G, De Laurentiis M, et al. Antitumor activity of combined blockade of epidermal growth factor receptor and protein kinase A. *J Natl Cancer Inst* 1996 Dec 4;88(23):1770-1776.

(186) Ferrer-Soler L, Vazquez-Martin A, Brunet J, Menendez JA, De Llorens R, Colomer R. An update of the mechanisms of resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in breast cancer: Gefitinib (Iressa) -induced changes in the expression and nucleo-cytoplasmic trafficking of HER-ligands (Review). *Int J Mol Med* 2007 Jul;20(1):3-10.

(187) Li C, Iida M, Dunn EF, Ghia AJ, Wheeler DL. Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene* 2009 Oct 29;28(43):3801-3813.

(188) Ritter CA, Perez-Torres M, Rinehart C, Guix M, Dugger T, Engelman JA, et al. Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin Cancer Res* 2007 Aug 15;13(16):4909-4919.

(189) Erjala K, Sundvall M, Junttila TT, Zhang N, Savisalo M, Mali P, et al. Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2006 Jul 1;12(13):4103-4111.

(190) Sergina NV, Rausch M, Wang D, Blair J, Hann B, Shokat KM, et al. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 2007 Jan 25;445(7126):437-441.

(191) Festuccia C, Gravina GL, Millimaggi D, Muzi P, Specca S, Ricevuto E, et al. Uncoupling of the epidermal growth factor receptor from downstream signal transduction molecules guides the acquired resistance to gefitinib in prostate cancer cells. *Oncol Rep* 2007 Aug;18(2):503-511.

- (192) Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010 Mar;46(4):765-781.
- (193) Jathal MK, Chen L, Mudryj M, Ghosh PM. Targeting ErbB3: the New RTK(id) on the Prostate Cancer Block. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem* 2011 Jun;11(2):131-149.
- (194) Williams H, Powell IJ. Epidemiology, pathology, and genetics of prostate cancer among African Americans compared with other ethnicities. *Methods Mol Biol* 2009;472:439-453.
- (195) Garcia JA, Rini BI. Castration-resistant prostate cancer: many treatments, many options, many challenges ahead. *Cancer* 2012 May 15;118(10):2583-2593.
- (196) Grossmann ME, Huang H, Tindall DJ. Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001 Nov 21;93(22):1687-1697.
- (197) Scher HI, Sawyers CL. Biology of progressive, castration-resistant prostate cancer: directed therapies targeting the androgen-receptor signaling axis. *J Clin Oncol* 2005 Nov 10;23(32):8253-8261.
- (198) Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2001 Oct;1(1):34-45.
- (199) Shore N, Mason M, de Reijke TM. New developments in castrate-resistant prostate cancer. *BJU Int* 2012 Jun;109 Suppl 6:22-32.
- (200) Chi KN, Bjartell A, Dearnaley D, Saad F, Schroder FH, Sternberg C, et al. Castration-resistant prostate cancer: from new pathophysiology to new treatment targets. *Eur Urol* 2009 Oct;56(4):594-605.
- (201) Chen Y, Sawyers CL, Scher HI. Targeting the androgen receptor pathway in prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2008 Aug;8(4):440-448.
- (202) Navarro D, Luzardo OP, Fernandez L, Chesa N, Diaz-Chico BN. Transition to androgen-independence in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002 Jul;81(3):191-201.

(203) Zhu ML, Kyprianou N. Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2008 Dec;15(4):841-849.

(204) Traish AM, Morgentaler A. Epidermal growth factor receptor expression escapes androgen regulation in prostate cancer: a potential molecular switch for tumour growth. *Br J Cancer* 2009 Dec 15;101(12):1949-1956.

(205) Bonaccorsi L, Carloni V, Muratori M, Formigli L, Zecchi S, Forti G, et al. EGF receptor (EGFR) signaling promoting invasion is disrupted in androgen-sensitive prostate cancer cells by an interaction between EGFR and androgen receptor (AR). *Int J Cancer* 2004 Oct 20;112(1):78-86.

(206) Bonaccorsi L, Nosi D, Muratori M, Formigli L, Forti G, Baldi E. Altered endocytosis of epidermal growth factor receptor in androgen receptor positive prostate cancer cell lines. *J Mol Endocrinol* 2007 Feb;38(1-2):51-66.

(207) Leotoing L, Manin M, Monte D, Baron S, Communal Y, Lours C, et al. Crosstalk between androgen receptor and epidermal growth factor receptor-signalling pathways: a molecular switch for epithelial cell differentiation. *J Mol Endocrinol* 2007 Aug;39(2):151-162.

(208) Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, Ciociola A, Lombardi M, De Falco A, et al. Crosstalk between EGFR and extranuclear steroid receptors. *Ann N Y Acad Sci* 2006 Nov;1089:194-200.

(209) Gregory CW, Whang YE, McCall W, Fei X, Liu Y, Ponguta LA, et al. Heregulin-induced activation of HER2 and HER3 increases androgen receptor transactivation and CWR-R1 human recurrent prostate cancer cell growth. *Clin Cancer Res* 2005 Mar 1;11(5):1704-1712.

(210) Manin M, Baron S, Goossens K, Beaudoin C, Jean C, Veyssiere G, et al. Androgen receptor expression is regulated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in normal and tumoral epithelial cells. *Biochem J* 2002 Sep 15;366(Pt 3):729-736.

(211) Traish AM, Morgentaler A. Epidermal growth factor receptor expression escapes androgen regulation in prostate cancer: a potential molecular switch for tumour growth. *Br J Cancer* 2009 Dec 15;101(12):1949-1956.

(212) Sherwood ER, Lee C. Epidermal growth factor-related peptides and the epidermal growth factor receptor in normal and malignant prostate. *World J Urol* 1995;13(5):290-296.

(213) Craft N, Shostak Y, Carey M, Sawyers CL. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat Med* 1999 Mar;5(3):280-285.

(214) Mellingerhoff IK, Tran C, Sawyers CL. Growth inhibitory effects of the dual ErbB1/ErbB2 tyrosine kinase inhibitor PKI-166 on human prostate cancer xenografts. *Cancer Res* 2002 Sep 15;62(18):5254-5259.

(215) Mellingerhoff IK, Vivanco I, Kwon A, Tran C, Wongvipat J, Sawyers CL. HER2/neu kinase-dependent modulation of androgen receptor function through effects on DNA binding and stability. *Cancer Cell* 2004 Nov;6(5):517-527.

(216) Liu Y, Majumder S, McCall W, Sartor CI, Mohler JL, Gregory CW, et al. Inhibition of HER-2/neu kinase impairs androgen receptor recruitment to the androgen responsive enhancer. *Cancer Res* 2005 Apr 15;65(8):3404-3409.

(217) Wen Y, Hu MC, Makino K, Spohn B, Bartholomeusz G, Yan DH, et al. HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway. *Cancer Res* 2000 Dec 15;60(24):6841-6845.

(218) Neto AS, Tobias-Machado M, Wroclawski ML, Fonseca FL, Pompeo AC, Del Giglio A. Molecular oncogenesis of prostate adenocarcinoma: role of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2/neu). *Tumori* 2010 Sep-Oct;96(5):645-649.

(219) Gregory CW, Whang YE, McCall W, Fei X, Liu Y, Ponguta LA, et al. Heregulin-induced activation of HER2 and HER3 increases androgen receptor transactivation and CWR-R1 human recurrent prostate cancer cell growth. *Clin Cancer Res* 2005 Mar 1;11(5):1704-1712.

(220) Chen L, Siddiqui S, Bose S, Mooso B, Asuncion A, Bedolla RG, et al. Nrdp1-mediated regulation of ErbB3 expression by the androgen receptor in androgen-dependent but not castrate-resistant prostate cancer cells. *Cancer Res* 2010 Jul 15;70(14):5994-6003.

(221) Grasso AW, Wen D, Miller CM, Rhim JS, Pretlow TG, Kung HJ. ErbB kinases and NDF signaling in human prostate cancer cells. *Oncogene* 1997 Nov 27;15(22):2705-2716.

(222) Williams EE, Trout LJ, Gallo RM, Pitfield SE, Bryant I, Penington DJ, et al. A constitutively active ErbB4 mutant inhibits drug-resistant colony formation by the DU-145 and PC-3 human prostate tumor cell lines. *Cancer Lett* 2003 Mar 20;192(1):67-74.

(223) Edwards J, Traynor P, Munro AF, Pirret CF, Dunne B, Bartlett JM. The role of HER1-HER4 and EGFRvIII in hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006 Jan 1;12(1):123-130.

(224) Wheeler DL, Rangnekar VM, Schwarze SR. ErbB4 targeting approaches for prostate cancer treatment. *Cancer Biol Ther* 2008 Jul;7(7):1095-1097.

(225) Ben-Yosef R, Starr A, Karaush V, Loew V, Lev-Ari S, Barnea I, et al. ErbB-4 may control behavior of prostate cancer cells and serve as a target for molecular therapy. *Prostate* 2007 Jun 1;67(8):871-880.

(226) Vexler A, Lidawi G, Loew V, Barnea I, Karaush V, Lev-Ari S, et al. Anti-ERBB4 targeted therapy combined with radiation therapy in prostate cancer. Results of in vitro and in vivo studies. *Cancer Biol Ther* 2008 Jul;7(7):1090-1094.

(227) Topping N, Jorgensen PE, Sorensen BS, Nexø E. Increased expression of heparin binding EGF (HB-EGF), amphiregulin, TGF alpha and epiregulin in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Anticancer Res* 2000 Jan-Feb;20(1A):91-95.

(228) Gregory CW, Fei X, Ponguta LA, He B, Bill HM, French FS, et al. Epidermal growth factor increases coactivation of the androgen receptor in recurrent prostate cancer. *J Biol Chem* 2004 Feb 20;279(8):7119-7130.

(229) Hofer DR, Sherwood ER, Bromberg WD, Mendelsohn J, Lee C, Kozlowski JM. Autonomous growth of androgen-independent human prostatic carcinoma cells: role of transforming growth factor alpha. *Cancer Res* 1991 Jun 1;51(11):2780-2785.

(230) Tillotson JK, Rose DP. Endogenous secretion of epidermal growth factor peptides stimulates growth of DU145 prostate cancer cells. *Cancer Lett* 1991 Nov;60(2):109-112.

- (231) Bellezza I, Bracarda S, Caserta C, Minelli A. Targeting of EGFR tyrosine kinase by ZD1839 ("Iressa") in androgen-responsive prostate cancer in vitro. *Mol Genet Metab* 2006 Jun;88(2):114-122.
- (232) Formento P, Hannoun-Levi JM, Fischel JL, Magne N, Etienne-Grimaldi MC, Milano G. Dual HER 1-2 targeting of hormone-refractory prostate cancer by ZD1839 and trastuzumab. *Eur J Cancer* 2004 Dec;40(18):2837-2844.
- (233) Festuccia C, Gravina GL, Biordi L, D'Ascenzo S, Dolo V, Ficorella C, et al. Effects of EGFR tyrosine kinase inhibitor erlotinib in prostate cancer cells in vitro. *Prostate* 2009 Oct 1;69(14):1529-1537.
- (234) Dhupkar P, Dowling M, Cengel K, Chen B. Effects of anti-EGFR antibody cetuximab on androgen-independent prostate cancer cells. *Anticancer Res* 2010 Jun;30(6):1905-1910.
- (235) Ziada A, Barqawi A, Glode LM, Varella-Garcia M, Crichton F, Majeski S, et al. The use of trastuzumab in the treatment of hormone refractory prostate cancer; phase II trial. *Prostate* 2004 Sep 1;60(4):332-337.
- (236) Liu G, Chen YH, Kolesar J, Huang W, Dipaola R, Pins M, et al. Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Trial of lapatinib in men with biochemically relapsed, androgen dependent prostate cancer(.). *Urol Oncol* 2011 Jul 22.
- (237) Gross M, Higano C, Pantuck A, Castellanos O, Green E, Nguyen K, et al. A phase II trial of docetaxel and erlotinib as first-line therapy for elderly patients with androgen-independent prostate cancer. *BMC Cancer* 2007 Jul 27;7:142.
- (238) Salzberg M, Rochlitz C, Morant R, Thalmann G, Pedrazzini A, Roggero E, et al. An open-label, noncomparative phase II trial to evaluate the efficacy and safety of docetaxel in combination with gefitinib in patients with hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Onkologie* 2007 Jul;30(7):355-360.
- (239) de Bono JS, Bellmunt J, Attard G, Droz JP, Miller K, Flechon A, et al. Open-label phase II study evaluating the efficacy and safety of two doses of pertuzumab in castrate chemotherapy-naïve patients with hormone-refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 2007 Jan 20;25(3):257-262.
- (240) Moradell S, Lorenzo J, Rovira A, Robillard MS, Aviles FX, Moreno V, et al. Platinum complexes of diamminocarboxylic acids and their ethyl ester

derivatives: the effect of the chelate ring size on antitumor activity and interactions with GMP and DNA. *J Inorg Biochem* 2003 Sep 1;96(4):493-502.

(241) Barragan F, Carrion-Salip D, Gomez-Pinto I, Gonzalez-Canto A, Sadler PJ, de Llorens R, et al. Somatostatin subtype-2 receptor-targeted metal-based anticancer complexes. *Bioconj Chem* 2012 Sep 19;23(9):1838-1855.

(242) van Rijt SH, Peacock AF, Johnstone RD, Parsons S, Sadler PJ. Organometallic osmium(II) arene anticancer complexes containing picolinate derivatives. *Inorg Chem* 2009 Feb 16;48(4):1753-1762.

(243) D'Addona D, Carotenuto A, Novellino E, Piccand V, Reubi JC, Di Cianni A, et al. Novel sst5-selective somatostatin dicarba-analogues: synthesis and conformation-affinity relationships. *J Med Chem* 2008 Feb 14;51(3):512-520.

(244) Barragan F, Moreno V, Marchan V. Solid-phase synthesis and DNA binding studies of dichloroplatinum(II) conjugates of dicarba analogues of octreotide as new anticancer drugs. *Chem Commun (Camb)* 2009 Aug 21;(31):4705-4707.

(245) Hodson E, Simpson SJ. Synthesis and characterisation of [(η⁶-cymene)Ru(L)X₂] compounds: single crystal X-ray structure of [(η⁶-cymene)Ru(P(OPh)₃)Cl₂] at 203 K. *Polyhedron* 2004 11/11;23(17):2695-2707.

(246) Chaplin A, Dyson P. Catalytic Activity of Bis-phosphine Ruthenium(II)-Arene Compounds: Structure Activity Correlations. *Organometallics* 2007;26(9):2447.

(247) Marchan V, Moreno V, Pedroso E, Grandas A. Towards a better understanding of the cisplatin mode of action. *Chemistry* 2001;7(4):808-815.

(248) Marchan V, Pedroso E, Grandas A. Insights into the reaction of transplatin with DNA and proteins: methionine-mediated formation of histidine-guanine trans-Pt(NH₃)₂ cross-links. *Chemistry* 2004 Oct 25;10(21):5369-5375.

(249) Alguero B, Lopez de la Osa J, Gonzalez C, Pedroso E, Marchan V, Grandas A. Selective platination of modified oligonucleotides and duplex cross-links. *Angew Chem Int Ed Engl* 2006 Dec 11;45(48):8194-8197.

(250) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

(251) Grunwald V, DeGraffenried L, Russel D, Friedrichs WE, Ray RB, Hidalgo M. Inhibitors of mTOR reverse doxorubicin resistance conferred by PTEN status in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002 Nov 1;62(21):6141-6145.

(252) Taboada GF, Luque RM, Bastos W, Guimaraes RF, Marcondes JB, Chimelli LM, et al. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 2007 Jan;156(1):65-74.

(253) Grace CR, Erchegyi J, Koerber SC, Reubi JC, Rivier J, Riek R. Novel sst2-selective somatostatin agonists. Three-dimensional consensus structure by NMR. *J Med Chem* 2006 Jul 27;49(15):4487-4496.

(254) Jhaveri MS, Rait AS, Chung KN, Trepel JB, Chang EH. Antisense oligonucleotides targeted to the human alpha folate receptor inhibit breast cancer cell growth and sensitize the cells to doxorubicin treatment. *Mol Cancer Ther* 2004 Dec;3(12):1505-1512.

(255) Meier R, Henning TD, Boddington S, Tavri S, Arora S, Piontek G, et al. Breast cancers: MR imaging of folate-receptor expression with the folate-specific nanoparticle P1133. *Radiology* 2010 May;255(2):527-535.

(256) Mendelsohn J. Antibody-mediated EGF receptor blockade as an anticancer therapy: from the laboratory to the clinic. *Cancer Immunol Immunother* 2003 May;52(5):342-346.

(257) Brader S, Eccles SA. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in tumor progression, invasion and angiogenesis. *Tumori* 2004 Jan-Feb;90(1):2-8.

(258) Festuccia C, Muzi P, Millimaggi D, Biordi L, Gravina GL, Specca S, et al. Molecular aspects of gefitinib antiproliferative and pro-apoptotic effects in PTEN-positive and PTEN-negative prostate cancer cell lines. *Endocr Relat Cancer* 2005 Dec;12(4):983-998.

(259) Wang G, Reed E, Li QQ. Apoptosis in prostate cancer: progressive and therapeutic implications (Review). *Int J Mol Med* 2004 Jul;14(1):23-34.

(260) Pinkas-Kramarski R, Lenferink AE, Bacus SS, Lyass L, van de Poll ML, Klapper LN, et al. The oncogenic ErbB-2/ErbB-3 heterodimer is a surrogate receptor of the epidermal growth factor and betacellulin. *Oncogene* 1998 Mar 12;16(10):1249-1258.

(261) Montero JC, Rodriguez-Barrueco R, Ocana A, Diaz-Rodriguez E, Esparis-Ogando A, Pandiella A. Neuregulins and cancer. *Clin Cancer Res* 2008 Jun 1;14(11):3237-3241.

(262) Soltoff SP, Carraway KL, 3rd, Prigent SA, Gullick WG, Cantley LC. ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1994 Jun;14(6):3550-3558.

(263) Kim HH, Sierke SL, Koland JG. Epidermal growth factor-dependent association of phosphatidylinositol 3-kinase with the erbB3 gene product. *J Biol Chem* 1994 Oct 7;269(40):24747-24755.

(264) Dua R, Zhang J, Nhonthachit P, Penuel E, Petropoulos C, Parry G. EGFR over-expression and activation in high HER2, ER negative breast cancer cell line induces trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res Treat* 2010 Aug;122(3):685-697.

(265) Berners-Price SJ, Kuchel PW. Reaction of cis- and trans-[PtCl₂(NH₃)₂] with reduced glutathione inside human red blood cells, studied by ¹H and ¹⁵N-[¹H] DEPT NMR. *J Inorg Biochem* 1990 Apr;38(4):327-345.

(266) Wei H, Wang X, Liu Q, Mei Y, Lu Y, Guo Z. Disulfide bond cleavage induced by a platinum(II) methionine complex. *Inorg Chem* 2005 Aug 22;44(17):6077-6081.

(267) Lippert B. Cisplatin :chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. Zürich: Helvetica Chimica Acta; 1999.

(268) Huang CM, Wu YT, Chen ST. Targeting delivery of paclitaxel into tumor cells via somatostatin receptor endocytosis. *Chem Biol* 2000 Jul;7(7):453-461.

(269) Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv Drug Deliv Rev* 2002 Jun 17;54(4):459-476.

(270) Veronese FM, Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today* 2005 Nov 1;10(21):1451-1458.

(271) Peacock AF, Parsons S, Sadler PJ. Tuning the hydrolytic aqueous chemistry of osmium arene complexes with N,O-chelating ligands to achieve cancer cell cytotoxicity. *J Am Chem Soc* 2007 Mar 21;129(11):3348-3357.

(272) van Rijt SH, Mukherjee A, Pizarro AM, Sadler PJ. Cytotoxicity, hydrophobicity, uptake, and distribution of osmium(II) anticancer complexes in ovarian cancer cells. *J Med Chem* 2010 Jan 28;53(2):840-849.

(273) Moreno V, Font-Bardia M, Calvet T, Lorenzo J, Aviles FX, Garcia MH, et al. DNA interaction and cytotoxicity studies of new ruthenium(II) cyclopentadienyl derivative complexes containing heteroaromatic ligands. *J Inorg Biochem* 2011 Feb;105(2):241-249.

(274) Wang F, Habtemariam A, van der Geer EP, Fernandez R, Melchart M, Deeth RJ, et al. Controlling ligand substitution reactions of organometallic complexes: tuning cancer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Dec 20;102(51):18269-18274.

(275) Jennerwein M, Andrews PA. Effect of intracellular chloride on the cellular pharmacodynamics of cis-diamminedichloroplatinum(II). *Drug Metab Dispos* 1995 Feb;23(2):178-184.

(276) Liu HK, Wang F, Parkinson JA, Bella J, Sadler PJ. Ruthenation of duplex and single-stranded d(CGGCCG) by organometallic anticancer complexes. *Chemistry* 2006 Aug 7;12(23):6151-6165.

(277) Gossens C, Tavernelli I, Rothlisberger U. Binding of organometallic ruthenium(II) anticancer compounds to nucleobases: a computational study. *J Phys Chem A* 2009 Oct 29;113(43):11888-11897.

(278) Hornick CA, Anthony CT, Hughey S, Gebhardt BM, Espenan GD, Woltering EA. Progressive nuclear translocation of somatostatin analogs. *J Nucl Med* 2000 Jul;41(7):1256-1263.

(279) Watson JC, Balster DA, Gebhardt BM, O'Dorisio TM, O'Dorisio MS, Espenan GD, et al. Growing vascular endothelial cells express somatostatin subtype 2 receptors. *Br J Cancer* 2001 Jul 20;85(2):266-272.

(280) Wynants C, Van Binst G, Loosli HR. SMS 201-995, a very potent analogue of somatostatin. Assignment of the ^1H 500 MHz n.m.r. spectra and conformational analysis in aqueous solution. *Int J Pept Protein Res* 1985 Jun;25(6):608-614.

(281) Wynants C, Van Binst G, Loosli HR. SMS 201-995, an octapeptide somatostatin analogue. Assignment of the ^1H 500 MHz n.m.r. spectra and

conformational analysis of SMS 201-995 in dimethylsulfoxide. *Int J Pept Protein Res* 1985 Jun;25(6):615-621.

(282) Melacini G, Zhu Q, Goodman M. Multiconformational NMR analysis of sandostatin (octreotide): equilibrium between beta-sheet and partially helical structures. *Biochemistry* 1997 Feb 11;36(6):1233-1241.

(283) Deshmukh MV, Voll G, Kuhlewein A, Macke H, Schmitt J, Kessler H, et al. NMR studies reveal structural differences between the gallium and yttrium complexes of DOTA-D-Phe1-Tyr3-octreotide. *J Med Chem* 2005 Mar 10;48(5):1506-1514.

(284) Zhang J, Jin W, Wang X, Wang J, Zhang X, Zhang Q. A novel octreotide modified lipid vesicle improved the anticancer efficacy of doxorubicin in somatostatin receptor 2 positive tumor models. *Mol Pharm* 2010 Aug 2;7(4):1159-1168.

(285) Cascini GL, Cuccurullo V, Mansi L. The non tumour uptake of (111)In-octreotide creates new clinical indications in benign diseases, but also in oncology. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2010 Feb;54(1):24-36.

(286) Splith K, Hu W, Schatzschneider U, Gust R, Ott I, Onambele LA, et al. Protease-activatable organometal-Peptide bioconjugates with enhanced cytotoxicity on cancer cells. *Bioconjug Chem* 2010 Jul 21;21(7):1288-1296.

(287) Lu Y, Low PS. Immunotherapy of folate receptor-expressing tumors: review of recent advances and future prospects. *J Control Release* 2003 Aug 28;91(1-2):17-29.

(288) Holford J, Raynaud F, Murrer BA, Grimaldi K, Hartley JA, Abrams M, et al. Chemical, biochemical and pharmacological activity of the novel sterically hindered platinum co-ordination complex, cis-[amminedichloro(2-methylpyridine)] platinum(II) (AMD473). *Anticancer Drug Des* 1998 Jan;13(1):1-18.

(289) Holford J, Beale PJ, Boxall FE, Sharp SY, Kelland LR. Mechanisms of drug resistance to the platinum complex ZD0473 in ovarian cancer cell lines. *Eur J Cancer* 2000 Oct;36(15):1984-1990.

- (290) Holford J, Sharp SY, Murrer BA, Abrams M, Kelland LR. In vitro circumvention of cisplatin resistance by the novel sterically hindered platinum complex AMD473. *Br J Cancer* 1998;77(3):366-373.
- (291) Ross JF, Chaudhuri PK, Ratnam M. Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications. *Cancer* 1994 May 1;73(9):2432-2443.
- (292) Sulistio A, Lowenthal J, Blencowe A, Bongiovanni MN, Ong L, Gras SL, et al. Folic acid conjugated amino acid-based star polymers for active targeting of cancer cells. *Biomacromolecules* 2011 Oct 10;12(10):3469-3477.
- (293) Okarvi SM, Jammaz IA. Preparation and in vitro and in vivo evaluation of technetium-99m-labeled folate and methotrexate conjugates as tumor imaging agents. *Cancer Biother Radiopharm* 2006 Feb;21(1):49-60.
- (294) Hall MD, Alderden RA, Zhang M, Beale PJ, Cai Z, Lai B, et al. The fate of platinum(II) and platinum(IV) anti-cancer agents in cancer cells and tumours. *J Struct Biol* 2006 Jul;155(1):38-44.
- (295) Xiao H, Qi R, Liu S, Hu X, Duan T, Zheng Y, et al. Biodegradable polymer - cisplatin(IV) conjugate as a pro-drug of cisplatin(II). *Biomaterials* 2011 Oct;32(30):7732-7739.
- (296) Lee JW, Lu JY, Low PS, Fuchs PL. Synthesis and evaluation of taxol-folic acid conjugates as targeted antineoplastics. *Bioorg Med Chem* 2002 Jul;10(7):2397-2414.
- (297) Leamon CP, Reddy JA, Vlahov IR, Westrick E, Parker N, Nicoson JS, et al. Comparative preclinical activity of the folate-targeted Vinca alkaloid conjugates EC140 and EC145. *Int J Cancer* 2007 Oct 1;121(7):1585-1592.
- (298) Yang J, Chen H, Vlahov IR, Cheng JX, Low PS. Characterization of the pH of folate receptor-containing endosomes and the rate of hydrolysis of internalized acid-labile folate-drug conjugates. *J Pharmacol Exp Ther* 2007 May;321(2):462-468.
- (299) Parker N, Turk MJ, Westrick E, Lewis JD, Low PS, Leamon CP. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Anal Biochem* 2005 Mar 15;338(2):284-293.

(300) Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006 Feb 9;354(6):567-578.

(301) Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, Natale RB, Miller V, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol* 2004 Mar 1;22(5):785-794.

(302) Thatcher N, Chang A, Parikh P, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, von Pawel J, et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* 2005 Oct 29-Nov 4;366(9496):1527-1537.

(303) Borner M, Koeberle D, Von Moos R, Saletti P, Rauch D, Hess V, et al. Adding cetuximab to capecitabine plus oxaliplatin (XELOX) in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: a randomized phase II trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research SAKK. *Ann Oncol* 2008 Jul;19(7):1288-1292.

(304) Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, Lutz MP, et al. EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008 May 10;26(14):2311-2319.

(305) Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007 May 20;25(15):1960-1966.

(306) Senderowicz AM, Johnson JR, Sridhara R, Zimmerman P, Justice R, Pazdur R. Erlotinib/gemcitabine for first-line treatment of locally advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Oncology (Williston Park)* 2007 Dec;21(14):1696-706; discussion 1706-9, 1712, 1715.

(307) Di Leo A, Gomez HL, Aziz Z, Zvirbule Z, Bines J, Arbushites MC, et al. Phase III, double-blind, randomized study comparing lapatinib plus paclitaxel with placebo plus paclitaxel as first-line treatment for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2008 Dec 1;26(34):5544-5552.

(308) Engelman JA, Janne PA. Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008 May 15;14(10):2895-2899.

(309) Yamasaki F, Johansen MJ, Zhang D, Krishnamurthy S, Felix E, Bartholomeusz C, et al. Acquired resistance to erlotinib in A-431 epidermoid cancer cells requires down-regulation of MMAC1/PTEN and up-regulation of phosphorylated Akt. *Cancer Res* 2007 Jun 15;67(12):5779-5788.

(310) Kwak EL, Sordella R, Bell DW, Godin-Heymann N, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 May 24;102(21):7665-7670.

(311) Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005 Mar;2(3):e73.

(312) Vilorio-Petit A, Crombet T, Jothy S, Hicklin D, Bohlen P, Schlaepfli JM, et al. Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo: a role for altered tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2001 Jul 1;61(13):5090-5101.

(313) Vilorio-Petit AM, Kerbel RS. Acquired resistance to EGFR inhibitors: mechanisms and prevention strategies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004 Mar 1;58(3):914-926.

(314) Koutsopoulos AV, Mavroudis D, Dambaki KI, Souglakos J, Tzortzaki EG, Drositis J, et al. Simultaneous expression of c-erbB-1, c-erbB-2, c-erbB-3 and c-erbB-4 receptors in non-small-cell lung carcinomas: correlation with clinical outcome. *Lung Cancer* 2007 Aug;57(2):193-200.

(315) Onn A, Correa AM, Gilcrease M, Isobe T, Massarelli E, Bucana CD, et al. Synchronous overexpression of epidermal growth factor receptor and HER2-neu protein is a predictor of poor outcome in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004 Jan 1;10(1 Pt 1):136-143.

(316) Chow NH, Chan SH, Tzai TS, Ho CL, Liu HS. Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2001 Jul;7(7):1957-1962.

(317) Wiseman SM, Makretsov N, Nielsen TO, Gilks B, Yorida E, Cheang M, et al. Coexpression of the type 1 growth factor receptor family members HER-1, HER-2, and HER-3 has a synergistic negative prognostic effect on breast carcinoma survival. *Cancer* 2005 May 1;103(9):1770-1777.

(318) Shah RB, Ghosh D, Elder JT. Epidermal growth factor receptor (ErbB1) expression in prostate cancer progression: correlation with androgen independence. *Prostate* 2006 Sep 15;66(13):1437-1444.

(319) Topping N, Hansen FD, Sorensen BS, Orntoft TF, Nexø E. Increase in amphiregulin and epiregulin in prostate cancer xenograft after androgen deprivation-impact of specific HER1 inhibition. *Prostate* 2005 Jun 15;64(1):1-8.

(320) Scher HI, Sarkis A, Reuter V, Cohen D, Netto G, Petrylak D, et al. Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in the progression of prostatic neoplasms. *Clin Cancer Res* 1995 May;1(5):545-550.

(321) Liu XH, Wiley HS, Meikle AW. Androgens regulate proliferation of human prostate cancer cells in culture by increasing transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) and epidermal growth factor (EGF)/TGF-alpha receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1993 Dec;77(6):1472-1478.

(322) Myers RB, Kudlow JE, Grizzle WE. Expression of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor and the epidermal growth factor receptor in adenocarcinoma of the prostate and benign prostatic hyperplasia. *Mod Pathol* 1993 Nov;6(6):733-737.

(323) Ching KZ, Ramsey E, Pettigrew N, D'Cunha R, Jason M, Dodd JG. Expression of mRNA for epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and their receptor in human prostate tissue and cell lines. *Mol Cell Biochem* 1993 Sep 22;126(2):151-158.

(324) Vlietstra RJ, van Alewijk DC, Hermans KG, van Steenbrugge GJ, Trapman J. Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts. *Cancer Res* 1998 Jul 1;58(13):2720-2723.

(325) Kong A, Calleja V, Leboucher P, Harris A, Parker PJ, Larijani B. HER2 oncogenic function escapes EGFR tyrosine kinase inhibitors via activation of alternative HER receptors in breast cancer cells. *PLoS One* 2008 Aug 6;3(8):e2881.

(326) Hsieh AC, Moasser MM. Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. *Br J Cancer* 2007 Aug 20;97(4):453-457.

(327) Soler M, Mancini F, Meca-Cortes O, Sanchez-Cid L, Rubio N, Lopez-Fernandez S, et al. HER3 is required for the maintenance of neuregulin-dependent and -independent attributes of malignant progression in prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2009 Dec 1;125(11):2565-2575.

(328) Hutchesson IR, Knowlden JM, Hiscox SE, Barrow D, Gee JM, Robertson JF, et al. Heregulin beta1 drives gefitinib-resistant growth and invasion in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2007;9(4):R50.

(329) de Alava E, Ocana A, Abad M, Montero JC, Esparis-Ogando A, Rodriguez CA, et al. Neuregulin expression modulates clinical response to trastuzumab in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2007 Jul 1;25(19):2656-2663.

(330) Motoyama AB, Hynes NE, Lane HA. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* 2002 Jun 1;62(11):3151-3158.

(331) Normanno N, De Luca A, Maiello MR, Campiglio M, Napolitano M, Mancino M, et al. The MEK/MAPK pathway is involved in the resistance of breast cancer cells to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib. *J Cell Physiol* 2006 May;207(2):420-427.

**Anàlisi de la vehiculització
de compostos metàl·lics
com a agents antitumorals
i de la família HER-EGF en la
resistència als tractaments
oncològics**

8 Annex 1

Barragán F, Carrion-Salip D, Gómez-Pinto I, González-Cantó A, Sadler PJ, de Llorens R, Moreno V, González C, Massaguer A, Marchán V. "Somatostatin subtype-2 receptor-targeted metal-based anticancer complexes". *Bioconjugate Chemistry*. Vol. 23, issue 9 (2012) : 1838-1855

<http://dx.doi.org/10.1021/bc300173h>

Copyright © 2012 American Chemical Society

Somatostatin Subtype-2 Receptor-Targeted Metal-Based Anticancer Complexes

Flavia Barragán,^{†,‡,#} Dolors Carrion-Salip,^{§,#} Irene Gómez-Pinto,[⊥] Alejandro González-Cantó,^{†,‡} Peter J. Sadler,^{||} Rafael de Llorens,[§] Virtudes Moreno,[‡] Carlos González,[⊥] Anna Massaguer,^{*,§} and Vicente Marchán^{*,†}

[†]Departament de Química Orgànica and IBUB and [‡]Departament de Química Inorgànica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Spain

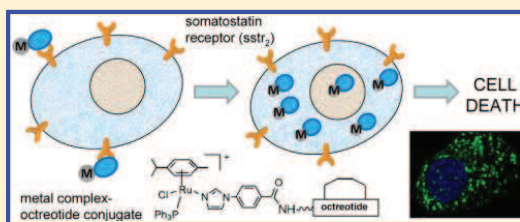
[§]Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus Montilivi, E-17071 Girona, Spain

[⊥]Instituto de Química-Física "Rocasolano", CSIC, Serrano 119, E-28006, Madrid, Spain

^{||}Department of Chemistry, University of Warwick, Coventry, CV4 7AL, United Kingdom

S Supporting Information

ABSTRACT: Conjugates of a dicarba analogue of octreotide, a potent somatostatin agonist whose receptors are overexpressed on tumor cells, with [PtCl₂(dap)] (dap = 1-(carboxylic acid)-1,2-diaminoethane) (3), [(η²-bip)Os(4-CO₂-pico)Cl] (bip = biphenyl, pico = picolinate) (4), [(η⁶-*p*-cym)RuCl(dap)]⁺ (*p*-cym = *p*-cymene) (5), and [(η⁶-*p*-cym)RuCl(imidazole-CO₂H)(PPh₃)]⁺ (6), were synthesized by using a solid-phase approach. Conjugates 3–5 readily underwent hydrolysis and DNA binding, whereas conjugate 6 was inert to ligand substitution. NMR spectroscopy and molecular dynamics calculations showed that conjugate formation does not perturb the overall peptide structure. Only 6 exhibited antiproliferative activity in human tumor cells (IC₅₀ = 63 ± 2 μM in MCF-7 cells and IC₅₀ = 26 ± 3 μM in DU-145 cells) with active participation of somatostatin receptors in cellular uptake. Similar cytotoxic activity was found in a normal cell line (IC₅₀ = 45 ± 2.6 μM in CHO cells), which can be attributed to a similar level of expression of somatostatin subtype-2 receptor. These studies provide new insights into the effect of receptor-binding peptide conjugation on the activity of metal-based anticancer drugs, and demonstrate the potential of such hybrid compounds to target tumor cells specifically.



■ INTRODUCTION

The overexpression of the receptors for many regulatory peptides in human tumor cells in comparison to their expression in normal cells has prompted research on the use of such peptides in tumor targeting for both diagnostic and therapeutic purposes.^{1–3} From the therapeutic point of view, a promising approach for the treatment of cancer consists of the attachment of a cytotoxic drug to a peptide moiety with the aim of improving its activity and bioavailability. This targeted anticancer strategy will result in therapeutic agents with increased tumor selectivity and decreased toxicity in normal tissues.

Among natural receptor-binding peptides, the neuroendocrine hormone somatostatin and its analogues have received much attention because of their high affinity against its five human receptors (sst₁–sst₅).^{1,3,4} These receptors are overexpressed in various major tumor types, including lung, breast, prostate, adrenal, and neuroendocrine tumors in comparison with normal tissues.⁵ The successful use of radiolabeled somatostatin for imaging and radionuclide therapy has prompted the development of new cyclic and acyclic analogues

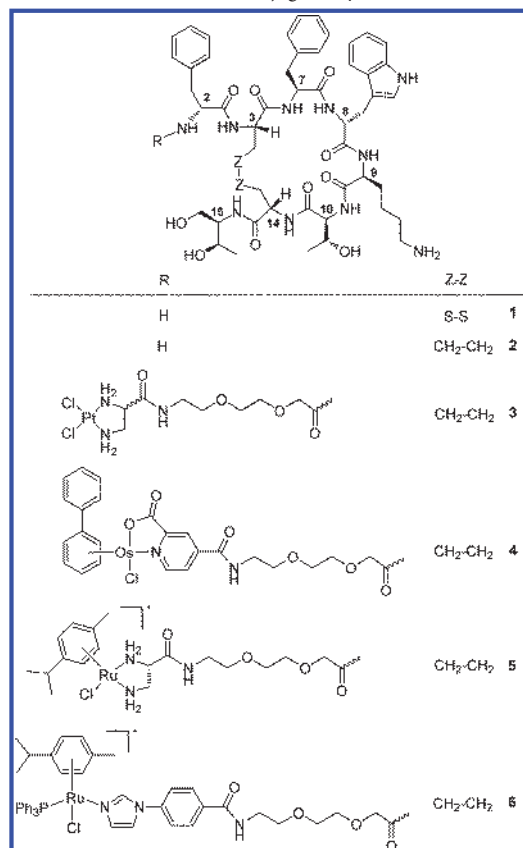
with better receptor affinity and higher stability under physiological conditions.⁶

Octreotide,⁷ 1 (Chart 1), a metabolically stabilized cyclopeptide analogue of somatostatin that includes *D*-amino acids to enhance resistance to enzymatic degradation and a cysteine bridge to stabilize the pharmacophore β-turn, is particularly interesting because of its high affinity and selectivity for the receptor sst₂,⁶ which is the receptor subtype most frequently found on tumor cells. This selectivity has allowed the development of derivatives such as [¹¹¹In-DTPA]-octreotide and [⁹⁰Y-DOTA-Tyr³]-octreotide which are used in the clinics for molecular imaging and therapy of neuroendocrine tumors, respectively.⁸ Octreotide has also been conjugated to cytotoxic organic compounds such as doxorubicin, camptothecin, and paclitaxel, with promising results in some cases because of the reduced toxicity and the increased selectivity of the conjugates compared with that of the free drug.^{4,9}

Received: March 30, 2012

Revised: August 6, 2012

Published: August 8, 2012

Chart 1. Structure of the Conjugates Synthesized^a

^aNumbering of the amino acid residues follows that of native somatostatin.

Despite the successful history of cisplatin and its second-generation derivatives (carboplatin and oxaliplatin) in the treatment of some types of cancer,¹⁰ the severe toxic side-effects and the acquired or intrinsic resistance of certain tumors has focused research on other metal-based complexes in an effort to develop improved chemotherapeutic agents.^{11,12} Indeed, in addition to several platinum compounds, two ruthenium(III) coordination complexes, *trans*-[RuCl₄(DMSO)-(Im)]ImH (NAMI-A) and *trans*-[RuCl₄(Ind)₂]IndH (NKP-1339), are currently on clinical trials.^{13,14}

In recent years, research on bioinorganic chemistry has also been focused on organometallic ruthenium(II) and osmium(II) arene complexes, since these compounds have shown promising *in vitro* and *in vivo* anticancer activities, including cell lines that have become resistant to cisplatin.^{15–19} Ruthenium and its heavier congener osmium offer several advantages in comparison with platinum compounds, including the ability to bind to a wide variety of types of ligands, the availability of additional coordination sites in octahedral complexes, the possibility of controlling the shape of the complex, and the changes in the oxidation state. It is also particularly relevant that they have the capacity to undergo

ligand exchange in a similar way to cisplatin, which makes them particularly attractive for developing new anticancer drugs. Unlike cisplatin, which has two reactive Pt–Cl coordination bonds, some active organometallic piano-stool complexes have only one reactive site (Ru/Os–Cl). The aquation of the chlorido complexes, mostly suppressed in extracellular fluids (chloride concentration ~100 mM), is triggered inside the cell nucleus by the low chloride concentration (4 mM), allowing the interaction of the active aqua species with biomolecules such as DNA.^{20–22}

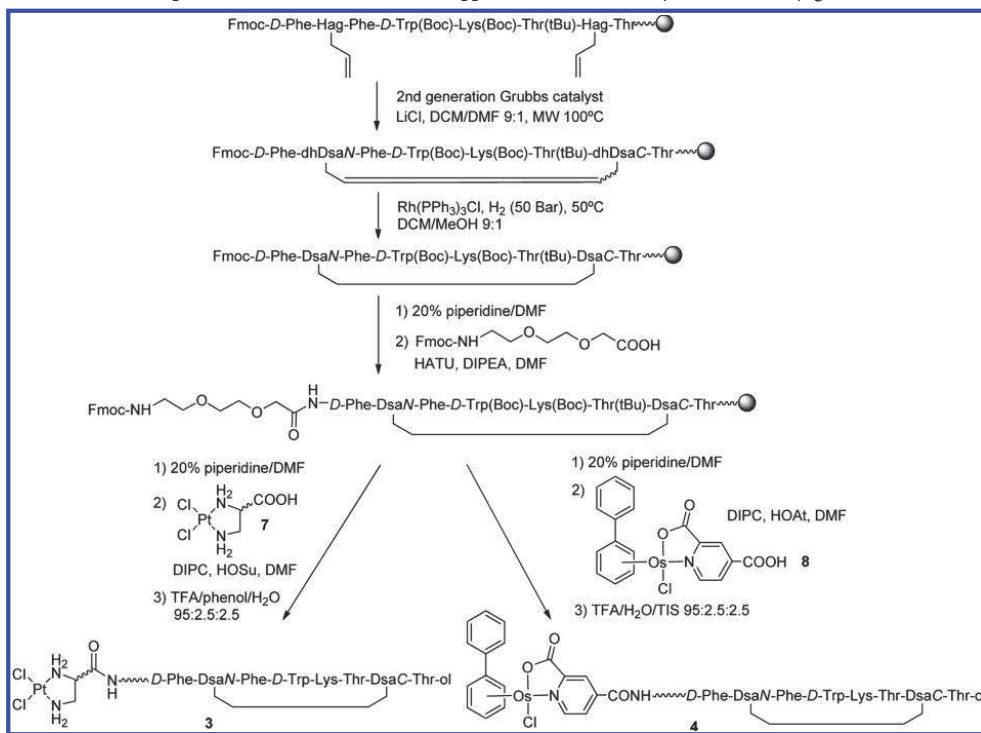
On the basis of these precedents, a promising approach in the search of new metal-based anticancer drugs would consist of the conjugation of platinum and classical nonplatinum metal complexes (e.g., ruthenium and osmium) to carrier molecules such as receptor-binding peptides. Indeed, given the over-expression of selective receptors for these peptides on the membrane of tumoral cells, it is expected that the peptide sequences will have a positive effect on the therapeutic properties of the metal-based drug (e.g., reduction of the toxic side-effects) since they will act as a “tumour-targeting devices”. With this idea in mind, we have synthesized conjugates between a dichloridoplatinum(II) complex and octreotide derivatives in which the disulfide bond had been replaced by CH₂–CH₂ or CH=CH linkages.²³ This chemical modification on the peptide does not substantially alter the binding affinity of the dicarba-octreotide analogues for the sst₂ receptor but increases the stability of the carrier biomolecule in the reductive cellular environment.²⁴ In addition, we have recently described the synthesis and DNA ruthenation under visible light irradiation of a photoactivated ruthenium(II) arene complex conjugated to a dicarba analogue of octreotide.²⁵ In recent years, several coordination or organometallic complexes have also been conjugated to carrier molecules such as receptor-binding peptides or known delivery peptides to improve both cellular uptake to cancer cells and cytotoxic activity of the metal-based drug.^{26–33}

Herein, we report on the use of conjugates between octreotide and several metal complexes as new chemotherapeutic agents. In particular, the synthesis of hybrid compounds between the dicarba analogue of octreotide (2) and platinum(II), ruthenium(II), and osmium(II) metal complexes has been accomplished by efficient solid-phase procedures (compounds 3–6 in Chart 1). The influence of the attachment of the metal complex on the structure of octreotide has been studied by NMR spectroscopy and molecular dynamics, as well as the capacity of these conjugates to bind DNA. Finally, cellular uptake and cytotoxicity studies have been carried out in a normal cell line and two human tumoral cell lines.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials and Methods. Unless otherwise stated, common chemicals and solvents (HPLC-grade or reagent-grade quality) were purchased from commercial sources and used without further purification. Peptide-grade DMF was from Scharlau. Fmoc-protected amino acids, resins, and coupling reagents for solid-phase synthesis were obtained from Novabiochem, Bachem, or Iris Biotech. Fmoc-Hag-OH was purchased from Bachem. Fmoc-L-threoninol *p*-carboxyacetate was synthesized following previously reported procedures.³⁴ Solid-phase syntheses were performed manually in a polypropylene syringe fitted with a polyethylene disk. Second-generation Grubbs catalyst and Wilkinson’s catalyst were purchased from Aldrich.

Scheme 1. Schematic Representation of the Solid-Phase Approach Used for the Synthesis of Conjugates 3 and 4



Milli-Q water with 1% HNO_3 . The ruthenium standard (High-Purity Standards, $1000 \mu\text{g}/\text{mL} \pm 5 \mu\text{g}/\text{mL}$ in 2% HCl) was diluted with Milli-Q water to 100 ppb. Ruthenium standards were freshly prepared in Milli-Q water with 1% HNO_3 before each experiment. The concentrations used for the calibration curve were in all cases 0, 1, 2, 5, and 10 ppb. The isotope detected was ^{101}Ru and readings were made in triplicate. Rhodium was added as an internal standard at a concentration of 10 ppb in all samples.

SSTR2 Expression Analysis. SSTR2 expression on MCF-7, DU-145, and CHO cells surface was determined by double immunofluorescence. The cells were first fixed with PBS-1.5% formaldehyde and permeabilized with PBS-0.2% Tween 20 (Biorad). Then, the cells were incubated with a monoclonal antibody against human sst_2 receptor (R&D systems) during 30 min at 4°C . After rinsing the cells with PBS, the cells were incubated 30 min at 4°C in the presence of the Alexa-Fluor 488 conjugated goat antimouse IgG antibody (Invitrogen). Cells were washed again, and the fluorescence was analyzed using a flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) equipped with the CellQuest software (Becton Dickinson). The fluorescence intensity of the cells was represented on a 4 orders of magnitude log scale (1–10 000). Ten thousand cells were analyzed in each experiment.

Statistical Analysis. The statistical analysis was performed with the SPSS statistical software for Windows (v 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Quantitative variables were expressed as mean and standard error (SE). The normality of the data was

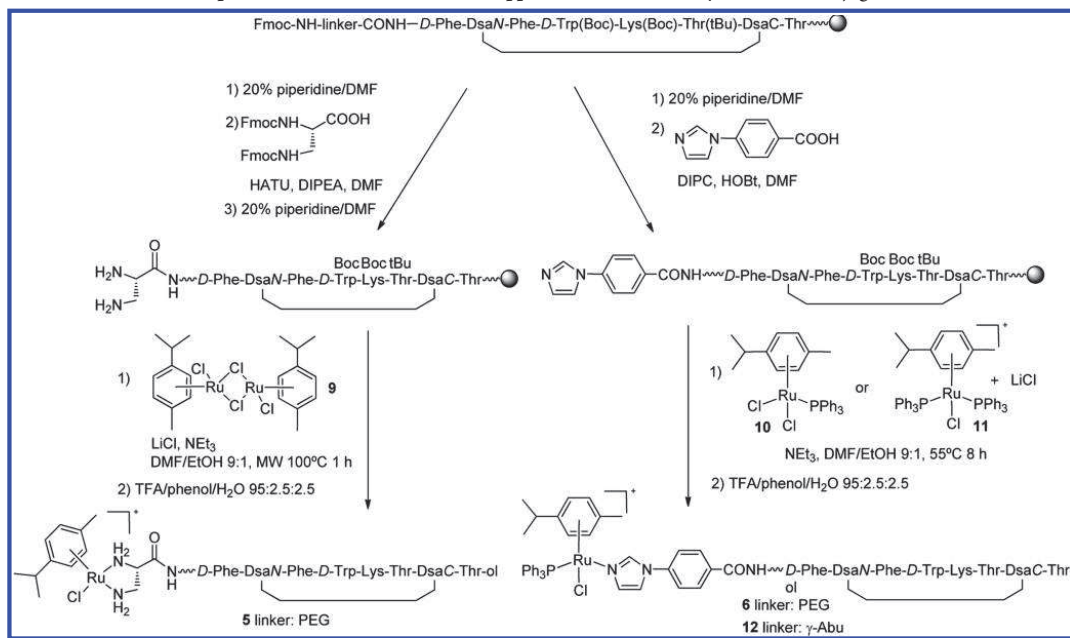
tested using the Kolmogorov–Smirnov test. The differences between data with normal distribution and homogeneous variances were analyzed using the parametric Student's t test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and Characterization of Conjugates between a Dicarba Analogue of Octreotide and Dichloridoplatinum(II) and Osmium(II) Complexes. In our previous work,²³ *cis*-dichlorido-(1-(carboxylic acid)-1,2-diaminoethane)platinum(II) complex, ($[\text{PtCl}_2(\text{dap})]$), was chosen as a cisplatin analogue since it can form the expected intrachain Pt-N7/S'G,N7/3'G chelates upon reaction with DNA. The attachment of the platinum complex to the γ -aminoisobutyl-derivatized dicarba analogue of octreotide (2) was carried out on a solid phase through the formation of an amide bond between its carboxylic function and the amine group of the spacer. Although the conjugate was able to bind to DNA in the same way as cisplatin, its low solubility in water precluded the evaluation of its biological activity. In order to improve the aqueous solubility for all the target conjugates, 3–6 (Chart 1), a poly(ethylene glycol) spacer has been introduced between the peptide sequence and the metal complex. This spacer is expected to be sufficiently long to keep the metal complex away from the pharmacophore sequence.

Following our previous results on the synthesis of platinum(II)–octreotide conjugates, a stepwise solid-phase strategy has been used for the preparation of conjugates 3–6. This approach is particularly useful in this case, since it allows the

Scheme 2. Schematic Representation of the Solid-Phase Approach Used for the Synthesis of Conjugates 5, 6, and 12



regioselective introduction of the metal complex at the *N*-terminal end of the cyclic peptide. Otherwise, in a solution-phase approach the ϵ -NH₂ of the Lys residue would compete with the *N*-terminal amino group of octreotide. In order to increase the stability of the metal–octreotide conjugates, the CH₂–CH₂ linkage has been chosen as a disulfide isoster, since this modification keeps a higher selectivity for sst₂ somatostatin receptor than the CH=CH linkage.²⁴

First, the linear peptide was synthesized manually on a Rink amide resin-*p*-MBHA using standard Fmoc-*t*Bu methodology (Scheme 1). All suitably protected Fmoc-amino acids were incorporated with HATU in the presence of DIPEA in anhydrous DMF as a solvent. As previously described,^{23,24} Fmoc-protected threoninol functionalized as the *p*-carboxybenzaldehyde acetal was first anchored to the solid support. In addition, the two cysteine amino acids in octreotide were replaced by allyl glycine residues to perform the cyclization reaction. Once the linear peptide precursor had been assembled, on-resin microwave-assisted ring-closing metathesis was carried out with second-generation Grubbs catalyst for 1 h at 100 °C. Then, hydrogenation of the double bond using Wilkinson's catalyst afforded the protected cyclic saturated dicarba analogue of octreotide (2) bound to the resin. Finally, an Fmoc-protected poly(ethylene glycol) linker, 8-(9-fluorenylmethoxycarbonyl-amino)-3,6-dioxaoctanoic acid, was incorporated at the *N*-terminal end using HATU as a coupling reagent.

The final step involved the removal of the Fmoc protecting group of the spacer (20% piperidine in DMF) and the incorporation of the required metal complex onto the free amino function of the linker. For the synthesis of conjugate 3, [PtCl₂(dap)] (7) was coupled using DIPC and NHS in anhydrous DMF (15 h at rt, protected from light).²³ Cleavage

from the resin and removal of the protecting groups were carried out by treatment with a TFA/phenol/H₂O cocktail (95:2.5:2.5) for 1 h at rt. Reversed-phase HPLC analysis of the crude revealed a main double peak. Both peaks were isolated by semipreparative HPLC and characterized by HR MALDI-TOF and ESI MS and NMR as the expected diastereomeric dichloridoplatinum(II)–octreotide conjugates, 3. The generation of both isomers is accounted from the use of a racemic platinum(II) complex.

Our next objective was focused on the conjugation of an organometallic osmium(II) complex to the dicarba analogue of octreotide. Among osmium complexes with anticancer activity, [(η⁶-bip)Os(pico)Cl] is particularly interesting, since it exhibits promising activity in human ovarian cancer cells.^{47,48} For this reason, we choose an analogue bearing a carboxylic function on the picolate ligand, [(η⁶-bip)Os(4-CO₂-pico)Cl] (8), which would allow the attachment to octreotide. This complex has been very recently conjugated to polyarginines with different chain lengths using solid-phase procedures.³⁰ Hence, for the synthesis of conjugate 4, [(η⁶-bip)Os(4-CO₂-pico)Cl] was coupled with either PyBOP or the more reactive HATU in the presence of DIPEA in anhydrous DMF (Scheme 1). After cleavage and deprotection with a TFA/TIS/H₂O cocktail (95:2.5:2.5; 1 h at rt, protected from light), reversed-phase HPLC analysis revealed a main peak (30–40%), which was isolated and characterized by HR MS and NMR as the target conjugate 4. The conversion yield was substantially increased (90%) when coupling was performed with DIPC and HOAT in anhydrous DMF for 3 h. It is important to mention that, during HPLC analysis of conjugate 4, a less retained peak was always observed, which was characterized by MS as the aqua conjugate (substitution of Cl by H₂O). This result reveals fast hydrolysis

cleaved, deprotected crude (TFA/phenol/H₂O 95:2.5:2.5, 1 h rt) showed the presence of a main peak (57%) which was isolated and characterized by MS as conjugate **12** (Figure 1C). Hence, imidazole is able to replace one of the two PPh₃ ligands in **11** instead of the Cl ligand, thereby allowing the conversion yield of conjugate **12** to be improved in comparison with that obtained when complex **10** is used. As shown in Figure 1D, the assembly of the ruthenium complex by using these optimized conditions was almost quantitative onto the imidazole-derivatized octreotide resin that contains the poly(ethylene glycol) linker, which allowed the target conjugate **6** to obtain with high yield (Scheme 2). This compound was isolated by semipreparative HPLC and fully characterized by HR MS and NMR.

In order to gain insight into the mechanism of this reaction, complex **11** was mixed with LiCl (1.4 mol equiv) and NEt₃ (1.9 mol equiv) in anhydrous DMF and heated at 55 °C. As shown in the ³¹P NMR spectra (Figure 2), the single chemical shift

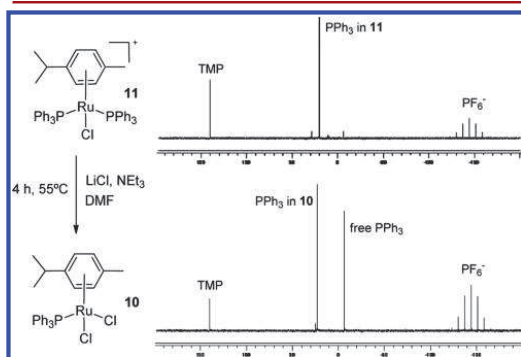


Figure 2. Schematic representation of the transformation of complex **11** to **10** (left) and ³¹P NMR spectra of **11** (A) and of the reaction crude after heating **11** in the presence of LiCl and NEt₃ for 4 h at 55 °C (B).

corresponding to the two PPh₃ ligands in **11** (δ : 20.0 ppm) disappeared after 4 h. The two new signals (δ : 23.2 and -6.4 ppm) were assigned to the PPh₃ ligand in complex **10** and to the released PPh₃, respectively. These results demonstrate the *in situ* generation of complex **10** from **11** because of the presence of LiCl. This reaction might have future applications in the synthesis of new ruthenium complexes for catalysis or biomedical applications.

Activation of Metal–Octreotide Conjugates by Aqueous Hydrolysis. In general, the cytotoxic activity of metal-based anticancer drugs is intimately related with the processes that mediate their activation in aqueous media; these processes are known to facilitate the interaction of the metal, its ligands or the complex, or a fragment with the biological target (e.g., DNA, RNA, or proteins). In addition, aqueous stability is another fundamental prerequisite, since it might condition their success in clinical development. Cisplatin and its analogues can be considered prodrugs since their activation is produced through the dissociation of anionic ligands.^{22,51} The resulting positively charged aqua species coordinate strongly to nuclear DNA while neutral complexes do not, which demonstrates that in these family of compounds the metal plays a functional role.²² Organometallic complexes containing a labile group prone to substitution can also be activated inside the cells

through hydrolysis. As previously stated, the activation of piano-stool organometallic ruthenium(II) complexes of the type $[(\eta^6\text{-arene})\text{RuCl}(\text{XY})]^+$, where XY is a neutral chelating ligand, proceeds through the release of chloride ligand. The resulting aqua species is responsible for ruthenation of DNA by generating monofunctional adducts on guanine nucleobases. In a similar manner to cisplatin and related platinum(II) compounds, the high extracellular chloride concentration (100 mM) in comparison with that present in the nucleus and cytoplasm (4 and 22.7 mM, respectively)⁵² ensures that the intact drug reaches its biological target before activation takes place. In addition, a close correlation between cancer cell cytotoxic activity and the capacity of some ruthenium(II) arene complexes to undergo hydrolysis of the Ru-halide bond has been established.⁵³ Osmium(II) arene complexes containing *N,N*-chelating ligands, such as ethylenediamine, experience much slower ligand exchange kinetics than ruthenium analogues.⁵⁴ The higher acidity of the water molecule bound to the osmium at physiological pH makes these compounds exist largely in their less reactive hydroxido form. These problems have been solved by using picolinate as chelating ligand since it increases both the hydrolysis rate and the basicity of the water molecule in the aqua species (e.g., $[(\eta^6\text{-arene})\text{Os}(\text{pico})\text{Cl}]$) and, for instance, generates compounds with similar anticancer activity as ruthenium-arene analogues.^{36,47}

On the basis of these precedents, we wanted to assess whether hydrolysis of the M–Cl bond occurs when Pt, Ru, and Os complexes are conjugated to octreotide. The stability of conjugates **3–6** (Chart 1) was investigated in aqueous solution at different chloride concentrations mimicking typical blood plasma, cell cytoplasm, and cell nucleus (100, 22.7, and 4 mM, respectively). In all cases, metal–octreotide conjugates (10 μM) were incubated at 37 °C for 24 h. In general, HPLC analysis showed that the peak of the parent chloride compound (e.g., $R_t = 20.3$ min for conjugate **4**) evolved into a new less retained peak ($R_t = 16.9$ min), which was isolated and characterized by ESI MS as the aqua conjugate (substitution of Cl by H₂O).

As previously found in some osmium(II) complexes,⁴⁸ the hydrolysis extent of conjugate **4** was highly dependent on the NaCl concentration. Almost 95% of the conjugate was hydrolyzed in the 4 mM NaCl solution, but the hydrolysis was substantially decreased in the more concentrated solutions of NaCl (Table 1). These results indicate that the covalent attachment of the peptide does not interfere with the hydrolysis properties of this osmium complex and,⁴⁸ more importantly, that the aqua species is not deactivated by reaction with amino

Table 1. Percentage of Aqua Adduct Formation in Water at Chloride Levels Typical of Blood Plasma (100 mM), Cell Cytoplasm (22.7 mM), and Cell Nucleus (4 mM), and Percentage of the Conjugate–DNA Adduct Formation in Aqueous 4 mM NaCl

conjugate	% aqua adduct			% DNA adduct
	4 mM NaCl	22.7 mM NaCl	100 mM NaCl	4 mM NaCl
3	16	7	3	42
4	95	35	12	49
5a ^a	97	83	74	37
6	0	0	0	0

^aSee the experimental section.

acids from the carrier peptide. Similar results were obtained for the ruthenium conjugate **5** at the 4 mM chloride concentration. However, the extent of hydrolysis of the Ru–Cl bond was substantially decreased at the higher NaCl concentrations (Table 1).

Regarding conjugate **3**, the hydrolysis of the Pt–Cl bond occurred to a lower extent than for conjugates **4** and **5** (only 16% after 24 h in 4 mM NaCl solution), and it was almost abolished at higher chloride concentration.

On basis to these results, it is expected that octreotide in conjugates **3** and **4** will have a positive effect on the delivery of the less reactive intact prodrug while outside the cell, but once in the cell cytoplasm and, particularly, in the cell nucleus, Pt and Os complexes will be selectively activated through hydrolysis to generate a species reactive toward DNA binding. However, hydrolysis of conjugate **5** in the blood plasma and in the cell cytoplasm might have important consequences for its biological activity since the metal complex could be deactivated by reaction with other potential ligands such as peptides or proteins.

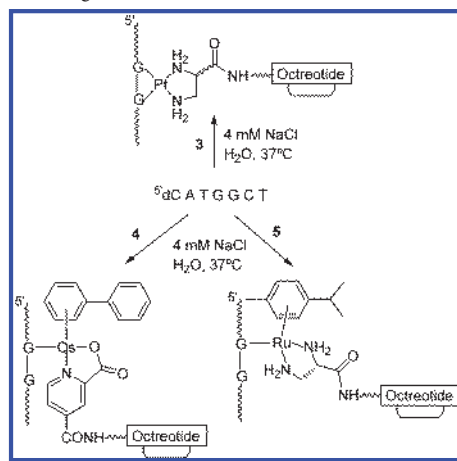
To our surprise, no hydrolysis occurred in the case of conjugate **6** upon incubation for 24 h at 37 °C, as inferred by HPLC analysis together with MS (see below).

DNA Binding Studies. In general, the chlorido species of Pt(II), Ru(II), and Os(II) complexes are relatively less reactive toward DNA nucleobases in comparison with the aqua adducts. The chloride concentration in the nucleus of cells (*ca.* 4 mM) is much less than that in the cytoplasm (*ca.* 22.7 mM) or outside cells (*ca.* 100 mM), which favors the formation of reactive aqua adducts in the vicinity of DNA. We incubated conjugates **3–6** in 4 mM NaCl at 37 °C with the short DNA oligonucleotide, 5′dCATGGCT. This oligonucleotide contains the target GG sequence of the anticancer drug cisplatin and is known to give the expected platinum 1,2-intrastrand GG chelates upon reaction with cisplatin, [Pt(en)Cl₂], or a dichloridoplatinum(II) conjugate of a dicarba analogue of octreotide.^{23,41}

In the case of the platinum conjugate **3**, HPLC analysis showed the formation of a new peak with higher retention time than the parent oligonucleotide (42% after 24 h; see Table 1), attributable to the hydrophobicity of the platinum–peptide fragment. This new product was isolated and characterized by HR MALDI-TOF MS as an adduct between **3** and 5′dCATGGCT in which both chloride ligands had been lost. As expected from previous results,²³ MS analysis after enzymatic digestion with 5′- and 3′-exonucleases (bovine spleen and snake venom phosphodiesterases, respectively)^{42,43} revealed the formation of a chelate between the platinum fragment of the conjugate and both guanines of the DNA chain (Scheme 3).

When osmium- and ruthenium(dap)-octreotide conjugates were incubated with 5′dCATGGCT, a major monofunctional adduct was formed between the metal fragment of the conjugate and the DNA chain. In both cases, the high metalation yield (49% for **4** and 37% for **5**) is in good agreement with the high degree of hydrolysis of the Os/Ru–Cl bonds. Enzymatic digestion in combination with MS revealed that in both cases metalation occurred at the guanine in the 5′ position (G₄, see Scheme 3). This is a similar trend to that previously found with monofunctional platinum(II) complexes, such as {Pt(dien)}²⁺, since they react exclusively with the 5′G nucleobase in the 5′dCATGGCT sequence.⁴¹ The high affinity of similar ruthenium(II) arene complexes, such as [(η⁶-p-cym)RuCl(en)]⁺ or [(η⁶-benzene)Ru(en)(OH₂)]²⁺, for the N⁷

Scheme 3. Formation of Adducts between Conjugates **3–5** and the Oligonucleotide



position of guanine over the other DNA nucleobases has been observed previously.^{55–57} Regarding organometallic osmium(II) complexes with picolinate ligands, such as [(η⁶-biphenyl)-Os(picolinate)Cl]⁺, rapid binding to calf thymus DNA has also been found.⁵⁸

Finally, the reaction of the ruthenium–octreotide conjugate **6** with DNA was studied. In good agreement with the absence of hydrolysis of the Ru–Cl bond in this compound, ruthenation of 5′dCATGGCT was not observed even after 48 h.

The overall results demonstrate that the activation of the M–Cl bond through hydrolysis in the Ru and Os conjugates seems to be very important for the binding to DNA, and there is a strong preference for the guanine nucleobases, especially those located at the 5′ end in GG sequences. However, in the case of the Pt(dap)-octreotide conjugate, platinumation is observed despite the slow kinetics for the hydrolysis of the Pt–Cl bond in the low chloride medium as found in the nucleus. The high thermodynamic stability of the N₇,N₇-GG intrastrand adduct might account for this result.

Efficiency of Intracellular Delivery of Dicarba Analogue of Octreotide (2). Compared to octreotide (**1**), the binding affinity of the dicarba analogue of octreotide (**2**) (Chart 1) is slightly reduced for sst₁, sst₄, and sst₅ receptors, although this reduction is smaller in the case of sst₂ receptor (about 23-fold for sst₂ vs 36- and 48-fold for sst₄ and sst₅, respectively).^{6,24} However, as previously stated, this high affinity toward sst₂ receptor (44 nM) still makes **2** a suitable stabilized analogue of somatostatin to deliver cytotoxic metal complexes into cancer cells. In order to check the capacity of internalization of analogue **2** in our cell lines by confocal microscopy and flow cytometry, we labeled it with fluorescein. For the synthesis of the fluorescein-labeled dicarba analogue of octreotide (**13**), 5(6)-carboxyfluorescein was coupled on the linker derivatized peptide-bound resin by using DIPC and HOAT as coupling reagents. Washings with 20% piperidine/DMF before the final acidic treatment yielded a highly pure peptide.⁵⁹ As a control, fluorescein-labeled octreotide (**14**) was also synthesized using solid-phase procedures.

Next, the internalization capacity of analogue **2** was determined by confocal microscopy, after the incubation of

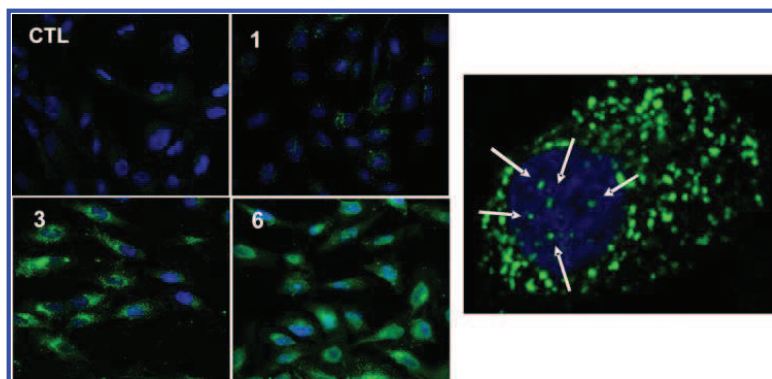


Figure 3. Confocal microscopic imaging of the internalization of the fluorescein-labeled dicarba analogue of octreotide (**13**) in MCF-7 cells. Left: MCF-7 cells incubated with 50 μM of **13** for 1, 3, and 6 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ or medium alone as a control (CTL). The cell nuclei were stained with Hoechst (blue). The localization of **13** is indicated by the green fluorescence. Right: Higher-magnification image (1000 \times) of a MCF-7 cell incubated with 50 μM of **13** for 3 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. Arrows indicate the nuclear localization of **13**.

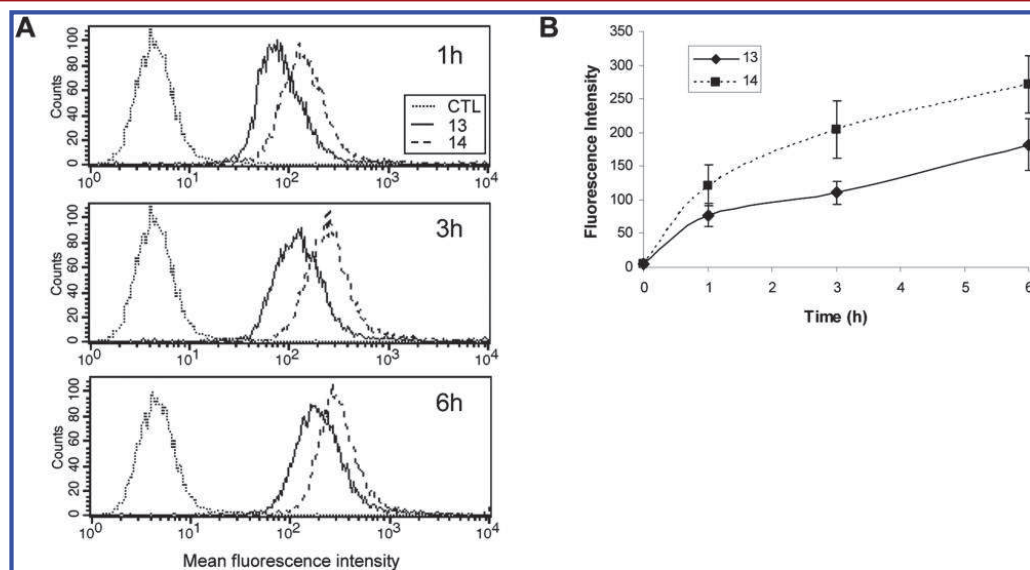


Figure 4. Intracellular delivery efficiencies of fluorescein-labeled dicarba analogue of octreotide (**13**) and of fluorescein-labeled octreotide (**14**) in MCF-7 cells. MCF-7 cells were incubated with the peptides for 1, 3, and 6 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ or medium alone (CTL). The fluorescence intensity of the cells, corresponding to the intracellular uptake of the peptides, was determined by flow cytometry. (A) Flow cytometry histograms representing the fluorescence intensity of 10 000 cells on a four-decade log scale. Peptides **13** and **14** are depicted by solid and dashed lines, respectively. (B) Kinetics of the cellular uptake of **13** and **14**. Each point in the graphs represents the mean intracellular fluorescence intensity of three independent experiments \pm SE.

str α_2 -expressing human breast cancer MCF-7 cells with 50 μM of the corresponding fluorescein-labeled peptide (**13**) for different times (1, 3, and 6 h). After 1 h of treatment, fluorescent vesicles, most likely endosomes, were visible in the cytoplasm of most of the examined cells, confirming the cellular uptake of the peptide (Figure 3). After 3 and 6 h, the number and the fluorescence density of the vesicles markedly increased, revealing an intense internalization of **13** during this period of time. At these time points, the vesicles were mainly clustered at the periphery of the cell nucleus. Higher-magnification (1000 \times) images from cells exposed to **13** for 3 h (Figure 3)

revealed that, although the fluorescence vesicles were located mainly in the cell cytoplasm, a small proportion of the fluorescence was localized within the cell nucleus. Some authors have reported that somatostatin ligands may accumulate in the cell nucleus,^{60,61} although the pathway for their nuclear localization remains to be elucidated.

The qualitative observations in confocal microscopy studies were confirmed with quantitative data obtained by flow cytometry. As represented in Figure 4A, the mean intracellular fluorescence intensity, corresponding to the internalization of **13**, increased over time. The intracellular fluorescence intensity

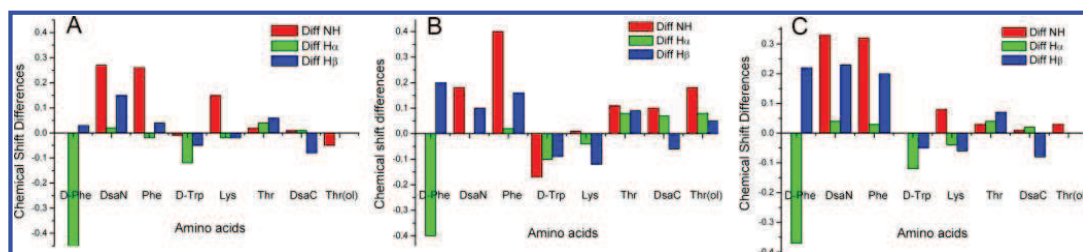


Figure 5. Chemical shift differences for NH, H_{α} , and H_{β} protons between conjugates 3 (A), 4 (B), and 6 (C) and the dicarba analogue of octreotide (2).²⁴

pmol Ru/ 10^6 cells) was higher than that of the parent complex 17 (68.01 ± 2.2 pmol Ru/ 10^6 cells). Such a significant difference between these compounds reveals that conjugation to the peptide moiety has a positive effect on the internalization of the ruthenium complex, thereby suggesting that the attachment of the metal complex to the peptide does not disturb its active conformation and hence its affinity toward somatostatin receptors is maintained (see below). Although the covalent attachment of a potential metal-based drug to a receptor-binding peptide such as octreotide is expected to increase the bioavailability, delivery, and accumulation of the complex to cancer cells, it must also be borne in mind that the peptide moiety might also inhibit or weaken the interaction of the metal fragment with the final biological target (e.g., DNA, RNA, or proteins), which would compromise its cytotoxic activity.²⁵ Release of the ruthenium fragment from the conjugate might be necessary to allow it to reach its target site. This might explain the apparently contradictory results from cytotoxicity and cellular uptake studies, since in this case, the covalent attachment of the ruthenium complex to the dicarba analogue of octreotide 2 increases uptake and accumulation of the drug in the cancer cell while the cytotoxic activity of the final conjugate is reduced.

Conformational Analysis by NMR Spectroscopy. It is well-known from NMR studies in water and in DMSO- d_6 solution that octreotide (1) adopts a predominant type II' β -turn conformation across residues Phe⁷-D-Trp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰.^{64,65} The stability of this conformation together with the orientation of exocyclic residues (D-Phe² and Thr-ol¹⁵) plays an important role in the binding of octreotide and its analogues to somatostatin receptors.^{66,67} Regarding the dicarba analogue of octreotide used in this work (2), D'Addona et al. have recently described that replacement of cystine by a CH₂-CH₂ linkage does not substantially alter the secondary structure in the active region.²⁴ These NMR studies also suggest that there exists a conformational equilibrium between the antiparallel β -sheet structural cluster and a second conformational ensemble involving folded structures for the C-terminal residues. This hypothesis is in good agreement with previously reported findings for 1 that indicate that C-terminal amino acids fold into a 3_{10} -helix-like array or in a similar helical ensemble.⁶⁶ Furthermore, it is important to consider that the structure of 2 in the region of the N-terminal D-Phe² and C-terminal Thr(ol)¹⁵ is significantly different from that previously reported for 1,⁶⁶ which might explain the differences in affinity for somatostatin receptors.²⁴ Given the implication of these amino acids both in the affinity and in the specificity for somatostatin receptors, we investigated whether the covalent attachment of metal complexes to the N-terminal end of 2 through a

poly(ethylene glycol) linker might alter the active conformation of the peptide and, in particular, the structure around D-Phe² and Thr-ol¹⁵.

In order to gain some insight into peptide conformation, conjugates 3, 4, and 6 were studied by 1D and 2D ¹H NMR spectroscopy. In all conjugates, significant line-broadening was observed at conjugate concentrations above 1 mM, suggesting that oligomerization takes place under these conditions. This effect is specially pronounced in the case of the osmium-octreotide conjugate (see the Supporting Information). To avoid oligomerization, 2D NMR spectra were recorded at a peptide concentration of 0.8 mM. Signals of the peptide were completely assigned using standard techniques (see Tables S1–3 in the Supporting Information). Resonances of the linker and of ligands in the metal fragments were also identified, although not all of them could be unambiguously assigned to specific protons.

A comparison between the chemical shifts of the peptide fragment in the conjugates and the dicarba-analogue of octreotide (2)²⁴ indicates that residues D-Trp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰-DsaC¹⁴-Thr(ol)¹⁵ have very similar chemical shifts, whereas significant differences are observed for protons of the amino acids D-Phe²-DsaN³-Phe⁷ (Figure 5). This suggests that the peptide structure is only affected in the latter region. The chemical shift of H_{α} of D-Phe² is notably shifted downfield. This shift is attributed to the covalent attachment of the linker to the α -amino group of this amino acid through an amide bond. Interestingly, peaks for the NH protons of DsaN³ and Phe⁷ amino acids in all conjugates (and to a lesser extent for the H_{β} signals) were shifted upfield.

Molecular dynamics calculations were carried out to gain further insight in the structural alterations induced in the peptide structure by the covalent attachment of the metal complex. The results are illustrated in Figure 6. The peptide backbone is not significantly altered with respect to the structure of the dicarba analogue of octreotide (2). In particular, the β -turn backbone geometry around residues D-Trp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰-DsaC¹⁴-Thr(ol)¹⁵ is totally preserved. The main changes occur in residues D-Phe² and DsaN³. Side chain conformations are less defined than in 2. Linker and ligand fragments are mainly disordered. In some of the calculated conformers, the ligand or the linker exhibits contacts with aromatic residues D-Phe² and Phe⁷ as well as with DsaN³ (see Figure 6). These residues correspond to those that have changes in their ¹H NMR chemical shifts with respect to the unmodified peptide. This is also in good agreement with the fact that some NOEs were observed between the linker and D-Phe² (see Figure S-20 in the Supporting Information).

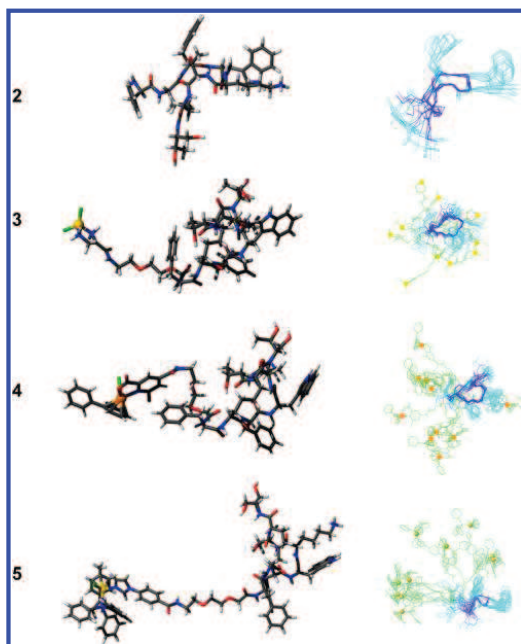


Figure 6. Model structures of the dicarba analogue of octreotide (2) and of conjugates 3, 4, and 6 (see Chart 1). Left: representative conformer. Right: ensemble with 10 conformers resulting from molecular dynamics calculations. Superposition was done by fitting the backbone peptide heavy atoms.

The NMR data and molecular dynamics calculations suggest that the covalent attachment of the metal complex does not substantially alter the global structure of the peptide. However, the aromatic ligands of the ruthenium and osmium complex in conjugates 4 and 6, as well as the linker appear to have a tendency to interact with the aromatic residues located to their near side of the peptide sequence, which could be favored by the high flexibility of the poly(ethylene glycol) linker. This is particularly important in the case of the Phe⁷ residue, since this amino acid is included in the so-called pharmacophore sequence of octreotide. These results support the hypothesis that the covalent attachment of both fragments might generate a significant population of peptide conformations with a decreased affinity for somatostatin receptors in comparison with that of the dicarba analogue of octreotide 2. However, the dicarba analogue of octreotide 2 still retains the ability to internalize metal complexes upon conjugation, as demonstrated cellular uptake experiments with 6 and 17.

Selectivity of the Ruthenium–Octreotide Conjugate (6). The main objective of a targeted strategy is the selective delivery of a cytotoxic drug to cancer cells in order to reduce toxicity to normal cells. Consequently, the reduction of the antiproliferative activity of a metal complex when conjugated with octreotide (Table 2) could be compensated by a selective and a more efficient delivery of the compound to the targeted cells. In order to corroborate this hypothesis, we determined whether the conjugation of the ruthenium(II) arene complex 17 to the octreotide analogue 2 (conjugate 6) is correlated with its vehiculization to tumor cells overexpressing *ssr₂*, the most

relevant receptor for octreotide internalization.⁶⁸ To this end, we further analyzed the cytotoxic activity of conjugate 6 in human prostate tumor DU-145 cells as well as and in the Chinese hamster ovary (CHO) cell line, in order to assess the selectivity of the ruthenium–octreotide conjugate for cancer cells with respect to normal cells (Table 3). As shown in Figure

Table 3. IC₅₀ Values of the Ruthenium–Octreotide Conjugate 6 and Control Complex 17 in Human Cancer Cell Lines (MCF-7 and DU-145) and in Normal Cells (CHO)^a

compound	cell line, IC ₅₀ (μM)		
	MCF-7	DU-145	CHO
6	63.00 ± 1.53	26.00 ± 2.00	45.17 ± 2.61
17	3.32 ± 0.54	6.80 ± 0.99	5.8 ± 0.01

^aIC₅₀: Inhibitory concentration that reduce by 50% the cell viability. The cytotoxicity was determined by the MTT assay after 72 h of drug exposure. Data represents the mean ± SE of at least three independent experiments.

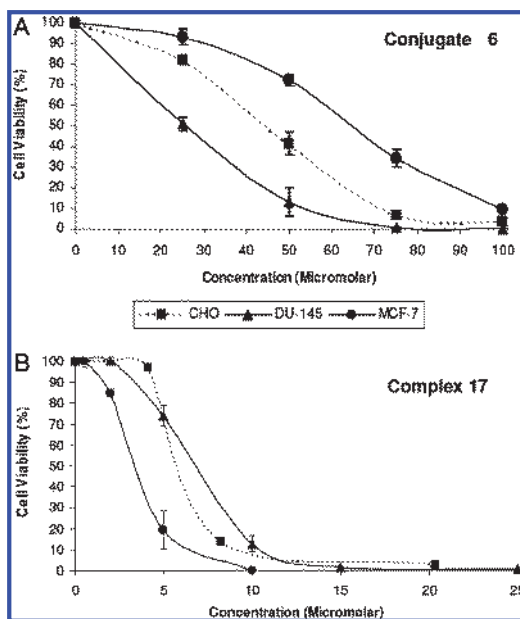


Figure 7. Cytotoxic effect of conjugate 6 (A) and complex 17 (B) in the MCF-7, DU-145, and CHO cell lines. Cells were treated for 72 h with the indicated concentrations of each compound. The cell viability was determined using the MTT assay. Each point in the graphs represents the mean of three independent experiments ± SE.

7A, DU-145 cells were markedly more responsive to 6 than the MCF-7 and CHO cells, as the IC₅₀ value (26.00 ± 3.46) was 2.4-fold lower than in MCF-7 cells and about 1.7-fold lower than in CHO cells (IC₅₀: 45.17 ± 2.61) (Table 3). This difference in the cytotoxic activity of conjugate 6 between the cell lines cannot be attributed to a different activity of the metal fragment in the different cells, as the control complex 17 cytotoxicity was higher in MCF-7 (IC₅₀ = 3.32 ± 0.54) and

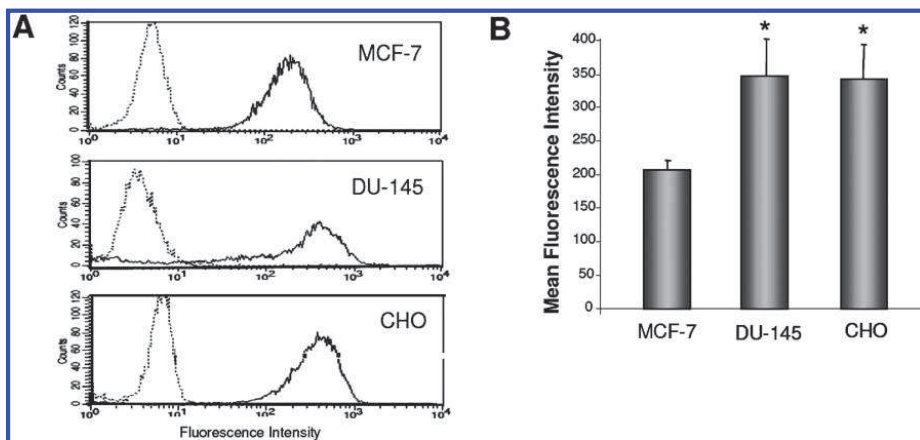


Figure 8. Expression of the ssr_2 receptor on MCF-7, DU-145, and CHO cell lines. (A) Representative flow cytometry histograms obtained after the indirect immunofluorescence staining of the cells. Solid lines represent the fluorescence intensity of the cells after the incubation with an antibody against ssr_2 together with a control secondary antibody. Dotted lines indicate the background staining with the secondary antibody alone. (B) Each column in the graphs represents the mean fluorescence intensity of three independent experiments \pm SE in MCF-7, DU-145, and CHO cells. * $P < 0.05$ vs MCF-7 cells.

more attenuated in DU-145 cells ($IC_{50} = 6.80 \pm 0.99$) and CHO cells (5.8 ± 0.01) (Figure 7B) (Table 3).

In order to determine if the cytotoxic activity of **6** was related to the receptor expression on the cell surface, we next characterized the ssr_2 levels by flow cytometry. As shown in Figure 8A, ssr_2 expression was detected on the three cell lines. Notably, ssr_2 expression was significantly higher in the DU-145 and CHO cells than in MCF-7 cells (mean cell fluorescence intensity 347.5 ± 54.6 , 344.0 ± 50.56 , and 206.7 ± 14.27 , respectively) (Figure 8B), which demonstrates that the cytotoxic activity of **6** is strongly correlated with ssr_2 expression levels, especially in the DU-145 and MCF7 cells. However, although the CHO cells displayed similar ssr_2 expression levels to DU-145, the toxicity of **6** was attenuated in these cells, suggesting some selective cytotoxic activity of the ruthenium–octreotide conjugate toward cancer cells with respect to normal cells.

As a very weak expression of ssr_2 has been previously reported in CHO cells,⁶⁹ the ssr_2 expression in this cell line was additionally examined according to their mRNA expression levels. PCR analyses confirmed ssr_2 gene expression in CHO cells, with similar mRNA levels than in MCF-7 cells (see the Supporting Information). Our results are in keeping with different studies describing that somatostatin receptors can also be identified in a broad panel of normal tissues, as well as in the human immune system.⁷⁰ As a consequence, new clinical applications for somatostatin analogues in several benign pathological diseases are emerging in addition to their role in malignant diseases.

All together, our results demonstrate a good correlation between the antitumor activity of the ruthenium–octreotide conjugate **6** and the expression of the ssr_2 receptor on the cell surface and reveal the potential of conjugation with receptor-binding peptides such as octreotide to deliver metal-based anticancer drugs specifically to cells overexpressing somatostatin subtype-2 receptor.

CONCLUSIONS

In summary, in this work we have described a straightforward solid-phase methodology for the conjugation of a dichloridoplatinum(II) complex as well as three “piano-stool” organometallic ruthenium(II) and osmium(II) complexes to a dicarba analogue of octreotide, a potent somatostatin agonist whose receptors, particularly subtype 2, are overexpressed on the membrane of tumor cells. At nuclear Cl^- concentration (4 mM), platinum (**3**), osmium (**4**), and Ru(dap) (**5**) conjugates are activated through hydrolysis of the M-Cl, which correlates well with their DNA binding capacity, revealing in all cases a strong preference for guanine nucleobases. However, neither hydrolysis of the Ru-Cl nor interaction with DNA was observed in the case of the triphenylphosphine-containing ruthenium conjugate (**6**). Surprisingly, the latter conjugate displays antiproliferative activity, but the rest of the conjugates were noncytotoxic. Additional cytotoxic experiments with control metal complexes and cellular uptake experiments by ICP-MS, as well as conformational analysis of metal–octreotide conjugates by 2D NMR spectroscopy and molecular dynamics calculations, have allowed us to establish three general conclusions. First, a significant loss in the cytotoxic activity of the metal complex moiety always occurs when conjugated to the peptide sequence (e.g., $IC_{50} = 3.32 \pm 0.54$ in MCF-7 cells and $IC_{50} = 6.80 \pm 0.99$ in DU-145 cells for complex **17** vs $IC_{50} = 63.00 \pm 1.53$ in MCF-7 cells and $IC_{50} = 26.00 \pm 2.00$ in DU-145 cells for conjugate **6**); hence, it seems to be important to use metal complexes with high cytotoxic activity in order to develop peptide-conjugates with active biological properties. Second, despite the presence of some altered amino acids in the pharmacophore sequence of octreotide, particularly at the N-terminal end of the peptide, the overall structure is essentially maintained in the conjugate, which suggests that the affinity for somatostatin receptors would not be compromised upon conjugation to a metal complex; this observation is in good agreement with the higher accumulation of ruthenium in cancer cells upon exposure to the ruthenium–octreotide conjugate **6** in comparison with that of the parent complex **17**, which

demonstrates that the peptide has a positive effect on the internalization of the ruthenium complex. The choice of the spacer is also important, not only to improve aqueous solubility and to keep the metal complex away from the peptide, but also to reduce conformational freedom between both fragments in the conjugate. Third, the significantly higher expression of the sst_2 receptor on DU-145 cells compared to MCF-7 cells is in good agreement with IC_{50} values of conjugate 6 in both tumor cell lines. The fact that control complex 17 shows an attenuated cytotoxicity in DU-145 cells compared with MCF-7 cells supports that the antitumoral activity of the ruthenium–octreotide conjugate 6 is correlated with the overexpression of the sst_2 receptor on the cell surface. The cytotoxic activity of 6 in a nontumor cell line (CHO) was similar to that found in cancer cells, a result which can be attributed to a similar level of expression of somatostatin subtype-2 receptors.

The overall results of this work demonstrate the potential of conjugation between metal-based anticancer drugs and receptor-binding peptides such as octreotide to target tumoral cells through binding to specific receptors, including somatostatin subtype 2 receptor, overexpressed in their membranes. In the near future, this receptor-targeted anticancer strategy is expected to generate new antitumor drugs with reduced side-effects and reduced toxicity in normal cells. The potential of this strategy will be increased by using novel approaches to circumvent some of the limitations found in this work, particularly new biological vectors in combination with photoactivated metal complexes²⁵ or cleavable linkers³² in the biological media. Work is in progress in this direction to generate more specific metal-based anticancer drugs.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

Selected MS spectra and HPLC traces of metal complex–octreotide conjugates and of DNA–conjugate adducts. NMR data of conjugates 3, 4, and 6, and of control metal complexes. *sst2* mRNA expression in CHO and MCF-7 cells. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

■ Corresponding Author

*Vicente Marchán: Phone +34 934021249, Fax +34 933397878, E-mail vmarchan@ub.edu. Anna Massaguer: Phone +34 972418370, Fax +34 972418150, E-mail anna.massaguer@udg.edu.

■ Author Contributions

#Both authors contributed equally to this work.

■ Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by funding from the Ministerio de Educación y Ciencia (CTQ2005-01834, CTQ2007-68014, CTQ2008-02064, and CTQ2010-21567), the Generalitat de Catalunya (2009SGR208 and Xarxa de Referència de Biotecnologia), Instituto de Salud Carlos III (grants RD06/0020/0041), the Programa d'Intensificació de la Recerca (UB) and the ERC (grant no 247450, to PJS). We thank Prof. Alfonso Carotenuto (University of Napoli) for providing the coordinates of the dicarba analogue of octreotide 2, Dr. Sabine H. van Rijt (University of Warwick) for supplying the osmium

complex 8, and Dr. Isolda Romero (University of Warwick) and Dr. Antoni Padró (Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona) for helpful assistance in the determination of ruthenium content by ICP-MS.

■ ABBREVIATIONS USED

Abu, aminoisobutyryl; ACN, acetonitrile; bip, biphenyl; cym, cymene (1-methyl-4-(1-methylethyl)benzene); dap, 1-(carboxylic acid)-1,2-diaminoethane; DCM, dichloromethane; dhDsaC, dehydrodiaminosuberic acid C-terminus; dhDsaN, dehydrodiaminosuberic acid N-terminus; DIPIC, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide; DIPEA, *N,N'*-diisopropylethylamine; DMF, *N,N'*-dimethylformamide; DMSO, dimethylsulfoxide; DTPA, diethylenetriamino-pentaacetic acid; DOTA, 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid; DsaC, diaminosuberic acid C-terminus; DsaN, diaminosuberic acid N-terminus; ESI, electrospray ionization; Fluo, 5(6)-carboxyfluorescein; Fmoc, 9-fluorenylmethyloxycarbonyl; Hag, 1-2-allylglycine; HATU, hexafluorophosphate salt of the (2-(7-aza-1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium; HOAt, 1-hydroxy-7-azabenzotriazole; HOBT, 1-hydroxybenzotriazole; HRESI, high-resolution electrospray ionization; ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry; Im, imidazole; Ind, indazole; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight; MS, mass spectrometry or mass spectrum; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NHS, *N*-hydroxysuccinimide; NOE, nuclear Overhauser effect; NOESY, nuclear Overhauser enhanced spectroscopy; PBS, phosphate buffered saline; PEG, poly(ethylene glycol); pico, picolinate; sst, somatostatin;sstr, somatostatin receptor; TIS, triisopropylsilane; TMP, trimethylphosphite; TFA, trifluoroacetic acid

■ REFERENCES

- (1) Reubi, J. C. (2003) Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr. Rev.* 24, 389–427.
- (2) Zaccaro, L., del Gatto, A., Pedone, C., and Saviano, M. (2009) Peptides for tumour therapy and diagnosis: Current status and future directions. *Curr. Med. Chem.* 16, 780–795.
- (3) Okarvi, S. M. (2008) A comprehensive overview of peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxic conjugates, as well as their potential applications in cancer diagnosis and therapy. *Cancer Treat. Rev.* 34, 13–26.
- (4) Mezo, G., and Manea, M. (2010) Receptor-mediated tumor targeting based on peptide hormones. *Expert Opin. Drug Delivery* 7, 79–96.
- (5) Schaer, J. C., Waser, B., Mengod, G., and Reubi, J. C. (1997) Somatostatin receptor subtype expression in human pituitary, gastroentero-pancreatic and mammary tumors: comparison of mRNA analysis with receptor autoradiography. *Int. J. Cancer* 70, 530–537.
- (6) Janecka, A., Zubrzycka, M., and Janecki, T. (2001) Somatostatin analogs. *J. Pept. Res.* 58, 91–107.
- (7) Bauer, W., Briner, U., Dopfener, W., Haller, R., Huguenin, R., Marbach, P., Petcher, T. J., and Pless, J. (1982) SMS 201–995: a very potent and selective analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci.* 31, 1133–1140.
- (8) de Jong, M., Breeman, W. A. P., Kwkkeboom, D. J., Valkema, R., and Krenning, E. P. (2009) Tumor imaging and therapy using radiolabeled somatostatin analogues. *Acc. Chem. Res.* 42, 873–880.
- (9) Sun, L.-C., and Coy, D. H. (2008) Cytotoxic conjugates of peptide hormones for cancer chemotherapy. *Drugs Future* 33, 217–223.

- osmium(II) anticancer complexes in ovarian cancer cells. *J. Med. Chem.* 53, 840–849.
- (49) Morris, R. E., Aird, R. E., Murdoch, P., del, S., Chen, H., Cummings, J., Hughes, N. D., Parsons, S., Parkin, A., Boyd, G., Jodrell, D. I., and Sadler, P. J. (2001) Inhibition of cancer cell growth by ruthenium(II) arene complexes. *J. Med. Chem.* 44, 3616–3621.
- (50) Moreno, V., Font-Bardia, M., Calvet, T., Lorenzo, J., Aviles, F. X., Garcia, M. H., Morais, T. S., Valente, A., and Robalo, M. P. (2011) DNA interaction and cytotoxicity studies of new ruthenium(II) cyclopentadienyl derivative complexes containing heteroaromatic ligands. *J. Inorg. Biochem.* 105, 241–249.
- (51) Gianferrara, T., Bratsos, I., and Alessio, E. (2009) A categorization of metal anticancer compounds based on their mode of action. *Dalton Trans.* 37, 7588–7598.
- (52) Jennerwein, M., and Andrews, P. A. (1995) Effect of intracellular chloride on the cellular pharmacodynamics of cis-diamminedichloroplatinum(II). *Drug Metab. Dispos.* 23, 178–184.
- (53) Wang, F., Habtemariam, A., van der Geer, E. P. L., Fernandez, R., Melchart, M., Deeth, R. J., Aird, R., Guichard, S., Fabbiani, F. P. A., Lozano-Casal, P., Oswald, I. D. H., Jodrell, D. I., Parsons, S., and Sadler, P. J. (2005) Controlling ligand substitution reactions of organometallic complexes: Tuning cancer cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 18269–18274.
- (54) Peacock, A. F. A., Habtemariam, A., Moggach, S. A., Prescimone, A., Parsons, S., and Sadler, P. J. (2007) Chloro half-sandwich osmium(II) complexes: influence of chelated *N,N*-ligands on hydrolysis, guanine binding, and cytotoxicity. *Inorg. Chem.* 46, 4049–4059.
- (55) Novakova, O., Chen, H., Vrana, O., Rodger, A., Sadler, P. J., and Brabec, V. (2003) DNA Interactions of monofunctional organometallic ruthenium(II) antitumor complexes in cell-free media. *Biochemistry* 42, 11544–11554.
- (56) Liu, H.-K., Wang, F., Parkinson, J. A., Bella, J., and Sadler, P. J. (2006) Ruthenation of duplex and single-stranded d(CGGCCG) by organometallic anticancer complexes. *Chem.—Eur. J.* 12, 6151–6165.
- (57) Gossens, C., Tavernelli, I., and Rothlisberger, U. (2009) Binding of organometallic ruthenium(II) anticancer compounds to nucleobases: A computational study. *J. Phys. Chem. A* 113, 11888–11897.
- (58) Kostrhunova, H., Florian, J., Novakova, O., Peacock, A. F. A., Sadler, P. J., and Brabec, V. (2008) DNA Interactions of monofunctional organometallic osmium(II) antitumor complexes in cell-free media. *J. Med. Chem.* 51, 3635–3643.
- (59) Fischer, R., Mader, O., Jung, G., and Brock, R. (2003) Extending the applicability of carboxyfluorescein in solid-phase synthesis. *Bioconjugate Chem.* 14, 653–660.
- (60) Watson, J. C., Balster, D. A., Gebhardt, B. M., O'Dorisio, T. M., O'Dorisio, M. S., Espenan, G. D., Drouant, G. J., and Woltering, E. A. (2001) Growing vascular endothelial cells express somatostatin subtype 2 receptors. *Br. J. Cancer* 85, 266–272.
- (61) Hornick, C. A., Anthony, C. T., Hughey, S., Gebhardt, B. M., Espenan, G. D., and Woltering, E. A. (2000) Progressive nuclear translocation of somatostatin analogs. *J. Nucl. Med.* 41, 1256–1263.
- (62) Zhang, Y., Wang, X., Wang, J., Zhang, X., and Zhang, Q. (2011) Octreotide-modified polymeric micelles as potential carriers for targeted docetaxel delivery to somatostatin receptor overexpressing tumor cells. *Pharm. Res.* 28, 1167–1178.
- (63) Huang, C. M., Wu, Y. T., and Chen, S. T. (2000) Targeting delivery of paclitaxel into tumor cells via somatostatin receptor endocytosis. *Chem. Biol.* 7, 453–461.
- (64) Wynants, C., Van Binst, G., and Loosli, H. R. (1985) SMS 201–995, a very potent analogue of somatostatin. Assignment of the 1H 500 MHz n.m.r. spectra and conformational analysis in aqueous solution. *Int. J. Pept. Protein Res.* 25, 608–614.
- (65) Wynants, C., Van Binst, G., and Loosli, H. R. (1985) SMS 201–995, an octapeptide somatostatin analogue. Assignment of the 1H 500 MHz n.m.r. spectra and conformational analysis of SMS 201–995 in dimethylsulfoxide. *Int. J. Pept. Protein Res.* 25, 615–621.
- (66) Melacini, G., Zhu, Q., and Goodman, M. (1997) Multi-conformational NMR Analysis of sandostatin (octreotide): equilibrium between β -sheet and helical structures. *Biochemistry* 36, 1233–1241.
- (67) Deshmukh, M. V., Voll, G., Kuehlewein, A., Maecke, H., Schmitt, J., Kessler, H., and Gemmecker, G. (2005) NMR studies reveal structural differences between the Gallium and Yttrium complexes of DOTA-D-Phe1-Tyr3-octreotide. *J. Med. Chem.* 48, 1506–1514.
- (68) Reubi, J. C., Schar, J. C., Waser, B., Wenger, S., Heppeter, A., Schmitt, J. S., and Mäcke, H. R. (2000) Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes sstr1-sstr5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur. J. Nucl. Med.* 27, 273–282.
- (69) Zhang, J., Jin, W., Wang, X., Wang, J., Zhang, X., and Zhang, Q. (2010) A novel octreotide modified lipid vesicle improved the anticancer efficacy of doxorubicin in somatostatin receptor 2 positive tumor models. *Mol. Pharm.* 7, 1159–1168.
- (70) Cascini, G. L., Cuccurullo, V., and Mansi, L. (2010) The non tumour uptake of (111)In-octreotide creates new clinical indications in benign diseases, but also in oncology. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 54, 24–36.

Carrion-Salip D, Panosa C, Menendez JA, Puig T, Oliveras G, Pandiella A, De Llorens R, Massaguer A. "Androgen-independent prostate cancer cells circumvent EGFR inhibition by overexpression of alternative HER receptors and ligands". *International Journal of Oncology*. Vol. 43, issue 3 (2012) : 1128-1138

<http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2012.1509>

Copyright © Spandidos Publications 2012

Androgen-independent prostate cancer cells circumvent EGFR inhibition by overexpression of alternative HER receptors and ligands

DOLORS CARRIÓN-SALIP¹, CLARA PANOSA¹, JAVIER A. MENENDEZ², TERESA PUIG³,
GLÒRIA OLIVERAS³, ATANASIO PANDIELLA⁴, RAFAEL DE LLORENS¹ and ANNA MASSAGUER¹

¹Biochemistry and Molecular Biology Unit, Department of Biology, University of Girona, Girona 17071;

²Unit of Translational Research, Catalan Institute of Oncology-Girona, Dr Josep Trueta University Hospital, Girona 17007;

³Department of Medical Science, Girona Institute for Biomedical Research, University of Girona, Girona 17071, Catalonia;

⁴Institute of Molecular and Cellular Biology of Cancer, University of Salamanca, Salamanca 37007, Spain

Received March 1, 2012; Accepted May 4, 2012

DOI: 10.3892/ijo.2012.1509

Abstract. The deregulation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway plays a major role in the pathogenesis of prostate cancer (PCa). However, therapies targeting EGFR have demonstrated limited effectiveness in PCa. A potential mechanism to overcome EGFR blockade in cancer cells is the autocrine activation of alternative receptors of the human EGFR (HER) family through the overexpression of the HER receptors and ligands. In the present study, we were interested in analyzing if this intrinsic resistance mechanism might contribute to the inefficacy of EGFR inhibitors in PCa. To this end, we selected two androgen-independent human prostate carcinoma cell lines (DU145 and PC3) and established DU145 erlotinib-resistant cells (DUERr). Cells were treated with three EGFR inhibitors (cetuximab, gefitinib and erlotinib) and the sensitivity to each treatment was assessed. The gene expression of the four EGFR/HER receptors and seven ligands of the HER family was analyzed by real-time PCR prior to and after each treatment. The receptors expression and activation were further characterized by flow cytometry and western blot analysis. EGFR inhibition rapidly induced enhanced gene expression of the EGF, betacellulin and neuregulin-1 ligands along with HER2, HER3 and HER4 receptors in the DU145 cells. In contrast, slight changes were observed in the PC3 cells, which are defective in the phosphatase and tensin homolog (PTEN) tumor suppressor gene. In the erlotinib-resistant DUERr cells, the expression of HER2 and HER3 was increased at mRNA and protein levels together with neuregulin-1, leading to enhanced

HER3 phosphorylation and the activation of the downstream PI3K/Akt survival pathway. HER3 blockage by a monoclonal antibody restored the cytostatic activity of erlotinib in DUERr cells. Our results confirm that the overexpression and autocrine activation of HER3 play a key role in mediating the resistance to EGFR inhibitors in androgen-independent PCa cells.

Introduction

The growth and function of a normal prostate is mainly controlled via endocrine and paracrine factors. In this context, androgens play a major role by regulating the expression of specific genes to maintain the prostate homeostasis (1). When a prostate cancer (PCa) develops, the majority of the tumors remain initially androgen-dependent and thus, the first-line treatment of PCa is based on androgen ablation. However, in many cases the tumor cells progress to a hormone refractory state, generating androgen-independent tumors with increased proliferation and invasion capacity. In this situation, the therapeutic options are limited and the prognosis is poor (2). The proliferation of the androgen-independent PCa cells is mediated principally by autocrine factors, such as the epidermal growth factor and their receptors, which may interact with the androgen receptor in absence of androgen ligand binding, constituting an essential signaling pathway for tumor growth, invasion and metastasis (3,4).

The human epidermal growth factor receptor (HER) family includes four type 1 transmembrane receptors: EGFR, HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) and HER4 (ErbB4). They consist of a large extracellular ligand-binding region, a transmembrane segment and an intracellular tyrosine kinase domain. Stimulation through ligand binding induces the homodimerization or heterodimerization of a receptor with another family member at the plasma membrane, resulting in the phosphorylation of specific tyrosine residues in their cytoplasmic tail that leads to the activation of several signaling cascades, predominantly the ERK1/2 and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathways (5). These pathways control multiple biological processes like cellular proliferation, differentiation, survival, migration, and angiogenesis (6). Of the four receptors, HER2 and HER3

Correspondence to: Dr Anna Massaguer, Biochemistry and Molecular Biology Unit, Department of Biology, University of Girona, Campus Montilivi, Girona 17071, Catalonia, Spain
E-mail: anna.massaguer@udg.edu

Key words: prostate cancer, epidermal growth factor receptor, human epidermal growth factor receptor 3, neuregulin, erlotinib, resistance

are dependent proteins: the HER2 extracellular domain lacks ligand-binding capacity, while HER3 has a very weak kinase activity (7). However, HER2-HER3 heterodimers are highly functional and constitute the most active signaling dimer in this family. These receptors are activated by a number of ligands that are EGF-related peptide growth factors. They are classified in three groups depending on their receptor binding specificity: epidermal growth factor (EGF), amphiregulin (AR), epigen, and transforming growth factor- α (TGF- α) bind exclusively to EGFR; betacellulin (BTC), epiregulin (EPR) and heparin-binding EGF (HB-EGF) bind to EGFR and HER4; and the neuregulin (NRG1-4) family members, NRG1 and NRG2, bind to HER3 and HER4, whereas NRG3 and NRG4 bind exclusively to HER4 (8). Importantly, HER ligands diversify the pattern of receptor activation and can direct different biological responses, even when they bind to the same receptor (9). However, the HER ligands share a significant degree of functional redundancy, as HB-EGF is the only ligand whose absence results in postnatal lethality (10).

The HER family, especially EGFR and HER2, are frequently deregulated in cancer cells as a result of overexpression, mutations, or increased ligand production (11,12). In general terms, their enhanced expression in the tumor correlates with a worse clinical outcome (13,14). In the recent years, intense efforts have been focused on the development of therapeutic strategies to block EGFR and HER2 signaling. Two families of HER-directed agents have demonstrated clinical activity and are currently in use for the treatment of cancer: monoclonal antibodies (MAbs) directed against the extracellular domain of the receptors and small molecule tyrosine kinase inhibitors (TKIs) that bind to the ATP-binding site of the tyrosine kinase domain of the receptors (15-17). However, the marked differences in the specificity and clinical efficiency of the HER inhibitors in different carcinomas as well as the development of resistances have limited the efficacy of these drugs (18,19). In PCA, EGFR, HER2 and HER3 expression levels are increased as the disease progresses from localized to metastatic and to the androgen-independent state and these receptors have long been implicated in the survival of androgen-independent prostate cancer cells (20-23). Thus, the HER family members have been considered as potential therapeutic targets in prostate cancer. However, despite the blockade of EGFR or HER2 having demonstrated an ability to inhibit the proliferation of human prostate tumor cells (24-26), the clinical results have revealed only slight benefit of the HER-targeted therapy in patients with androgen-independent PCA both when EGFR inhibitors were administered as monotherapy or in association with antiandrogens or chemotherapeutics (27-33). The molecular mechanism underlying the low efficiency of EGFR inhibitors in human PCA remains to be elucidated.

As tumor cells co-express several HER receptors and ligands (34), the blockade of a single HER receptor function can be compensated by the cell both increasing the expression of alternative HER receptors or upregulating the production of HER-ligands, establishing autocrine growth factor loops that maintain downstream signaling and cellular proliferation. In a previous study, we described the capacity of a subset of breast cancer cell lines to compensate for the loss of EGFR receptor function after gefitinib treatment by upregulating the expression of genes coding for EGF-related ligands, especially EPR, NRG and EGF (35). The changes in the expression pattern remarkably

correlated with the intrinsic degree of sensitivity of the breast cancer cells to the antiproliferative effects of gefitinib. Similar findings were described for a cetuximab-resistant non-small cell lung cancer, which overexpressed HER family ligands, especially EGF, AR, HB-EGF and BTC (36), and for human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab, which presented an amplified ligand-induced activation of HER receptors (37). The overexpression of neuregulin has also been involved in the resistance of breast cancer cells to EGFR-TKIs (38,39). In addition, emerging studies are demonstrating that the reactivation of HER3 is a prominent mechanism of resistance to the current TKIs targeting EGFR and HER2 (40-42).

In this work, we were interested in examining the capacity of androgen-independent PCA cells to modulate the expression of the HER family members as an intrinsic mechanism of resistance to EGFR-targeted therapies. To this end, we have analyzed the changes in the expression pattern of different HER receptors and ligands in two androgen-independent PCA cell lines in response to the treatment with the EGFR-directed antibody cetuximab and two EGFR TKIs, gefitinib and erlotinib. We have also established an erlotinib-resistant cell line in order to further determine the relevance of this molecular mechanism in the resistance of prostate cancer cells to EGFR TKIs.

Materials and methods

Reagents. Cetuximab (Erbitux[®], Merck-Serono, Darmstadt, Germany) and trastuzumab (Herceptin[®], Roche, Basel, Switzerland) were kindly provided by the pharmacy of the Catalan Institute of Oncology (Hospital Dr Josep Trueta, Girona, Spain). Erlotinib (Tarceva[®]) was provided by Roche (London, UK) and gefitinib (Iressa[®]) was obtained from Astrazeneca (London, UK). For immunofluorescence assays, the monoclonal antibodies against human EGFR, HER2, HER3, and HER4 were obtained from Calbiochem (San Diego, CA, USA). The Alexa-Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used as a secondary reagent. The rabbit primary antibodies for EGFR, HER2, HER3, HER4, and β -actin immunoblotting were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The mouse monoclonal antibody against phospho HER2 (Tyr1248) was from Thermo Fisher (Fremont, CA, USA). The rabbit monoclonal antibodies against phospho-Akt^{Ser473} and phospho HER3 and the rabbit polyclonal antibodies against Akt, ERK1/2, and phospho HER1, as well as the mouse monoclonal antibody against Phospho ERK 1/2 were all from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). The mouse monoclonal antibody against NRG-1 β was from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). The peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Calbiochem. For neutralizing assays, a monoclonal antibody against HER3 (clone H3.105.5) was obtained from Calbiochem and the monoclonal antibody against NRG-1 (clone C-18) was from R&D Systems.

Cell lines. The PC3 and DU145 cell lines were obtained from the American Tissue Culture Collection (Rockville, MD, USA). The cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The cells were passaged twice a week. The erlotinib DU145-resistant cell line

(DUER) was established by continuously exposing the cells to increasing concentrations of erlotinib. Initially the cells were treated with their corresponding inhibitory concentration 50 (IC₅₀) of erlotinib (2.5 μ M) for one month. Subsequently, the erlotinib concentration in the culture medium was increased every month to 5, 10 and 15 μ M, and then the cells were maintained in continuous culture with the maximum achieved dose of erlotinib for three additional months. Control parental cells were cultured in parallel and exposed to the phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco-BRL) vehicle.

Growth assays. Exponentially growing cells were seeded at a density of 1.5×10^5 cells per dish in 100-mm diameter dishes. The cells were allowed to attach and grow for 72 h in culture medium and then gefitinib (15 μ M), erlotinib (15 μ M), cetuximab (500 μ g/ml) or a PBS vehicle alone (control cells) were added. Just before the treatments and at 24, 48 and 72 h, the cells were trypsinized and counted manually in a haemocytometer using the trypan blue dye exclusion test. Three independent counts were made from each treatment. All experiments were conducted in triplicate.

Cell proliferation assays. To assess the cytotoxicity of EGFR-inhibitors in DU145, PC3 and DUER cells, aliquots of 4,000 cells were seeded in 96-well plates. Three days later, the cells were treated with concentrations ranging from 0 to 15 μ M of erlotinib, 0 to 15 μ M of gefitinib, and 0 to 500 μ g/ml of cetuximab for 72 h. Then, the treatments were removed, the cells were washed with PBS and incubated for 3 h with 100 μ l of fresh culture medium together with 10 μ l of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The medium was discarded and dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich) was added to each well to dissolve the purple formazan crystals. Plates were agitated at room temperature for 10 min and the absorbance of each well was determined with an absorbance microplate reader (ELx800, BioTek, Winooski, VT, USA) at a wavelength of 570 nm. Three replicates were used for each experiment. The cell viability was determined as a percentage of the untreated control cells, by dividing the mean absorbance of each treatment by the mean absorbance of the untreated cells. The concentration that reduces cell viability by 50% (IC₅₀) was established for gefitinib and erlotinib, while the concentration that decreases cell viability by 30% (IC₃₀) was determined for cetuximab. Cell proliferation assays were also performed in order to evaluate the influence of different HER-blocking antibodies on the growth of parental DU145 cells and DUER cell, after treating the cells for 72 h with either 15 μ M of erlotinib, 10 μ g/ml of trastuzumab, a humanized monoclonal antibody against the extracellular domain of HER2, 10 μ g/ml of the anti-HER3 blocking antibody H3.105.5, 10 μ g/ml of an anti-neuregulin-1 antibody or by different combinations of these compounds.

Quantitative real-time PCR analysis. DU145 and PC3 cells were treated for 24 h with a concentration analogous to the IC₃₀ for cetuximab (350 μ g/ml and 500 μ g/ml, respectively) or to the IC₅₀ for erlotinib and gefitinib (2.5 μ M and 15 μ M, respectively) or with vehicle alone as a control. DUER cells exposed to either erlotinib (15 μ M) were also analysed. The cells were washed

with PBS and immediately trypsinized. The total-RNA from each sample was isolated using the RNeasy mini kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). The RNA concentration was measured using an ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) at 260 nm, and 1 μ g of each RNA was reverse-transcribed into complementary DNA (cDNA) using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The expression of the HER family members EGFR, HER2, HER3, HER4, EGF, TGF- α , AR, BTC, EPR, HB-EGF, and NRG-1 was quantified by real-time PCR using a pre-designed, gene-specific TaqMan[®] probe and primer sets (TaqMan[®] Gene Expression assays, Applied Biosystems). Quantitative PCR was performed in a standard 96-well plate format using the TaqMan One-Step Universal Master Mix (Applied Biosystems) and the 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Cycling conditions were 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. All samples were tested in triplicate. The relative quantification of the mRNA level (μ g/ml) of HER receptors and ligands was carried out by preparing a standard curve using known dilutions of its corresponding standard RNA. Then, the mRNA level was normalized to the mRNA level of the housekeeping gene TATA box binding (TBP) protein.

Immunofluorescence analysis. The quantification of HER receptor expression on the cell membrane was performed using flow cytometry. The cells were analyzed by double immunofluorescence using monoclonal antibodies against human EGFR, HER2, HER3 and HER4 (Calbiochem). The cells were incubated for 30 min at 4°C with the primary antibody. After washing with PBS, the cells were incubated for 30 min at 4°C in the presence of the Alexa-Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG antibody. Fluorescence was analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) equipped with CellQuest[™] software (Becton Dickinson). Fluorescence intensity was represented on a four orders of magnitude log scale (1-10,000). In each experiment 10,000 cells were analyzed.

Western blot analysis. For western blot analyses, parental DU145 cells (exposed to either medium alone or supplemented with erlotinib (2.5 μ M)) and DUER cells (continuously exposed to erlotinib (15 μ M)) were collected and lysed with ice-cold lysis buffer containing 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 100 μ g/ml PMSF, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) and protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma-Aldrich). Protein concentrations were determined by Lowry-based Bio-Rad assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Equal amounts of protein extracts were electrophoresed on an 8% SDS-PAGE gel, transferred to nitrocellulose membranes and blocked for 1 h at room temperature in a blocking buffer containing 2.5% powdered skim milk in PBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl and 0.05% Tween-20) to prevent non-specific antibody binding. Blots were incubated overnight at 4°C with the corresponding primary antibody diluted in blocking buffer. After washes in PBS-T, blots were incubated for 1 h with the corresponding secondary antibody, and revealed with a commercial kit (West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Blots were reprobbed with an antibody for β -actin to control the protein loading and transfer.

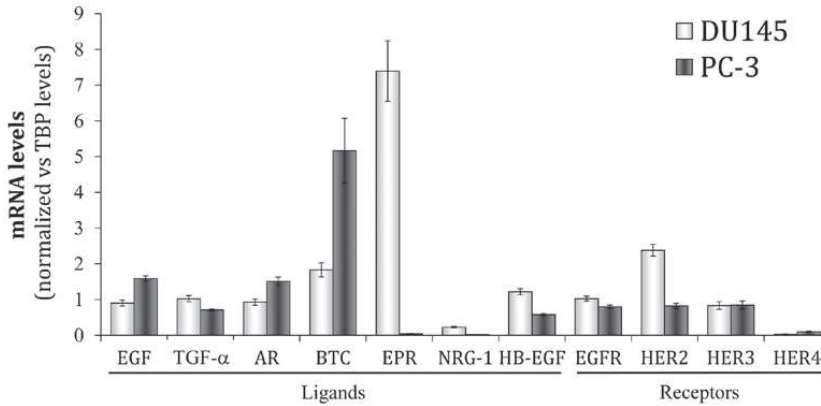


Figure 1. Gene expression pattern of HER family members in DU145 and PC3 cells. The basal mRNA level of each HER receptor (EGFR, HER2, HER3, HER4) and ligand (EGF, epidermal growth factor; TGF- α , transforming growth factor- α ; AR, amphiregulin; BTC, betacellulin; EPR, epiregulin; NRG-1, neu-regulin-1; HB-EGF, heparin-binding EGF) was assessed by real-time PCR. Each value was normalized versus the corresponding mRNA level of the TATA box binding protein (TBP) constitutive gene. The bars represent the mean value \pm SE of three independent quantifications.

Statistical analysis. The statistical analysis was performed with the SPSS statistical software for Windows (version 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Quantitative variables were expressed as mean and standard error (SE). The normality of the data was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. The differences between data with normal distribution and homogeneous variances were analyzed using the parametric Student's t-test, otherwise the non-parametric Mann-Whitney U test was applied. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Basal expression of HER family receptors and ligands in prostate cancer cells. The basal expression of the four HER receptors and seven different ligands (EGF, TGF- α , AR, BTC, EREG, NRG-1 and HB-EGF) was determined according to their mRNA levels in two androgen-independent human carcinoma cell lines, DU145 and PC3 cells, which are derived from metastases of prostate cancer, to brain and bone, respectively. Real-time PCR analyses revealed mRNA expression for the four HER receptors in both cell lines, although minimal constitutive levels of the HER4 mRNA were detected (Fig. 1). In the DU145 cells, HER2 was the receptor with the most prominent mRNA expression, followed by EGFR and HER3. EGFR, HER2 and HER3 showed similar mRNA levels in the PC3 cells. HER2 mRNA expression was markedly higher in the DU145 cells than in the PC3 cells, while EGFR expression was only moderately increased. The receptors expression on the cell surface was additionally analyzed by flow cytometry (Fig. 2) confirming higher protein levels of both EGFR and HER2 in the DU145 cells than in the PC3 cells. The membrane expression of HER3 was parallel in both cell lines. In accordance with the low mRNA levels, a very weak HER4 expression on the cell surface was observed in both cell lines.

Regarding the ligands, a basal gene expression of all HER ligands analyzed was detected in both cell lines (Fig. 1). Interestingly, each cell line showed a particular expression

pattern with a primarily expressed HER ligand: EPR was over-expressed in DU145 cells, while BTC was the principal ligand in PC3 cells. This is a typical feature of nearly all the epithelial cancer cells, which characteristically deregulate the expression of one or more members of the HER family (43). Notably, neuregulin-1 was the ligand with the lowest mRNA levels in both cell lines, particularly in PC3 cells.

Sensitivity of the prostate cancer cells to EGFR inhibitors. The sensitivity of the prostate cancer cells to the EGFR inhibitors was established according to the concentration of each drug required to decrease the cell viability by 50% (IC_{50}) for the TKIs erlotinib and gefitinib or by 30% (IC_{30}) in the case of the monoclonal antibody cetuximab, as the maximal concentration of cetuximab tested (500 μ g/ml) did not reduce the cell viability by 50% in any cell line. As detailed in Fig. 3A, the IC_{50} values for both TKIs were around 2.5 μ M in DU145 cells while values were 4 to 5-folds higher in PC3 cells. The IC_{30} of cetuximab was 353 μ g/ml in DU145 and higher than 500 μ g/ml in the PC3. According to these results, the DU145 cells were more sensitive to the three anti-EGFR agents than PC3 cells. These observations were confirmed in the cell growth assays, where both cell lines were treated for up to 72 h with an elevated concentration of each compound: 15 μ M for erlotinib and gefitinib and 500 μ g/ml for cetuximab. Analysis of the growth curves (Fig. 3B) showed that the proliferation rate of DU145 cells was significantly reduced by the three EGFR inhibitors. At 72 h, the cell number was about four times lower in the erlotinib- and gefitinib-treated DU145 cells than in untreated cells, while the cetuximab effect on cell growth was more moderated. A more attenuated effect of the treatments in the PC3 cells growth was observed.

Effect of the EGFR inhibitors on the expression pattern of HER receptors and ligands. The effect of EGFR inhibitors on the endogenous expression of HER receptors and ligands was determined at the mRNA levels 24 h after treating the cells with a concentration analogous to the IC_{30} for cetuximab, to the IC_{50} for erlotinib and gefitinib, or with vehicle alone as a

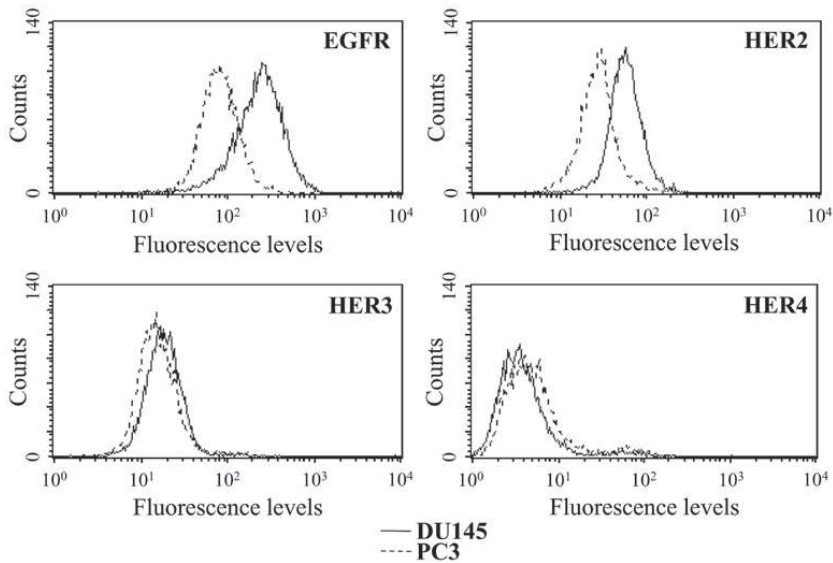


Figure 2. Basal protein expression of HER receptors on DU145 and PC3 cells. The expression of HER receptors (EGFR, HER2, HER3 and HER4) on the cell surface was determined by flow cytometry after indirect immunofluorescence staining with the corresponding antibodies. Histograms were obtained after analyzing 10,000 cells. The fluorescence intensity is shown on a four-decade log scale. Solid lines represent DU145 cells and dashed lines PC3 cells.

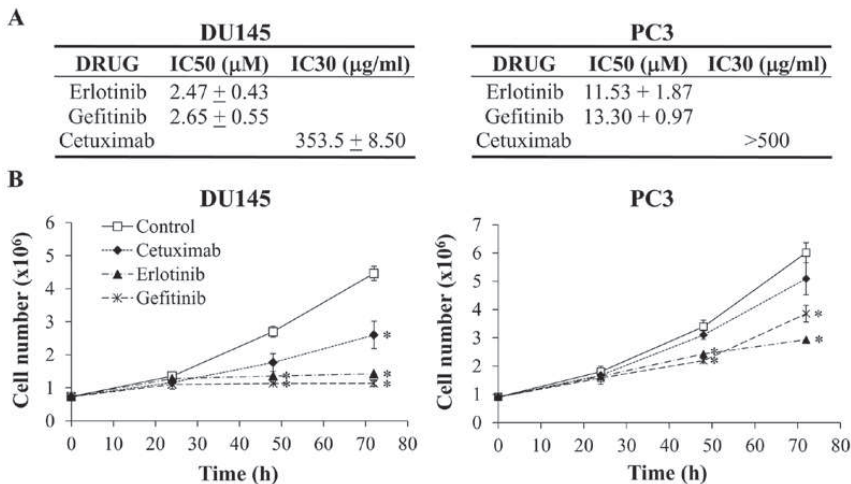


Figure 3. Sensitivity of DU145 and PC3 cells to EGFR inhibitors. (A) The concentration of cetuximab (μ g/ml) and erlotinib/gefitinib (μ M), which inhibit by 30% (IC₃₀) and 50% (IC₅₀), respectively, the DU145 and PC3 cell viability in 72 h, was determined using the MTT assay. Each value represents the mean \pm SE of three independent experiments. (B) Cell growth inhibition after exposing DU145 and PC3 cells to cetuximab (500 μ g/ml), erlotinib (15 μ M) and gefitinib (15 μ M) or vehicle alone (control). The viable cell number was determined by triplicate 0, 24, 48 and 72 h after each treatment using the trypan blue dye exclusion test. The mean value \pm SE of three independent experiments are represented in the graphs (* P <0.05 vs. control cells).

control. Fig. 4 represents the variations in the gene expression compared with the corresponding untreated cells. Significant changes were observed in the DU145 cells, which overexpressed a subset of HER family members, while only minor differences were observed in the PC3 cells. The treatment with cetuximab and the TKIs caused similar effects on each gene expression profile; although in most cases gefitinib induced the most marked changes. Remarkably, the inhibition of EGFR in the

DU145 cell line induced the mRNA overexpression of three HER ligands that display different binding affinities: EGF, BTC and NRG-1. While EGF exclusively binds EGFR, BTC is a potent survival factor that activates both EGFR and HER4 (44) and NRG-1 is a HER3 and HER4 ligand that acts as a strong mitogenic factor (45). No changes were detected in the mRNA levels of epiregulin, which is the most predominantly expressed HER ligand in DU145 cells. Along with these changes, the

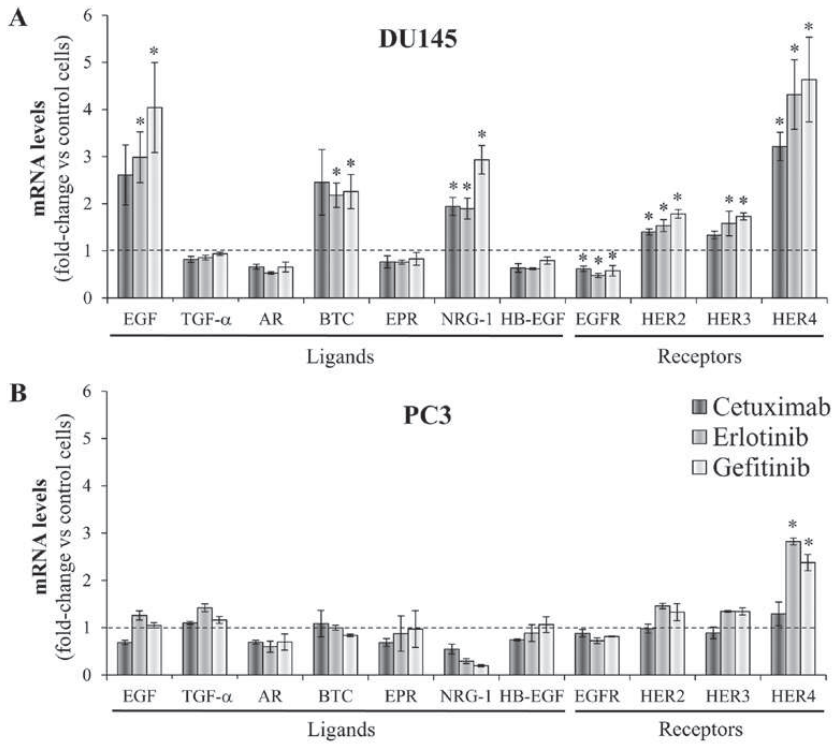


Figure 4. Changes in the gene expression of HER receptors and ligands after EGFR inhibition. (A) DU145 and (B) PC3 cells were treated with either the corresponding IC₅₀ of cetuximab (350 μ g/ml and 500 μ g/ml, respectively), the corresponding IC₅₀ of erlotinib (2.5 μ M and 15 μ M, respectively) and gefitinib (2.5 μ M and 15 μ M, respectively) or vehicle as a control. After 24 h, the mRNA level of each HER receptor (EGFR, HER2, HER3, HER4) and ligand (EGF, epidermal growth factor; TGF- α , transforming growth factor- α ; AR, amphiregulin; BTC, betacellulin; EPR, epiregulin; NRG-1, neuregulin-1; HB-EGF, heparin-binding EGF) was assessed by real-time PCR in each cell line and values were normalized against the corresponding mRNA expression of the TBP constitutive gene. Then, the change in the expression of each particular gene induced by the treatments was determined by comparing the normalized values in treated cells against the corresponding normalized value in the control cells. The bars indicate the mean fold change \pm SE of three independent quantifications ($P < 0.05$ vs. control cells). Bars over the dotted line indicate an increase in the gene expression compared to the control cells, while bars under the dotted line represent impaired gene expression after the treatment.

mRNA level of HER2 and HER3 were moderately increased in the DU145 cells, while EGFR levels were reduced. Particularly, HER4 expression was upregulated four-fold after EGFR blockade. HER4 levels were also significantly increased but to a lesser extent, after the treatment of the PC3 cells with the TKIs.

Expression of the HER receptors and ligands in erlotinib-resistant DUErR cells. In order to analyze if the overexpression of alternative HER family members might be involved in the acquired resistance to EGFR inhibitors in PCa, an erlotinib-resistant DU145 cell line (DUErR) was established by exposing the cells to increasing concentrations (up to 15 μ M) of erlotinib during three months followed by three additional months of cell culture in the maximal concentration of erlotinib. As represented in Fig. 5, the viability of DUErR cells was not affected by increasing concentrations of erlotinib (up to 15 μ M) in the cell culture (Fig. 5A). DUErR proliferation rate was similar when the cells were cultured in the presence of erlotinib (15 μ M) or vehicle alone (PBS) (Fig. 5B). In contrast, the viability and proliferation of the parental DU145 cells was markedly inhibited by erlotinib. Notably, the DUErR cell line presented a slower proliferation

rate compared to the parental DU145 cells (Fig. 5B). DUErR cells were also cross-resistant to gefitinib (data not shown).

Next, the mRNA expression profile of HER receptors and ligands was determined by real-time PCR in the DUErR cells and the differences from the parental control DU145 cells were assessed. As shown in Fig. 6, in erlotinib-exposed DUErR cells the NRG-1 mRNA expression was significantly amplified (more than 2-fold) and TGF- α expression was almost doubled compared to parental DU145 control cells. HB-EGF expression was significantly impaired in these cells. Regarding HER receptors, a 2-fold increase in HER2 and HER3 mRNA levels was detected in the erlotinib-exposed DUErR cells while slight differences in HER4 mRNA levels were observed compared with control DU145 cells. Western blot analyses confirmed an upregulation of HER2 and HER3 protein expression in erlotinib-treated DUErR cells and a weak expression of HER4 (Fig. 7A).

HER receptors activation and downstream signaling activity in DUErR cells. The activation of EGFR, HER2, and HER3 receptors and the downstream signaling proteins, Akt and ERK1/2, was evaluated in control DU145 cells, erlotinib-

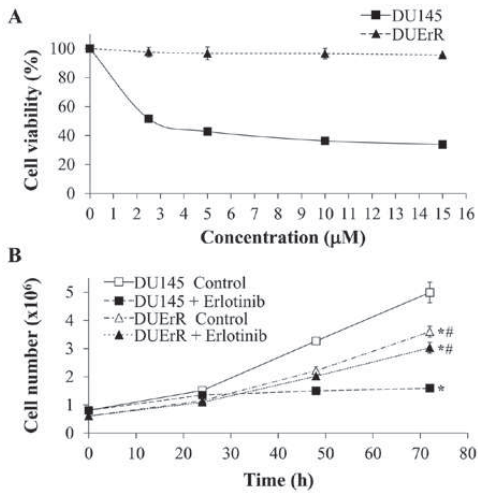


Figure 5. Growth profiles of parental DU145 cells and erlotinib-resistant cells (DUERr) exposed to erlotinib. (A) Cells were cultured in medium containing increasing concentrations of erlotinib (0, 2.5, 5, 10 and 15 µM) for 72 h and the cell viability was determined by MTT assays. (B) DU145 and DUERr cells were cultured in medium alone (control) or medium containing 15 µM erlotinib (+erlotinib) and the total cell number in each situation was assessed by triplicate at different time points (0, 24, 48 and 72 h) using the trypan blue dye exclusion test. Each point in the graphs represents the mean ± SE of three independent experiments. *P<0.05 vs. control DU145 cells; #P<0.05 vs. erlotinib-treated DU145 cells.

treated DU145 cells and erlotinib-exposed DUERr cells. As presented in Fig. 7A, erlotinib treatment completely abolished the phosphorylation of EGFR both in DU145 cells and in DUERr cells. In DUERr cells, together with the overexpression of HER2 and HER3, we detected a marked increase in HER3 phosphorylation and a more attenuated activation of HER2.

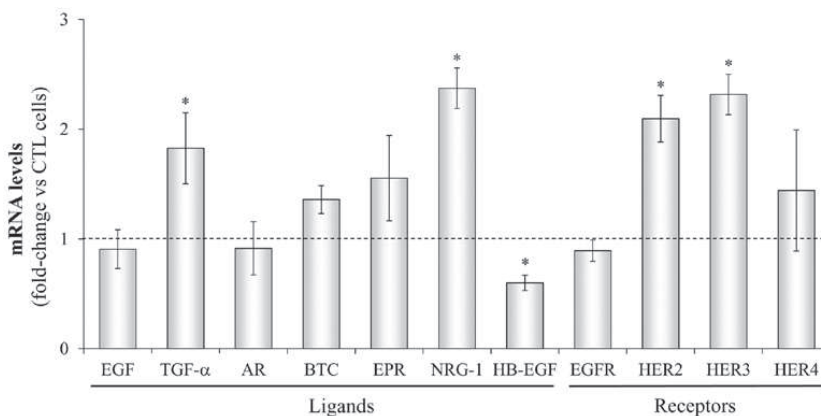


Figure 6. Changes in the gene expression of HER receptors and ligands in DUERr cells. The gene expression of each HER receptor (EGFR, HER2, HER3, HER4) and ligand (EGF, epidermal growth factor; TGF-α, transforming growth factor-α; AR, amphiregulin; BTC, betacellulin; EPR, epiregulin; NRG, neuregulin; HB-EGF, heparin-binding EGF) was determined by real-time PCR in parental DU145 cells (control) and in erlotinib-resistant DUERr cells (cultured in medium containing 15 µM erlotinib). Each value was normalized against the corresponding mRNA level of the TBP constitutive gene. Then, the change in the expression of each particular gene was assessed in DUERr cells compared to the control cells. The bars represent the mean fold-change ± SE of three independent quantifications (*P<0.05 vs. control cells). Bars over the dotted line indicate an increase in the gene expression compared to the control cells, while bars under the line represent impaired gene expression after the treatment.

HER3 overactivation was associated with enhanced levels of activated Akt in DUERr cells, while slight effects were observed in ERK1/2 phosphorylation (Fig. 7B). In contrast, after the acute treatment of DU145 cells for 72 h with erlotinib, the phosphorylation of HER3 was not increased compared to control cells (Fig. 7A). Thus, the signaling through the HER3/PI3K/Akt pathway was selectively activated after the prolonged exposure of DU145 cells to erlotinib, providing a resistance mechanism to the EGFR TKI.

Effect of HER2 and HER3 inhibition on the proliferation of parental and erlotinib-resistant DU145 cells. In order to further determine the relative contribution of the HER receptors in the growth function of parental and erlotinib-resistant DU145 cells, both cell lines were exposed to HER2 and HER3 inactivating antibodies (trastuzumab and H3.105.5, respectively) at a dose of 10 µg/ml for 72 h (46), in presence or absence of erlotinib. As shown in Fig. 8A, the proliferation rate of both cell lines was unaffected by HER2 inhibition. Trastuzumab also failed to decrease the cell proliferation when EGFR signaling was inhibited by erlotinib (Fig. 8B). In contrast, the cell growth was significantly reduced to half when HER3 was blocked both in parental and in erlotinib resistant cell lines (Fig. 8A), revealing a key role for HER3 in mediating the proliferation of these androgen-independent prostate cells. In addition, the combination of erlotinib and the HER3 blocking antibody lead to a 25% decrease in the proliferation of parental DU145 cells compared with DU145 cells exposed to erlotinib alone. Notably, this combination resulted in a 50% reduction in the growth of DUERr cells, restoring the cytotoxic activity of erlotinib in these cells. These results confirm a key role for HER3 in sustaining the proliferation of prostate cells when the signaling through EGFR is inhibited. The contribution of neuregulin-1, which is a HER3 ligand, in activating the cell proliferation was also analyzed as our previous results demonstrated that both neuregulin-1 gene and protein expression was increased after the acute and

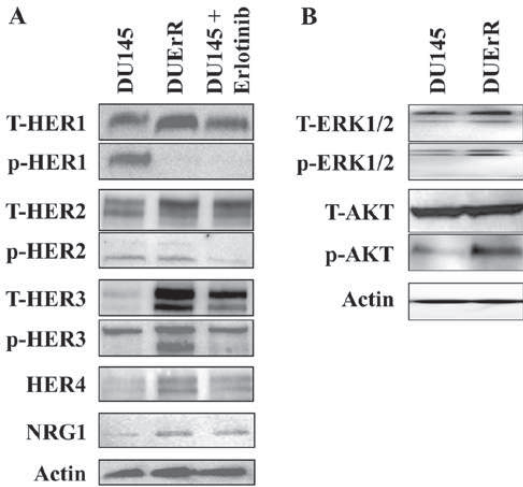


Figure 7. HER receptors activation and downstream signaling in control, erlotinib-treated and erlotinib-resistant DU145 cells. (A) Equal amounts of protein lysates from parental DU145 cells [exposed to either medium alone (control) or supplemented with erlotinib (2.5 μ M)] and erlotinib-resistant (DUERr) cells [continuously exposed to erlotinib (15 μ M)] were immunoblotted with anti-EGFR, anti-HER2, anti-HER3, anti-HER4 and anti-neuregulin-1 (NRG1) antibodies to determine the protein levels. Receptor activation was analyzed by assessing their phosphorylation status using the corresponding phospho-specific antibody. (B) Total and phosphorylated levels of the ERK1/2 and AKT signaling proteins were specifically determined in control DU145 cells and erlotinib-exposed DUERr cells. Actin levels were used as loading control.

prolonged exposure of DU145 cells to erlotinib. However, after incubating the cells with an antibody against neuregulin-1, we observed a very moderate reduction on cell proliferation. These results suggest a relative role for neuregulin-1 in promoting the cell survival, probably because other ligands, like neuregulin-2, may be involved in activating the signaling through HER3 in these cells. In addition, a recent work describe that HER3 may be activated in a neuregulin-1 independent manner in DU145 cells (22).

Discussion

EGFR expression is involved in PCa progression and correlates with androgen independence and metastasis of prostate cancer cells (3,4,47). However, the results of clinical trials involving EGFR inhibitors have revealed a reduced efficacy in PCa patients (27-29,35). The cooperative nature of the HER family might play an important role in the low effectiveness of drugs targeting EGFR as the co-expression of different HER members in the cancer cell can activate parallel signaling pathways to circumvent the inhibition of this specific receptor (6,48). Actually, analysis of clinical data has revealed that patients overexpressing two or more HER family members develop more aggressive malignancies than patients that overexpress a single receptor (49-52).

In the present study, we were interested in determining if the endogenous expression of alternative HER family members might contribute to the inefficacy of EGFR inhibitors in PCa cells. To this end, the expression pattern of EGFR, HER2, HER3, and

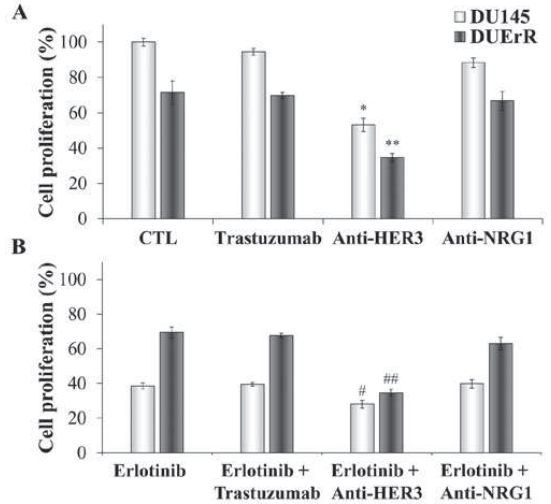


Figure 8. Effect of EGFR, HER2 and HER3 inhibition on the proliferation of parental and erlotinib-resistant DU145 cells. DU145 and DUERr cells were exposed for 72 h to antibodies directed at either HER2 (trastuzumab), HER3 (anti-HER3) or neuregulin (anti-NRG1) alone (A) or combined with erlotinib (15 μ M) (B) and the relative cell proliferation versus untreated (control) DU145 cells was assessed. Each column in the graph represents the mean \pm SE of three independent experiments. *P<0.05 vs. DU145 control cells; **P<0.05 vs. DUERr control cells; #P<0.05 vs. erlotinib-treated DU145 cells; ##P<0.05 vs. erlotinib-treated DUERr cells.

HER4 as well as seven ligands of the HER family was assessed in the DU145 and PC3 androgen-independent human prostate carcinoma cell lines at basal level and after the treatment with the EGFR-directed antibody cetuximab and the EGFR TKIs gefitinib and erlotinib. Both cell lines are EGFR-positive, however PC3 cells lack the phosphatase and tensin homolog tumor (PTEN) gene expression, which is a tumor suppressor protein that down-regulates the PI3K/Akt pathway. The loss of PTEN results in a continuous signaling through the PI3K/Akt pathway independently of the upstream receptor activation (53-55). The absence of the PTEN gene is a common feature of PCa, as about 50% of prostate tumors lack PTEN expression (56). Our results showed that the sensitivity to EGFR inhibitors, determined as IC₅₀ or IC₃₀ values as well as the inhibition of the cell growth, was markedly higher in the PTEN-positive DU145 cells than in the PC3 cells. These results are in agreement with a previous study, where the sensitivity against erlotinib was strongly dependent on PTEN presence in PCa cells (26). In that study, the efficacy of erlotinib was inversely related to the EGFR/HER2 ratio; however, we did not find this association. Our data indicate a direct association between EGFR expression levels and the effectiveness of the treatments.

Our findings have demonstrated the constitutive co-expression of different HER receptors and ligands at the mRNA level in both PCa cell lines. The expression profile of the HER ligands was cell type-specific. Epiregulin was the predominant ligand in DU145 cells while betacellulin was the main ligand in PC3 cells. Both are EGFR ligands, which is the most largely expressed receptor at protein level in both cell lines. Thus,

tumor cell proliferation could be sustained autonomously by the autocrine production of growth factors. In fact, both cell lines were able to proliferate independently of the exogenous supply of growth factors in the cell culture (data not shown). Highly increased expression of epiregulin and amphiregulin, together with TGF- α and HB-EGF, has been previously described in androgen-independent prostate cancer compared to normal prostate epithelial cells or androgen-sensitive cancer cells (57,58). Epiregulin and amphiregulin expression also increased after androgen deprivation in an androgen-sensitive prostate cancer xenograft, indicating that these growth factors might contribute to the tumor progression to an androgen-independent stage (59). In addition, the expression of epiregulin in breast cancer cells together with further three genes was identified as a key determinant for pulmonary metastasis (60). Epiregulin and amphiregulin gene expression has also been associated with the development of liver metastasis in colorectal cancer patients (61). Our group and others have recently reported that an elevated gene expression of epiregulin and amphiregulin in cancer cells might be a predictive marker of the therapeutic response to cetuximab (62,63). In keeping with this observation, the epiregulin-overexpressing DU145 cells were markedly more sensitive to cetuximab than the PC3 cell line.

In response to inhibition of EGFR signaling by cetuximab, gefitinib and erlotinib treatments, the gene expression of EGF, betacellulin and neuregulin ligands along with the HER2, HER3 and HER4 receptors was significantly increased in the DU145 cells. Interestingly, the alternative binding affinities of these ligands might activate all possible HER heterodimers to compensate the loss of EGFR function and preserve the EGFR downstream cell signaling. In contrast, slight differences in the mRNA levels of HER family members were observed in the PC3 cell line, which only upregulated HER4 expression, indicating that the autocrine growth factor loops are attenuated when the signaling activity through the EGFR pathways is constitutively activated independently of ligand binding. While the upregulation of HER2 and HER3 was moderate in DU145 cells, the mRNA levels of HER4 were increased by four times after EGFR inhibition. A few studies have analyzed the role of HER4 receptor in PCa, and the conclusions are controversial. Some investigators have correlated the expression of HER4 with enhanced prostate cell proliferation and migratory capacity (64,65), but others have reported that HER4 has a tumor-suppressive effect (66,67). HER4 activity has also been related to acquired resistance to anti-EGFR therapies, as the signaling through the PI3K/Akt survival pathway can be alternatively activated by HER4 (39). Although we have observed a marked increase in HER4 mRNA levels shortly after EGFR inhibition, the low protein expression of HER4 in DU145 cells suggest a reduced contribution of this receptor to overcome EGFR blockade.

There is growing evidence that tumor cells might circumvent the effects of EGFR inhibitors through the promotion of HER3/HER2 heterodimerization and the activation of the PI3K/Akt pathway (38,45,61,68-70). Our results confirm the relevance of HER3 in mediating resistance to EGFR TKIs in androgen-independent prostate cancer cells. The erlotinib-resistant (DUER) cells, as well as the parental DU145 cells, showed a strong dependence on HER3 for proliferation, as HER3 neutralization lead to a significant reduction in the growth of both cell lines. The prolonged exposure of DU145

cells to erlotinib induced a reprogramming of HER family members expression and HER2 and HER3 levels were significantly upregulated, along with neuregulin-1, which is a HER3 natural ligand, and TGF- α , which exclusively binds EGFR. Ligand-activated HER3 might be then transactivated by heterodimerization with HER2, or even with relatively low levels of active EGFR, leading to an enhanced activity through the PI3K/Akt survival pathway and, thus providing a plausible escape mechanism to the EGFR blockade. Importantly, HER3 inhibition rendered the DUER cells sensitive to erlotinib, indicating a key role for this receptor in driving the resistance to EGFR-targeted therapies in PCa cells.

HER ligands have also been considered as targets for cancer therapy, as the loss of HER receptors function can be balanced by the endogenous expression of their cognate ligands by cancer cells. However the redundancy of ligands for each receptor may limit the effectiveness of this strategy, leading to a general consensus that inhibiting the receptor function is more effective than inhibiting multiple ligands. Our results are in keeping with this hypothesis, as the proliferation of the cells was prominently reduced after blocking the HER3 receptor, while targeting a particular ligand, neuregulin-1, revealed a minor effectiveness in reducing the cell growth.

In conclusion, our results show the ability of the androgen-independent PCa cells to rapidly modulate the expression of HER receptors and ligands to sustain the cell proliferation after EGFR blockage and a central role for HER3 in mediating resistance to EGFR inhibition. This molecular mechanism might be especially relevant in the physiological conditions, as the proliferation of malignant prostate cells is markedly dependent on the autocrine release of growth factors as well as the expression of their corresponding receptors in the tumor microenvironment. Therefore, the clinical efficacy of the current therapeutic approaches targeting EGFR in prostate cancer might be improved by the dual inhibition of EGFR and HER3 receptors.

Acknowledgements

We acknowledge the Instituto de Salud Carlos III (grants RD06/0020/0041, RD06/0020/0028), Universitat de Girona (grant PUG2007A/10) and Generalitat de Catalunya (grant 2009SGR208) for providing funding for this project. D.C.S. and C.P. acknowledge their fellowships from Ministerio de Educación y Ciencia (grant AP2007-01953) and Universitat de Girona (grant BR08/19), respectively.

References

1. Zhu ML and Kyprianou N: Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 15: 841-849, 2008.
2. Pomerantz M and Kantoff P: Advances in the treatment of prostate cancer. *Annu Rev Med* 58: 205-220, 2007.
3. Traish AM and Morgentaler A: Epidermal growth factor receptor expression escapes androgen regulation in prostate cancer: a potential molecular switch for tumour growth. *Br J Cancer* 101: 1949-1956, 2009.
4. Shah RB, Ghosh D and Elder JT: Epidermal growth factor receptor (ErbB1) expression in prostate cancer progression: correlation with androgen independence. *Prostate* 66: 1437-1444, 2006.
5. Yarden Y and Sliwkowski MX: Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 127-137, 2001.

50. Onn A, Correa AM, Gilcrease M, *et al*: Synchronous overexpression of epidermal growth factor receptor and HER2-neu protein is a predictor of poor outcome in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10: 136-143, 2004.
51. Chow NH, Chan SH, Tzai TS, Ho CL and Liu HS: Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 7: 1957-1962, 2001.
52. Wiseman SM, Makretsov N, Nielsen TO, *et al*: Coexpression of the type 1 growth factor receptor family members HER-1, HER-2, and HER-3 has a synergistic negative prognostic effect on breast carcinoma survival. *Cancer* 103: 1770-1777, 2005.
53. Brader S and Eccles SA: Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in tumor progression, invasion and angiogenesis. *Tumori* 90: 2-8, 2004.
54. Festuccia C, Muzi P, Millimaggi D, *et al*: Molecular aspects of gefitinib antiproliferative and pro-apoptotic effects in PTEN-positive and PTEN-negative prostate cancer cell lines. *Endocr Relat Cancer* 12: 983-998, 2005.
55. Wang G, Reed E and Li QQ: Apoptosis in prostate cancer: progressive and therapeutic implications (Review). *Int J Mol Med* 14: 23-34, 2004.
56. Vlietstra RJ, van Alewijk DC, Hermans KG, van Steenbrugge GJ and Trapman J: Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts. *Cancer Res* 58: 2720-2723, 1998.
57. Zhu Z, Kleeff J, Friess H, *et al*: Epiregulin is Up-regulated in pancreatic cancer and stimulates pancreatic cancer cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 1019-1024, 2000.
58. Topping N, Jorgensen PE, Sorensen BS and Nexø E: Increased expression of heparin binding EGF (HB-EGF), amphiregulin, TGF alpha and epiregulin in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Anticancer Res* 20: 91-95, 2000.
59. Topping N, Hansen FD, Sorensen BS, Orntoft TF and Nexø E: Increase in amphiregulin and epiregulin in prostate cancer xenograft after androgen deprivation-impact of specific HER1 inhibition. *Prostate* 64: 1-8, 2005.
60. Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC, *et al*: Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature* 446: 765-770, 2007.
61. Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, *et al*: Prediction of liver metastasis after colorectal cancer using reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of 10 genes. *Eur J Cancer* 46: 2119-2126, 2010.
62. Oliveras-Ferreros C, Vall-Llovera AM, Salip DC, *et al*: Evolution of the predictive markers amphiregulin and epiregulin mRNAs during long-term cetuximab treatment of KRAS wild-type tumor cells. *Invest New Drugs* 30: 846-852, 2012.
63. Baker JB, Dutta D, Watson D, *et al*: Tumour gene expression predicts response to cetuximab in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 104: 488-495, 2011.
64. Ben-Yosef R, Starr A, Karaush V, *et al*: ErbB-4 may control behavior of prostate cancer cells and serve as a target for molecular therapy. *Prostate* 67: 871-880, 2007.
65. Vexler A, Lidawi G, Loew V, *et al*: Anti-ERBB4 targeted therapy combined with radiation therapy in prostate cancer. Results of in vitro and in vivo studies. *Cancer Biol Ther* 7: 1090-1094, 2008.
66. Edwards J, Traynor P, Munro AF, Pirret CF, Dunne B and Bartlett JM: The role of HER1-HER4 and EGFRvIII in hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 12: 123-130, 2006.
67. Center MM, Jemal A, Smith RA and Ward E: Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin* 59: 366-378, 2009.
68. De Alava E, Ocana A, Abad M, *et al*: Neuregulin expression modulates clinical response to trastuzumab in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 25: 2656-2663, 2007.
69. Motoyama AB, Hynes NE and Lane HA: The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* 62: 3151-3158, 2002.
70. Normanno N, De Luca A, Maiello MR, *et al*: The MEK/MAPK pathway is involved in the resistance of breast cancer cells to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib. *J Cell Physiol* 207: 420-427, 2006.

Oliveras-Ferraros C, Massaguer Vall-Llovera A, Vazquez-Martin A, Carrion-Salip D, Queralt B, Cufí S, Martin-Castillo B, Bosch-Barrera J, Brunet J, De Llorens R and Menendez JA. "Transcriptional upregulation of HER2 expression in the absence of HER2 gene amplification results in cetuximab resistance that is reversed by trastuzumab treatment". *Oncology Reports*. Vol. 27, issue 6 (2012) : 1887-1892

<http://dx.doi.org/10.3892/or.2012.1732>

Copyright © Spandidos Publications 2012

Transcriptional upregulation of HER2 expression in the absence of *HER2* gene amplification results in cetuximab resistance that is reversed by trastuzumab treatment

CRISTINA OLIVERAS-FERRAROS^{1,2}, ANNA MASSAGUER VALL-LLOVERA³,
ALEJANDRO VAZQUEZ-MARTIN^{1,2}, DOLORS CARRION SALIP³, BERNARDO QUERALT^{2,4},
SILVIA CUFÍ^{1,2}, BEGOÑA MARTIN-CASTILLO^{2,5}, JOAQUIM BOSCH-BARRERA^{2,4},
JOAN BRUNET^{2,4}, RAFAEL DE LLORENS³ and JAVIER A. MENENDEZ^{1,2}

¹Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology (ICO); ²Girona Biomedical Research Institute (IdIBGi); ³Biochemistry and Molecular Biology Unit, Department of Biology, University of Girona; ⁴Medical Oncology, Catalan Institute of Oncology (ICO); ⁵Unit of Clinical Research, Catalan Institute of Oncology (ICO), Girona, Catalonia, Spain

Received January 24, 2012; Accepted February 28, 2012

DOI: 10.3892/or.2012.1732

Abstract. The recent identification of *HER2* gene amplification as a novel predictor of resistance to the EGFR (*HER2*)-targeted antibody cetuximab and of response to combination therapies against EGFR and *HER2* in wild-type *KRAS* tumor settings may represent a further step toward personalized medicine for patients with colorectal cancer. Herein, we show that transcriptional upregulation of *HER2* expression in the absence of *HER2* gene amplification is a molecular phenomenon that takes place in EGFR-dependent, wild-type *KRAS* squamous cell carcinoma (SCC) cells that acquire resistance to cetuximab. Since cetuximab activity against cetuximab-refractory SCC cells can be fully restored in the presence of the anti-*HER2* monoclonal antibody trastuzumab, our findings suggest that, beyond *HER2* gene amplification, we might need to redefine the threshold values for *HER2* positivity to improve the accuracy of the selection of cetuximab-refractory patients with wild-type *KRAS* that may benefit from receiving a cetuximab/trastuzumab combination.

Introduction

Three recent studies aimed at delineating new mechanisms of therapeutic resistance to the anti-*HER1* (EGFR) antibody cetuximab (Ctx; Erbitux[®]) have concurrently identified aberrant *HER2* (*ERBB2*) signaling as a novel mechanism for mediating Ctx

resistance in carcinomas with wild-type *KRAS*. Yonesaka *et al* (1) showed that activation of *HER2* signaling in cultured cancer cells, through either *HER2* gene amplification or upregulation of the *HER2/HER3* ligand heregulin, is sufficient to cause Ctx resistance. Accordingly, colorectal cancer patients exhibiting either *de novo* or acquired resistance to Ctx-based therapeutic regimens were found to have *HER2* gene amplification or high levels of circulating heregulin. In their hands, *HER2* inhibition or disruption of *HER2/HER3* heterodimerization restored the antitumor activity of Ctx *in vitro* and *in vivo*. The suggestion of Yonesaka that a combination of *HER2* inhibitor and Ctx treatment may represent a rational therapeutic strategy that should be assessed in colon cancer patients with Ctx-resistant carcinomas was also confirmed in a novel *in vivo* model of bladder carcinoma with acquired resistance to Ctx.

Quesnelle and Grandis (2) showed that increased phosphorylation of a C-terminal fragment of *HER2* mediates Ctx resistance both *in vitro* and *in vivo* because afatinib (BIBW-2992), an irreversible dual *HER1/HER2* tyrosine kinase inhibitor (TKI), successfully inhibits the growth of Ctx-resistant carcinoma cells. Upon production of large xenograft cohorts from 85 patient-derived, genetically characterized metastatic colorectal cancer samples ('xenopatiens'), Bertotti *et al* (3) generated genotype-Ctx response correlations indicating that *HER2* gene amplification specifically occurs in a subset of Ctx-resistant, wild-type *KRAS/NRAS/BRAF/PIK3CA* cases. In agreement with Yonesaka *et al* (1), Bertotti *et al* (3) found a significant enrichment of *HER2* gene amplification in clinically Ctx-unresponsive wild-type *KRAS* patients. Importantly, combined inhibition of EGFR and *HER2* induced overt, long-lasting tumor regression in *HER2* gene-amplified xenopatiens. As discussed by Ciardiello and Normanno (4), the identification of *HER2* as a predictor of resistance to the EGFR-targeted antibody Ctx and of response to combination therapies against EGFR and *HER2* in wild-type *KRAS* tumor settings may represent a further step toward personalized medicine for patients with colorectal cancer.

Correspondence to: Dr Javier A. Menendez, Catalan Institute of Oncology, Girona (ICO-Girona), Dr. Josep Trueta University Hospital, Avenida de França s/n, E-17007 Girona, Catalonia, Spain
E-mail: jmenendez@iconcologia.net; jmenendez@idibgi.org

Key words: cetuximab, *KRAS*, EGFR, *HER2*, trastuzumab, lapatinib

We now reveal that the acquisition of secondary resistance to Ctx in squamous cell carcinoma (SCC) cells is accompanied also by transcriptional upregulation of HER2 expression in absence of *HER2* gene amplification, which is amenable to inhibition by HER2-targeted drugs. As the Ctx anti-tumoral activity was fully restored in the presence of the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab, our current findings suggest that we need to redefine the threshold values for HER2 positivity beyond the sole presence of *HER2* gene amplification to improving the accuracy of the selection of Ctx-refractory patients with wild-type *KRAS* that might benefit from receiving a Ctx/trastuzumab combination.

Materials and methods

Drugs. Dual HER1/HER2-TKI1 lapatinib (GW572016; Tykerb[®]) was kindly provided by GlaxoSmithKline (GSK), Corporate Environment, Health & Safety (Brentford, Middlesex, UK). Stock solution of lapatinib (10 mmol/l) were prepared in DMSO and stored in aliquots in the dark at -20°C until utilization. Cetuximab (Erbixub) and trastuzumab (Herceptin[®]) were kindly provided by Hospital Universitari de Girona Dr Josep Trueta Pharmacy (Girona, Spain). Cetuximab was solubilized with 10 mmol/l NaCl of potassium phosphate buffer (PBS) pH 7.2 in bacteriostatic water for injection purposes (stock solution at 2 mg/ml), stored at 4°C and used within 1 month. Trastuzumab was solubilized in bacteriostatic water for injection containing 1.1% benzyl alcohol (stock solution at 21 mg/ml), stored at 4°C and used within 1 month. For experimental use, experimental agents were prepared fresh from stock solutions and were diluted with cell growth media immediately before use.

Cell viability. Concentration-effect curves were generated as a plot of the fraction of surviving cells versus drug concentration by using a colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay as previously described (11).

Real-time quantitative PCR (Taqman) analysis. RNA was isolated using the Qiagen RNeasy Mini kit and the expression of HER1 (EGFR), HER2 and HER3 genes was quantified by real-time quantitative PCR or Taqman using 100 ng of total RNA per reaction, as described previously (10,20,21). The sequences of the primer/probe sets used for this analysis are: EGFR (HER1) 5'-GCCTTGAGTCATCTATTCAAGCAC-3' (F), 5'-TGCTACTGTTCATTCGCACCTG-3' (R), and 5'-FAM-AGCTCTG GCCACAACAGGGCATTTC-TAMRA-p-3' (P); HER2 5'-TCTGGACGTGCCAGTGTGAA-3' (F), 5'-TGCTCCCTGAGGACATCA-3' (R), and 5'-FAM-CAGAAGGCCAA GTCCGCAGAACCC-TAMRA-p-3' (P); HER3 5'-TTCTCTACTCTACCATTGCCCAAC-3' (F), where F and R are the forward and reverse primers, respectively, and P is the Taqman probe (FAM as reporter and TAMRA as quencher). Taqman reaction was done in a standard 96-well plate format with ABI 7500 real-time quantitative PCR system. For data analysis, raw ΔC_t was first normalized to a housekeeping gene (i.e., TBT: TATA-Box Binding Protein) for each sample to get ΔC_t . The normalized ΔC_t was then calibrated to control (untreated) samples to get $\Delta\Delta C_t$. In the final step of data analysis, the $\Delta\Delta C_t$

were converted to fold-changes ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) relative to untreated controls.

HER2-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Determination of HER2 protein content was performed with a commercially available quantitative ELISA (Oncogene Science, Bayer Diagnostics) according to the manufacturer's protocol. The concentrations of HER2 in test samples (in nanograms of HER2 per milligram of total protein) were determined by interpolation of the sample absorbances from the standard curve. Each experiment was performed in duplicate wells.

Establishment of long-term accommodation to Ctx in EGFR gene-amplified, wild-type KRAS A431 SCC cells. Over a minimum period of 6 months, cultures of A431 vulvar squamous carcinoma cells (originally obtained from the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were continuously exposed to increasing concentrations of Ctx. A431 epidermoid carcinoma cells were chosen based on two primary criteria: (1) these EGFR-overexpressing cells are exquisitely sensitive to Ctx; and (2) A431 cells have neither EGFR Tyrosine Kinase Domain or *KRAS* mutations. Commencing with the Inhibitory Concentration 50 (IC₅₀) of Ctx (~25 µg/ml), the exposure dose was progressively increased 2-3 weeks until four dose doubling had been successfully achieved. Controlled parental cells were cultured in parallel and exposed to the PBS vehicle. We established two Long Term (LT)-Ctx adapted A431 pooled populations that were then maintained in continuous culture with the maximal achieved dose of Ctx. When challenged to Ctx doses as high as 200 µg/ml, they retained a >90% active metabolic status (as assessed by MTT-based cell viability assays) compared to Ctx-naïve A431 parental cells (which decreased their ability to metabolize MTT by ~70-80% following treatment with an equivalent dose of Ctx).

Parental A431 cells and LT-Ctx adapted pools were routinely grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco[®] Cell Culture Systems, Invitrogen S.A., Barcelona, Spain) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Bio-Whittaker, Inc., Walkersville, MD, USA), 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate, 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin (culture media for LT-Ctx adapted pools included 100 µg/ml Ctx, which was freshly added during culture splitting). Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO₂. Cells were screened periodically for Mycoplasma contamination.

Statistics. Two-group comparisons were performed by the Student t test for paired and unpaired values. Comparisons of means of ≥3 groups were performed by ANOVA, and the existence of individual differences, in case of significant F values at ANOVA, tested by Scheffé's multiple comparisons. In all the cases statistical analyses were carried out with XLSTAT (Addinsoft[™]) and P<0.01 was considered to be significant.

Results

HER2 overexpression is sufficient to impede cetuximab functioning in EGFR-overexpressing cancer cells. To definitely test the hypothesis that HER2 upregulation is sufficient to cause Ctx resistance, we used MCF10A cells, a useful *in vitro*

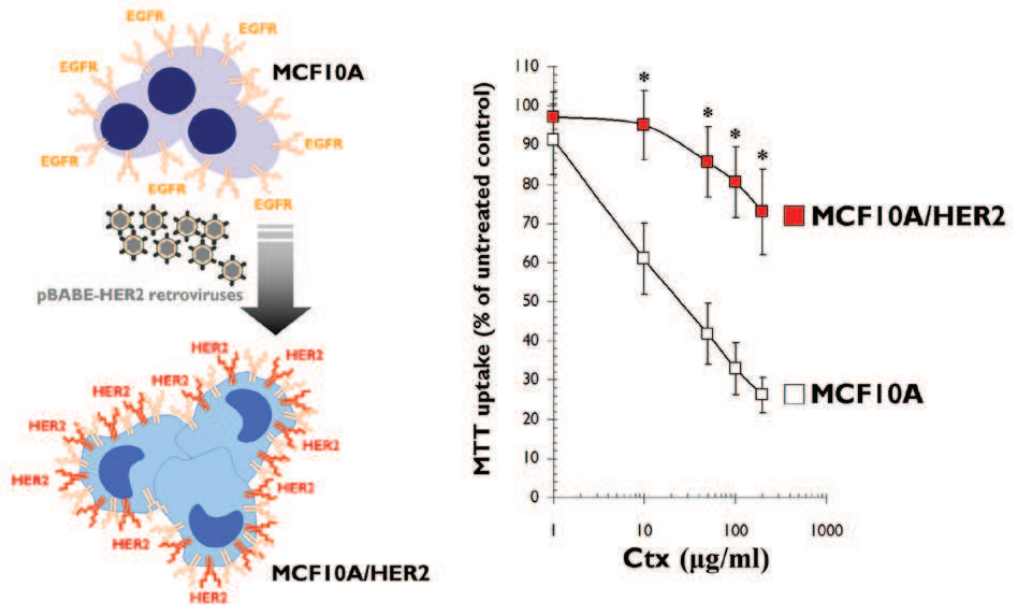


Figure 1. The sole overexpression of HER2 is sufficient to impede the Ctx function against EGFR-dependent cancer cells. MCF10A parental cells and their derivatives stably transduced with a pBABE-HER2 retroviral vector were cultured in the absence or presence of graded concentrations of Ctx for 5 days. Cell viability was measured with the MTT uptake assay and expressed as % of untreated cell population (=100%). Results are means and 95% confidence intervals (bars) of five independent experiments made in triplicate. Statistically significant differences (one-factor ANOVA analysis) between MTT uptakes in MCF10A and MCF10A/HER2 cells are shown (* $P < 0.01$). Statistical tests were two-sided.

system for analyzing the effects of the expression of specific cancer- and chemoresistance-related genes (e.g., HER2) in a non-transformed, near diploid, spontaneously immortalized genetic background (5-7). In addition to naturally expressing very low levels of HER2, MCF10A cells constitutively express high levels of EGFR and are dependent on EGF for optimal growth. Hence, overexpression of HER2 in these cells recapitulates the common clinical situation of HER1 and HER2 co-overexpression, and with the addition of EGF, the paracrine/autocrine stimulation of HER receptors-driven oncogenic signaling is also recapitulated. MCF10A cells acquire both an *in vitro* transformed and an *in vivo* tumorigenic phenotype following transfection with appropriate vectors containing the *HER2* gene (5-8).

We employed MCF10A cells that were engineered to overexpress the wild-type form of human HER2 by retroviral infection, thus avoiding undesirable clone-related effects (Fig. 1, left). When HER2-specific ELISA assays were used to quantitatively measure the change in the concentration of the HER2 protein following retroviral infection and stable selection, empty vector-transduced MCF10A/pBABE cells and MCF10A/HER2 cells were found to express 60 ng of HER2 mg protein⁻¹ and 2,200 ng of HER2 mg⁻¹ protein, respectively (8). Of note, the retrovirally driven upregulation of HER2 in MCF10A/HER2 cells can be considered to constitute *bona fide* HER2 overexpression because the HER2 protein levels are comparable to or greater than those found in cancer cell lines that naturally exhibit *HER2* gene amplification and HER2 protein overexpression [e.g., >900 HER2 ng/mg protein in SKBR3 and BT-474 breast carcinoma cell lines (9)]. More importantly for this study, the half-maximal

inhibitory concentration (IC₅₀) of Ctx was as low as 25 μg/ml in the parental MCF10A cells (Fig. 1C, right). However, in equivalent dose-response, MTT-based cell viability analyses of Ctx-treated MCF10A/HER2 cells, the IC₅₀ value for viability was not reached, even at doses as high as 200 μg/ml (Fig. 1, right).

Acquired (secondary) resistance to Ctx is accompanied by transcriptional upregulation of HER2 overexpression in squamous cell carcinoma cells. Since predictors of efficacy in non-small cell lung carcinomas, in which *KRAS* mutations do not predict Ctx efficacy, and in head and neck squamous cell carcinomas with intact *KRAS* signaling are also lacking, we propose that our recently established pre-clinical models of EGFR gene-amplified wild-type *KRAS* A431 squamous cell carcinoma, in which cells are chronically adapted to grow in the presence of Ctx (10-12), could be used to determine if the HER2 expression status is significantly altered during and/or after treatment with Ctx. We first performed real-time (kinetic) RT-PCR analyses to quantitatively track the transcriptional evolution of the entire family of HER receptors [i.e., EGFR (HER1), HER2, HER3, and HER4] during Ctx-induced deactivation of the EGFR/RAS/MAPK pathway. Analyzing the changes in the gene expression profiles of the HER1-/2-/3-/4 receptors during acute (i.e., 6 h) treatment with Ctx revealed that Ctx treatment significantly increased HER2 mRNA expression by ~3-fold (Fig. 2A, left). An equivalent upregulation of HER3 mRNA (3-fold) was observed in response to acutely added Ctx. The expression status of EGFR (HER1) at the mRNA level remained unaltered following Ctx exposure. HER4 expression was not detectable

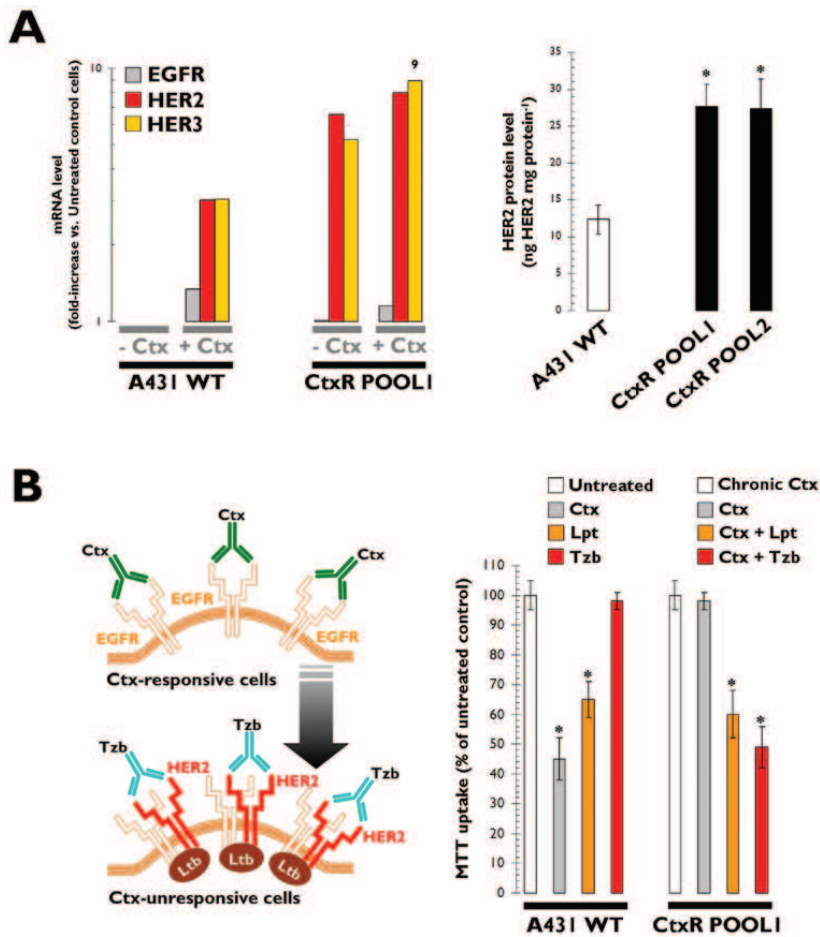


Figure 2. (A) HER2 expression is transcriptionally upregulated in SCC cells with acquired resistance to Ctx. Image shows the mean fold changes (columns) in expression of the target genes relative to internal control gene 6 h after treatment with 100 $\mu\text{g/ml}$ Ctx calculated by using the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method as described in Materials and methods. (B) Acquired resistance to Ctx in SCC cells is reversed by the mono-HER2 inhibitor trastuzumab. Ctx-responsive A431 parental cells and their derivatives with acquired resistance to Ctx were cultured for 5 days in the absence or presence of Ctx (100 $\mu\text{g/ml}$), lapatinib (Lpt; 1 $\mu\text{mol/l}$) and/or trastuzumab (Tzb; 100 $\mu\text{g/ml}$), as specified. Cell viability was measured with the MTT uptake assay and expressed as % of untreated cell population (=100%). Results are means (columns) and 95% confidence intervals (bars) of five independent experiments made in triplicate. Statistically significant differences (one-factor ANOVA analysis) between MTT uptakes in treated and untreated control cells are shown ($P < 0.01$). Statistical tests were two-sided.

by RT-PCR in A431 cells (data not shown). Using pre-clinical models of acquired Ctx resistance, which were developed in our laboratory by chronically adapting A431 cells to grow in the continuous presence of Ctx for a minimum of 6 months (10-12), we observed that mRNA levels of HER2 and HER3 were drastically upregulated by ~7- and 8-fold, respectively, in one of the Ctx-unresponsive pooled A431 cell populations (Fig. 2A, left). Upregulations in the HER2 and HER3 mRNA levels of >4-fold were detected in a second pooled population of Ctx-resistant A431 cells (data not shown). Notably, this upregulation in the HER2 and HER3 mRNA levels remained unaltered in response to Ctx challenge (Fig. 2A, left).

Co-exposure to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab reverses acquired resistance to Ctx in squamous cell carcinoma cells. ELISA-based determination of HER2

expression confirmed that the HER2 protein is significantly upregulated in A431 cells once resistance to Ctx is acquired (Fig. 2A, right). However, ELISA experiments showed that the changes in expression of the HER2 protein do not match the more prominent upregulation of HER2 at the mRNA level. Although the ultimate molecular mechanism underlying this lack of correlation between the increase in HER2 mRNA levels (up to 7-fold) and the smaller increase in HER2 protein expression (~2-fold) is unclear, we evaluated the functional activity of the transcriptionally upregulated HER2 protein and its causal relationship with the acquisition of resistance to Ctx (Fig. 2B, left). When we added the dual HER1/HER2 TKI lapatinib (Tykerb) to the culture medium of Ctx-resistant A431 cells already containing cetuximab (to simulate the treatment progression used in the clinic), we observed that Ctx-resistant A431 squamous cancer cells not only retained

lapatinib sensitivity but were slightly more sensitive than Ctx-naïve A431 parental cells to the growth-inhibitory effects of lapatinib (Fig. 2B, right). This suggests an increase in HER2 signaling in Ctx-resistant cells, which was confirmed using the mono-HER2 inhibitor trastuzumab (Herceptin). While HER1 (EGFR)-dependent A431 parental cells were also refractory to trastuzumab-induced blockade of HER2, a reduction of ~50% in MTT dye uptake, which correlates with cell viability, was observed in trastuzumab-treated Ctx-resistant A431 cells (Fig. 2B, right). We believe that these qualitative and quantitative differences in the antitumor efficacy of trastuzumab are a direct consequence of the pro-survival function driven by the transcriptional upregulation of HER2 in EGFR-positive A431 cells that have acquired resistance to Ctx.

Discussion

Our current findings reveal that EGFR-positive, *KRAS* wild-type cancer cells with acquired resistance to Ctx can become addicted to HER2-driven signaling and can therefore benefit from subsequent treatment with the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab, providing a rationale for the use of HER2-targeted therapies in the presence of Ctx resistance. This phenomenon should be taken into account during the design of studies addressing the role of HER2 in inherent (primary) and acquired (secondary) Ctx resistance and for developing strategies for testing Ctx in combination with HER2 inhibitors such as trastuzumab in the absence of *HER2* amplification. The benefits of adjuvant trastuzumab may not be limited to patients with *HER2* gene amplification (13,14), and trastuzumab efficiently triggers receptor-enhanced chemosensitivity (REC) when combined with chemotherapy in cell lines with low-to-intermediate HER2 expression, i.e., without HER2 overexpression (15,16). Moreover, trastuzumab may work by targeting cells with tumor-propagating properties; such cells, notably, are enriched in Ctx-resistant pooled populations of A431 cells (11), which have increased levels of HER2 protein compared with the bulk cell population, in which *HER2* gene amplification is unmodified (17-19). Although this is an *in vitro* study, if our current data were to be validated with clinical samples, the threshold values for HER2 positivity may need to be redefined for Ctx-refractory patients with wild-type *KRAS* that might benefit from receiving a Ctx/trastuzumab combination. Theoretically, the guidelines regarding trastuzumab administration would then need to include more Ctx-refractory cases than those selected based solely on the presence of *HER2* gene amplification.

Acknowledgements

The work in the laboratory of Javier A. Menendez was supported by the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Spain, Grants CP05-00090 and PI06-0778 and RD06-0020-0028), the Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC, Spain), and by the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-11579, Plan Nacional de I+D+I, MICINN, Spain). Alejandro Vazquez-Martin is the recipient of a Sara Borrell post-doctoral contract (CD08/00283, Ministerio de Sanidad y Consumo, Fondo de Investigación

Sanitaria -FIS-, Spain). Sílvia Cufí is the recipient of a Research Fellowship (Formación de Personal Investigador, FPI) from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Spain). Cristina Oliveras-Ferreras received a research salary from a Grant Award by the 'Fundación Salud 2000', which is promoted by Merck Serono (Madrid, Spain).

References

1. Yonesaka K, Zejnullahu K, Okamoto I, Satoh T, Cappuzzo F, Souglakos J, Ercan D, Rogers A, Roncalli M, Takeda M, *et al*: Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci Transl Med* 3: 99ra86, 2011.
2. Quesnelle KM and Grandis JR: Dual kinase inhibition of EGFR and HER2 overcomes resistance to cetuximab in a novel *in vivo* model of acquired cetuximab resistance. *Clin Cancer Res* 17: 5935-5944, 2011.
3. Bertotti A, Migliardi G, Galimi F, Sassi F, Torti D, Isella C, Corà D, Di Nicolantonio F, Buscarino M, Petti C, *et al*: A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ('xenopatients') was exploited for identifying novel mechanisms of resistance to cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer Discov* 1: 508-523, 2011.
4. Ciardiello F and Normanno N: HER2 signaling and resistance to the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab: a further step toward personalized medicine for patients with colorectal cancer. *Cancer Discov* 1: 472-474, 2011.
5. Ciardiello F, Gottardis M, Basolo F, Pepe S, Normanno N, Dickson RB, Bianco AR and Salomon DS: Additive effects of c-erbB-2, c-Ha-ras, and transforming growth factor- α genes on *in vitro* transformation of human mammary epithelial cells. *Mol Carcinog* 6: 43-52, 1992.
6. Giunciuglio D, Culty M, Fassina G, Masiello L, Melchiorri A, Pagliarlunga G, Arand G, Ciardiello F, Basolo F and Thompson EW: Invasive phenotype of MCF10A cells overexpressing c-Ha-ras and c-erbB-2 oncogenes. *Int J Cancer* 63: 815-822, 1995.
7. Ciardiello F, Caputo R, Pomatico G, De Laurentiis M, De Placido S, Bianco AR and Tortora G: Resistance to taxanes is induced by c-erbB-2 overexpression in human MCF-10A mammary epithelial cells and is blocked by combined treatment with an antisense oligonucleotide targeting type I protein kinase A. *Int J Cancer* 85: 710-715, 2000.
8. Menendez JA, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreras C, Garcia-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Fernandez-Gutierrez A and Segura-Carretero A: Extra-virgin olive oil polyphenols inhibit HER2 (erbB-2)-induced malignant transformation in human breast epithelial cells: relationship between the chemical structures of extra-virgin olive oil secoiridoids and lignans and their inhibitory activities on the tyrosine kinase activity of HER2. *Int J Oncol* 34: 43-51, 2009.
9. Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, Finn R, Yang G, Rahmeh M, Untch M, Rusnak DW, Spehar G, Mullin RJ, *et al*: Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res* 66: 1630-1639, 2006.
10. Oliveras-Ferreras C, Vall-Llovera AM, Salip DC, Vazquez-Martin A, Cufí S, Queralt B, Martin-Castillo B, Brunet J, de Llorens R and Menendez JA: Evolution of the predictive markers amphiregulin and epi-regulin mRNAs during long-term cetuximab treatment of KRAS wild-type tumor cells. *Invest New Drugs* 30: 846-852, 2012.
11. Oliveras-Ferreras C, Vazquez-Martin A, Cufí S, Queralt B, Báez L, Guardado R, Hernández-Yagüe X, Martin-Castillo B, Brunet J and Menendez JA: Stem cell property epithelial-to-mesenchymal transition is a core transcriptional network for predicting cetuximab (ErbixTM) efficacy in KRAS wild-type tumor cells. *J Cell Biochem* 112: 10-29, 2011.
12. Oliveras-Ferreras C, Vazquez-Martin A, Queralt B, Agradas M, Ortiz R, Cufí S, Hernández-Yagüe X, Guardado R, Báez L, Martin-Castillo B, *et al*: Interferon/STAT1 and neuregulin signaling pathways are exploratory biomarkers of cetuximab (ErbixTM) efficacy in KRAS wild-type squamous carcinomas: a pathway-based analysis of whole human-genome microarray data from cetuximab-adapted tumor cell-line models. *Int J Oncol* 39: 1455-1479, 2011.

13. Paik S, Kim C and Wolmark N: HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *N Engl J Med* 358: 1409-1411, 2008.
14. Perez EA, Reinholz MM, Hillman DW, Tenner KS, Schroeder MJ, Davidson NE, Martino S, Sledge GW, Harris LN, Galow JR, *et al*: HER2 and chromosome 17 effect on patient outcome in the N9831 adjuvant trastuzumab trial. *J Clin Oncol* 28: 4307-4315, 2010.
15. Arteaga CL: Can trastuzumab be effective against tumors with low HER2/Neu (ErbB2) receptors? *J Clin Oncol* 24: 3722-3725, 2006.
16. Menendez JA, Mehmi I and Lupu R: Trastuzumab in combination with heregulin-activated Her-2 (erbB-2) triggers a receptor-enhanced chemosensitivity effect in the absence of Her-2 overexpression. *J Clin Oncol* 24: 3735-3746, 2006.
17. Korkaya H and Wicha MS: HER-2, notch, and breast cancer stem cells: Targeting an axis of evil. *Clin Cancer Res* 15: 1845-1847, 2009.
18. Magnifico A, Albano L, Campaner S, Delia D, Castiglioni F, Gasparini P, Sozzi G, Fontanella E, Menard S and Tagliabue E: Tumor-initiating cells of HER2-positive carcinoma cell lines express the highest oncoprotein levels and are sensitive to trastuzumab. *Clin Cancer Res* 15: 2010-2021, 2009.
19. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Del Barco S, Martin-Castillo B and Menendez JA: The anti-diabetic drug metformin suppresses self-renewal and proliferation of trastuzumab-resistant tumor-initiating breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res Treat* 126: 355-364, 2011.
20. Ferrer-Soler L, Vazquez-Martin A, Brunet J, Menendez JA, De Llorens R and Colomer R: An update of the mechanisms of resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in breast cancer: Gefitinib (Iressa)-induced changes in the expression and nucleocytoplasmic trafficking of HER-ligands (Review). *Int J Mol Med* 20: 3-10, 2007.
21. Ritter CA, Perez-Torres M, Rinehart C, Guix M, Dugger T, Engelman JA and Arteaga CL: Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin Cancer Res* 13: 4909-4919, 2007.

Oliveras-Ferraros C, Massaguer Vall-Llovera A, Carrion-Salip D, Vazquez-Martin A, Cufí S, Queralt B, Martin-Castillo B, Brunet J, de Llorens R, Menendez JA. "Evolution of the predictive markers amphiregulin and epiregulin mRNAs during long-term cetuximab treatment of KRAS wildtype tumor cells". *Investional New Drugs*. Vol. 30, issue 2 (2012) : 846-852

<http://dx.doi.org/10.1007/s10637-010-9612-2>

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10637-010-9612-2>

Received: 20 September 2010

Accepted: 30 November 2010

Published online: 16 December 2010

© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract

Molecular mechanisms other than activating KRAS mutations should underlie the occurrence of weaker versus stronger responses to cetuximab (CTX) in EGFR-dependent carcinomas with either an intact KRAS signaling or in which KRAS mutations do not predict CTX efficacy. We hypothesized that KRAS wild-type (WT) tumor cell-line models chronically adapted to grow in the presence of CTX could be interrogated to establish if the positive predictive value of the mRNAs coding for the EGFR ligands amphiregulin (AR) and epiregulin (EPI) could be significantly altered during and/or after treatment with CTX. Gene expression analyses using real-time (kinetic) RT-PCR were performed to monitor the transcriptional evolution of EGFR ligands EGF, TGF α , AR, BTC, EPI, NRG and HB-EGF in experimental modes induced to exhibit acquired resistance to the mono-HER1 inhibitor CTX, the mono-HER2 inhibitor trastuzumab (Tzb) or the dual HER1/HER2 inhibitor lapatinib (LPT). Gene expression signatures for EGFR ligands distinctively related to the occurrence of unresponsiveness to CTX, Tzb or LPT, with minimal overlap between them. CTX's molecular functioning largely depended on the overproduction of the mRNAs coding for the EGFR ligands AR and EPI. Thus, a dramatic down-regulation of AR/EPI mRNA expression occurred upon loss of CTX efficacy in EGFR-positive tumor cells with an intact regulation of RAS signaling. Unlike KRAS mutations, which are informative of unresponsiveness to CTX solely in mCRC, our hypothesis-generating data suggest that expression status of AR and EPI mRNAs might be evaluated as dynamic predictors of response in KRAS WT patients receiving any CTX-based therapy.

Grau-Campistany A, Massaguer A, Carrion-Salip D, Barragán F, Artigas G, López-Senín P, Moreno V, Marchán V. "Conjugation of a Ru(II) Arene Complex to Neomycin or to Guanidinoneomycin Leads to Compounds with Differential Cytotoxicities and Accumulation between Cancer and Normal Cells". *Molecular Pharmaceutics*. Vol. 10, issue 5 (2013) : 1964-1976

<http://dx.doi.org/10.1021/mp300723b>

Copyright © 2013 American Chemical Society

Conjugation of a Ru(II) Arene Complex to Neomycin or to Guanidinoneomycin Leads to Compounds with Differential Cytotoxicities and Accumulation between Cancer and Normal Cells

Ariadna Grau-Campistany,[†] Anna Massaguer,[‡] Dolores Carrion-Salip,[‡] Flavia Barragán,^{†,§} Gerard Artigas,[†] Paula López-Senín,[†] Virtudes Moreno,[§] and Vicente Marchán^{*,†}

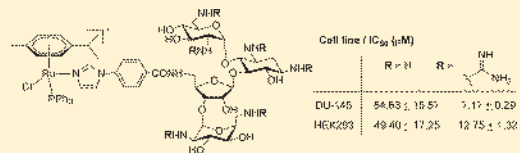
[†]Departament de Química Orgànica and IBUB, Universitat de Barcelona, Barcelona, E-08028, Spain

[‡]Departament de Biologia, Universitat de Girona, Girona, E-17071, Spain

[§]Departament de Química Inorgànica, Universitat de Barcelona, Barcelona, E-08028, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: A straightforward methodology for the synthesis of conjugates between a cytotoxic organometallic ruthenium(II) complex and amino- and guanidinoglycosides, as potential RNA-targeted anticancer compounds, is described. Under microwave irradiation, the imidazole ligand incorporated on the aminoglycoside moiety (neamine or neomycin) was found to replace one triphenylphosphine ligand from the ruthenium precursor $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2]^+$, allowing the assembly of the target conjugates. The guanidinylated analogue was easily prepared from the neomycin–ruthenium conjugate by reaction with N,N' -di-Boc- N'' -triflylguanidine, a powerful guanidinylation reagent that was compatible with the integrity of the metal complex. All conjugates were purified by semipreparative high-performance liquid chromatography (HPLC) and characterized by electrospray ionization (ESI) and matrix-assisted laser desorption–ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) and NMR spectroscopy. The cytotoxicity of the compounds was tested in MCF-7 (breast) and DU-145 (prostate) human cancer cells, as well as in the normal HEK293 (Human Embryonic Kidney) cell line, revealing a dependence on the nature of the glycoside moiety and the type of cell (cancer or healthy). Indeed, the neomycin–ruthenium conjugate (**2**) displayed moderate antiproliferative activity in both cancer cell lines ($\text{IC}_{50} \approx 80 \mu\text{M}$), whereas the neamine conjugate (**4**) was inactive ($\text{IC}_{50} \approx 200 \mu\text{M}$). However, the guanidinylated analogue of the neomycin–ruthenium conjugate (**3**) required much lower concentrations than the parent conjugate for equal effect ($\text{IC}_{50} = 7.17 \mu\text{M}$ in DU-145 and $\text{IC}_{50} = 11.33 \mu\text{M}$ in MCF-7). Although the same ranking in antiproliferative activity was found in the nontumorigenic cell line ($3 \gg 2 > 4$), IC_{50} values indicate that aminoglycoside-containing conjugates are about 2-fold more cytotoxic in normal cells (e.g., $\text{IC}_{50} = 49.4 \mu\text{M}$ for **2**) than in cancer cells, whereas an opposite tendency was found with the guanidinylated conjugate, since its cytotoxicity in the normal cell line ($\text{IC}_{50} = 12.75 \mu\text{M}$ for **3**) was similar or even lower than that found in MCF-7 and DU-145 cancer cell lines, respectively. Cell uptake studies performed by ICP-MS with conjugates **2** and **3** revealed that guanidinylation of the neomycin moiety had a positive effect on accumulation (about 3-fold higher in DU-145 and 4-fold higher in HEK293), which correlates well with the higher antiproliferative activity of **3**. Interestingly, despite the slightly higher accumulation in the normal cell than in the cancer cell line (about 1.4-fold), guanidinoneomycin–ruthenium conjugate (**3**) was more cytotoxic to cancer cells (about 1.8-fold), whereas the opposite tendency applied for neomycin–ruthenium conjugate (**2**). Such differences in cytotoxic activity and cellular accumulation between cancer and normal cells open the way to the creation of more selective, less toxic anticancer metallodrugs by conjugating cytotoxic metal-based complexes such as ruthenium(II) arene derivatives to guanidinoglycosides.



Cell line / IC_{50} (μM)	R = H	R = NH
DU-145	54.63 ± 15.55	7.17 ± 0.29
HEK293	49.40 ± 17.25	12.75 ± 1.30

KEYWORDS: ruthenium, cytotoxicity, cellular accumulation, RNA ligands, neomycin, guanidinoneomycin

INTRODUCTION

Organometallic complexes have emerged in recent years as promising anticancer metallodrugs, which could well overcome cisplatin and platinum-related analogues' disadvantages, mainly toxicity and drug resistance in cancer cells.^{1–5} Among them, ruthenium(II) complexes bearing a π -bonded arene ligand are particularly interesting since they have shown promising anticancer activities,^{6–8} even in cells that had become resistant to cisplatin, such as Sadler's compounds containing N,N' -

chelating ligands.^{1,9,10} In addition, some of the Dyson's RAPTA compounds containing pta ligand have shown antimetastatic activity.^{11,12} Their so-called “piano-stool” geometry includes an arene unit that stabilizes the ruthenium +2 oxidation state and

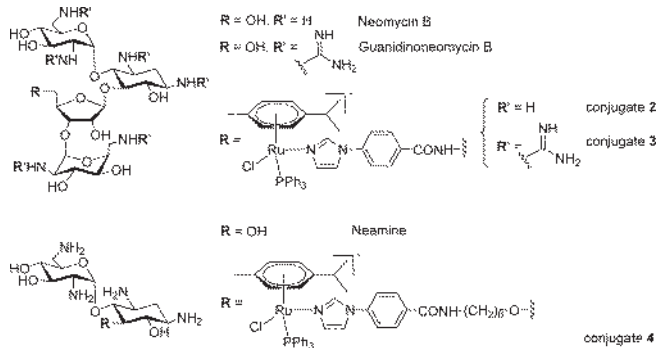
Received: December 21, 2012

Revised: March 11, 2013

Accepted: March 19, 2013

Published: March 19, 2013

Scheme 1. Structure of the Amino(guanidino)glycosides and Their Ruthenated Conjugates



confers hydrophobicity on the global metal complex, as well as mono- or bidentate ligands, including one or two leaving groups. In most cases, the release of labile chlorido ligands is triggered inside the cell nucleus by the low chloride concentration (4 mM vs ~100 mM in extracellular fluids), allowing for the generation of the activated aqua species that possess the capacity to react with the biological target.^{13,14}

Ruthenium offers several advantages over platinum compounds, including reduced toxicity and the possibility of controlling the shape and the chemical and pharmacological properties of the complex by the adequate selection of the arene and the ligands at the “legs” of the “piano-stool” structure.^{15,16} Moreover, modification of the nonleaving ligands allows the metal complex to be anchored to a “tumor-targeting device” such as receptor-binding peptides, folic acid, or estrogens.^{17–24} This targeted strategy has a tremendous potential in the development of more efficient, less toxic, selective metallodrugs in chemotherapy because receptors for these carrier molecules are overexpressed in the membrane of tumoral cells.^{25–28}

Another strategy to improve efficiency of a metal-based drug is to increase its affinity with its ultimate biological target. This strategy has been explored mainly with platinum complexes through the covalent attachment to compounds with high affinity for DNA (minor groove binders or intercalators) or to synthetic oligonucleotides or peptide nucleic acids complementary to specific DNA sequences.²⁹ The cytotoxicity of ruthenium(II) arene complexes, like that of platinum compounds, has been attributed mainly to the binding of their aquation products to DNA.^{7,8} However, these complexes' interaction with other potential cellular competitors such as the tripeptide glutathione cannot be ruled out, since they are present in large intracellular concentrations and are responsible for the detoxification of heavier transition metals.³⁰ In fact, recent studies have revealed that DNA is not always the primary target for some ruthenium anticancer compounds and that they actually bind more strongly to proteins or enzymes than to DNA.^{4,31} Hence, it seems important not only to develop efficient targeting strategies to deliver metallodrugs selectively into cancer cells, but also to direct them toward a particular biological target.

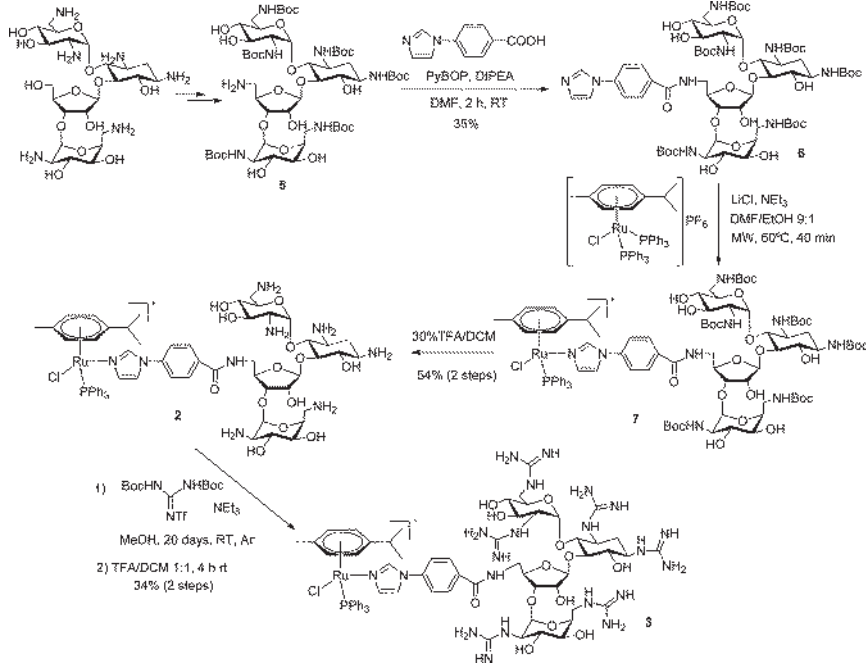
Although, traditionally, metal-based drugs have been designed to target DNA, in therapeutic terms, RNA offers several advantages over DNA as a drug target, since it is involved in many cellular processes, from the regulation of gene

expression to protein synthesis.^{32–35} In addition, like proteins, RNA adopts complex three-dimensional structures that can be exploited to design specific small molecules to modulate its functions.^{36–38} In recent years, microRNAs (miRNAs) have also emerged as new therapeutic targets for cancer therapy since the abnormal expression of these noncoding small RNAs is associated with the pathogenesis of human cancer.^{39,40} Like other RNAs, miRNA precursors adopt secondary structures that can be targeted with small molecules, to interfere with miRNA maturation and, for instance, to manipulate miRNA levels.^{41,42}

With the aim of developing new metal-based anticancer drugs that could act at the level of RNA, we focused on the conjugation of ruthenium(II) arene complexes with small molecules that had the capacity to recognize selectively RNA over DNA or proteins. Aminoglycoside antibiotics are possibly the most commonly studied RNA ligands,^{33,36,43,44} since they have a relatively high affinity with RNA structures and are able to discriminate A-type from B-type duplexes.^{43,44} Apart from their selectivity for RNA, aminoglycosides possess several amino functions that are mostly protonated under physiological conditions, which would confer some drug-like properties on the metal complex, such as aqueous solubility. However, aminoglycoside antibiotics are known to have a more inefficient uptake by eukaryotic than by prokaryotic cells.⁴⁵ This problem has been solved by replacing their amine functions with guanidinium groups to generate guanidinoglycosides,⁴⁶ since these derivatives have higher efficient uptake by eukaryotic cells than their aminoglycoside precursors.⁴⁵ In fact, guanidylated neomycin is known to transport bioactive, high molecular weight cargo into the interior of cells.^{47–49} Like naturally occurring aminoglycosides, guanidinoglycosides bind RNA over DNA preferentially, but they have shown higher binding affinity and selectivity against several RNA targets.^{46,50} This strategy was first explored by Tor and collaborators by conjugating a platinum(II) complex with neomycin B and guanidinoneomycin B.⁵¹ The fact that these compounds were able to selectively cross-link an RNA structure derived from HIV Rev Response Element demonstrated that therapeutically relevant RNA structures could be targeted with metal complexes by using the appropriate glycoside.

Herein, we describe for the first time the synthesis, characterization, cellular uptake and antiproliferative activity of conjugates between a ruthenium(II) arene complex, $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{RuCl}(\text{Im-BzCOOMe})(\text{PPh}_3)]^+$ (1),²⁴ where Im-

Scheme 2. Synthesis of the Ruthenium–Neomycin and Ruthenium–Guanidinoneomycin Conjugates



reader (ELX800, Biotek, Winooski, USA) at a wavelength of 570 nm. Three replicates were used in each experiment. For each treatment, cell viability was determined as a percentage of the control untreated cells, by dividing the mean absorbance of each treatment by the mean absorbance of the untreated cells. The concentration that reduces cell viability by 50% (IC_{50}) was established for each compound.

Ruthenium Accumulation in Cancer Cells. For ruthenium cell uptake studies, 1.5×10^6 DU-145 or HEK293 cells were plated in 100 mm Petri dishes and allowed to attach for 48 h. Next, the plates were exposed to compounds 1–3 at a concentration corresponding to a fifth of their IC_{50} (DU-145: 1.3 μM for 1, 17 μM for 2, and 1.4 μM for 3; HEK293: 0.5 μM for 1, 10 μM for 2, and 2.4 μM for 3). Additional plates were incubated with medium alone as negative control. After 24 h incubation, the cells were rinsed three times with cold PBS and harvested by trypsinization. The number of cells in each sample was counted manually in a hemocytometer using the Trypan Blue dye-exclusion test. Then the cells were centrifuged to obtain the whole cell pellet for ICP-MS analysis. All experiments were conducted in triplicate.

ICP-MS Analysis. The whole cell pellets were dissolved in 400 μL of concentrated 60% v/v nitric acid, and the samples were then transferred into Wheaton v-vials (Sigma-Aldrich) and heated in an oven at 373 K for 18 h. The vials were then allowed to cool, and each cell sample solution was transferred into a volumetric tube and combined with washings with Milli-Q water (1.6 mL). Digested samples were diluted 10 times with Milli-Q to obtain a final HNO_3 concentration of approximately 1.2% v/v. Ruthenium content was analyzed on an ICP-MS Perkin-Elmer Elan 6000 series machine at the Centres Científics i Tecnològics of the University of Barcelona. The

solvent used for all ICP-MS experiments was Milli-Q water with 1% HNO_3 . The ruthenium standard (High-Purity Standards, 1000 $\mu g/mL \pm 5 \mu g/mL$ in 2% HCl) was diluted with Milli-Q water to 100 ppb. Ruthenium standards were freshly prepared in Milli-Q water with 1% HNO_3 before each experiment. The concentrations used for the calibration curve were in all cases 0, 1, 2, 5, and 10 ppb. The isotope detected was ^{101}Ru , and readings were made in triplicate. Rhodium was added as an internal standard at a concentration of 10 ppb in all samples.

RESULTS

Synthesis and Characterization of Ruthenium-Amino-(Guanidino)Glycoside Conjugates. Conjugation of the ruthenium complex to neomycin B was planned through the 5'-OH, since this primary hydroxyl group can be regioselectively converted to amino group, allowing the attachment of the imidazole ligand via an amide bond formation. In addition, this modification does not alter the number of chargeable groups that are essential for RNA binding and cell uptake. First, 4-(1H-imidazol-1-yl)benzoic acid was coupled with the Boc-protected amino derivative of neomycin⁵² (5, Scheme 2) by using PyBOP as a coupling reagent in anhydrous DMF for 2 h at room temperature in the presence of DIPEA. The metal complex was assembled on the imidazole-derivatized neomycin (6) by reaction with $[(\eta^6-p-cym)RuCl(PPh_3)_2][PF_6]$ (1 mol equiv) in the presence of LiCl (1.2 mol equiv) and NEt_3 (10 mol equiv) in a DMF/EtOH 9:1 mixture for 40 min at 60 °C under microwave irradiation. Reversed-phase HPLC analysis of the deprotected crude (30% TFA in DCM, 25 min rt) showed the presence of a main peak, which was isolated and characterized by MS as the expected conjugate 2. Hence, as previously found with imidazole-

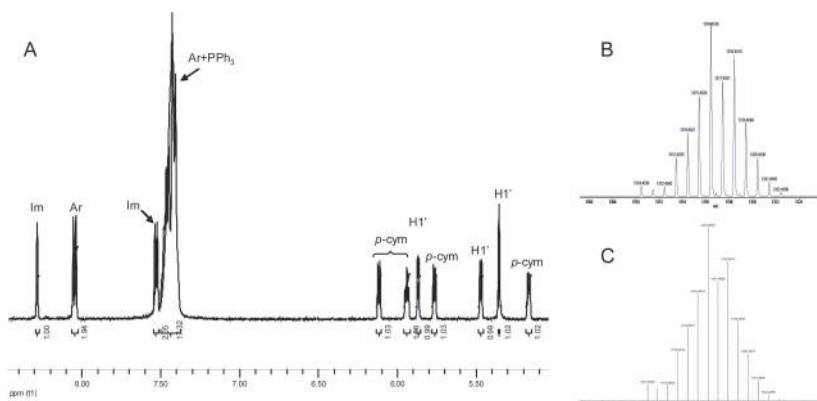
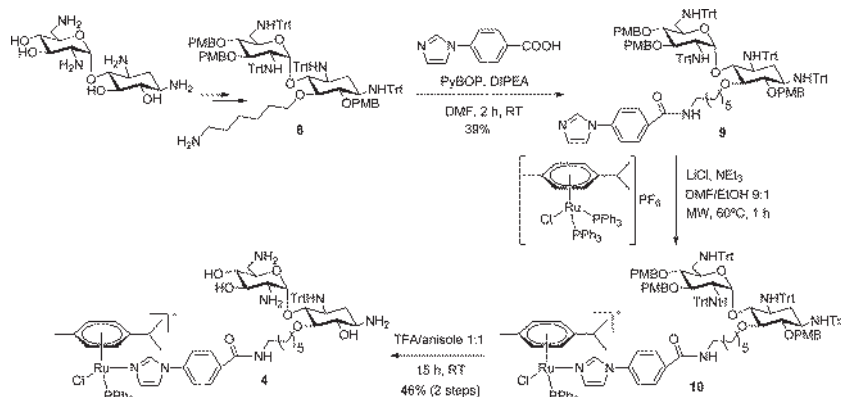


Figure 1. ^1H NMR spectra of conjugate **2** (A) in CD_3OD , showing the region between 4.5 and 8.5 ppm. Expanded ESI mass spectrum of the molecular peak of **2** ($[\text{M}]^+$), experimental (B) and calculated (C).

Scheme 3. Synthesis of the Ruthenium–Neamine Conjugate



derivatized peptide-bound resins,²⁴ the imidazole ligand incorporated in the aminoglycoside moiety is able to replace one of the two PPh_3 ligands in $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2]^+$. However, in this case it was necessary to use microwave irradiation to assemble the ruthenium complex, since no evidence of the formation of the Boc-protected intermediate **7** was obtained after prolonged heating (24 h) at 50°C . After purification by reversed-phase medium-pressure liquid chromatography, the trifluoroacetate salt of conjugate **2** was obtained as a yellow solid (overall yield from **6**: 54%) that was unambiguously characterized by mass spectrometry and NMR spectroscopy.

High-resolution ESI MS analysis of the neomycin-ruthenium conjugate **2** afforded an m/z value that was consistent with the calculated value of the monocharged species ($[\text{M}]^+$) and with the expected isotopic distribution of ruthenium (Figure 1). In addition, **2** was fully characterized by ^1H NMR spectroscopy by using 1D and 2D experiments (COSY and TOCSY). The region of the ^1H NMR spectra between 5.0 and 8.5 ppm is shown in Figure 1, where signals from the ruthenium complex (*p*-cymene, imidazole, and PPh_3 ligands) and from the aminoglycoside moiety (anomeric $\text{H}1'$ protons) are indicated.

Our next objective was the synthesis of the guanidinylated analogue of the neomycin-ruthenium conjugate (compound **3** in Scheme 1), which was planned by using N,N' -di-Boc- N'' -triflylguanidine, a powerful guanidinylation reagent usually employed in the preparation of guanidinoglycosides.⁵⁵ Conjugate **2** was dissolved in methanol and reacted with a large excess of N,N' -di-Boc- N'' -triflylguanidine (200 mol equiv) in the presence of triethylamine (1000 mol equiv) at RT under an Ar atmosphere (Scheme 2). The reaction was very slow, especially the incorporation of the sixth guanidinium group, as followed by ESI MS analysis. Once the reaction reached completion (about 20 days), the Boc-protected guanidino conjugate was treated with a TFA/DCM mixture (1:1) for 4 h at RT. Reversed-phase HPLC analysis revealed the presence of a main peak, which was isolated and characterized by high-resolution MS and NMR as the expected conjugate **3** (overall yield from **2**: 34%). It is interesting to note that the ruthenium complex remained unaltered during the prolonged reaction time, which accounts for its high stability in solution (see below).

One of the main problems of aminoglycoside antibiotics is their inherent toxicity, usually nephrotoxicity or ototoxicity, which are associated with nonspecific electrostatic binding to

Table 1. Sensitivity of Tumor MCF-7 and DU-145 Cells and of Nontumorigenic HEK293 Cells to Cisplatin, Compounds 1–4 and Control Amino(guanidino)glycosides^a

compound	IC ₅₀ (μM)/cell lines		
	MCF-7	DU-145	HEK293
cisplatin	3.04 ± 0.25	3.10 ± 0.00	4.63 ± 1.60
ruthenium complex 1	3.99 ± 1.45	6.48 ± 0.54	2.50 ± 0.71
Ru-neomycin conjugate 2	84.67 ± 5.13	84.63 ± 15.87	49.40 ± 17.25
Ru-neamine conjugate 4	200.75 ± 15.75	221.67 ± 3.33	125.00 ± 2.02
neomycin or neamine	>250	>250	>250
Ru-guanidinoneomycin conjugate 3	11.33 ± 2.56	7.17 ± 0.29	12.75 ± 1.32
guanidinoneomycin	>250	>250	>250

^aThe concentration of the compounds that inhibits cells viability by 50% (IC₅₀) after 72 h was determined by means of the MTT assay. Each value represents the mean of three independent experiments ± standard error.

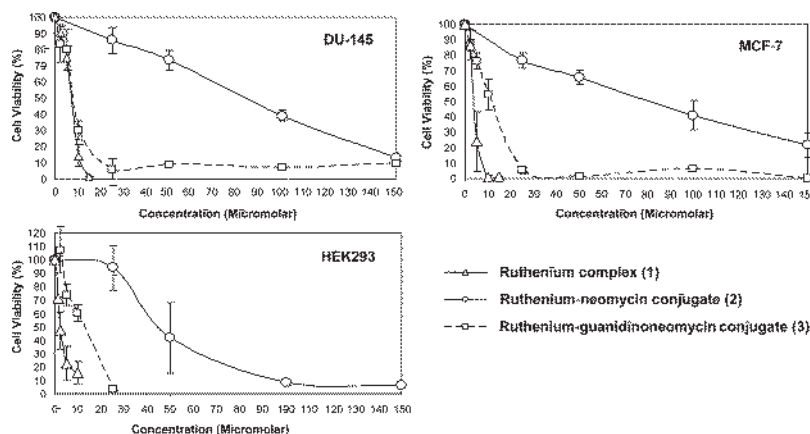


Figure 2. Cytotoxic effect of compounds 1–3 in the DU-145, MCF-7, and HEK293 cell lines. Cells were treated for 72 h with the indicated concentrations of each compound. Cell viability was determined by the MTT assay. Each point in the graphs represents the mean of three independent experiments ± SD.

RNA.^{43,44} To minimize these problems, we selected the pseudodisaccharide known as neamine (Scheme 1), because a reduction in the number of amino groups in the aminoglycoside scaffold usually gives less toxic compounds. This smaller aminoglycoside is still an attractive starting molecule, since it incorporates rings I and II of most naturally occurring aminoglycosides, such as neomycin B, which are important structural motifs in the recognition of RNA targets, including rRNA, RRE, and TAR RNA. Hence, our next objective was the synthesis of the neamine-ruthenium conjugate (4) by the optimized procedure used for the preparation of the neomycin analogue 2.

The attachment of the metal complex was planned through the 5-hydroxyl group of the 2-deoxystreptamine ring (Scheme 1), since the use of trityl protective groups for the amino functions allows the regioselective protection of all hydroxyl functions with 4-methoxybenzyl groups, except that located at the 5-position.⁵³ Again, the required imidazole-derivatized neamine (9) was obtained by reaction between 4-(1H-imidazol-1-yl)benzoic acid and the (Trt)₄(PMB)₃-protected amino derivative of neamine (8) by using PyBOP as a coupling reagent (Scheme 3). The metal complex was assembled on the imidazole ring by reacting 9 with [(η⁶-p-cym)RuCl(PPh₃)₂][PF₆]⁻ in the presence of LiCl and NEt₃ in a DMF/EtOH 9:1 mixture for 1 h at 60 °C under microwave irradiation. In this

case, deprotection was achieved by treatment of the crude with a 1:1 mixture of TFA/anisole under Ar for 15 h at RT. Purification by semipreparative HPLC afforded the TFA salt of conjugate 4 as a yellow solid (yield from 9: 46%), which was fully characterized by high-resolution ESI and MALDI-TOF MS and NMR.

Studies on the Activation of the Ruthenium Complex in Conjugates 2 and 3. Since the cytotoxic activity of most metallodrugs is intimately related to their hydrolysis behavior in aqueous media, prior to cytotoxicity studies we wanted to assess whether hydrolysis of the Ru–Cl bond occurs when the ruthenium complex is conjugated to the glycoside carrier. This process is known to facilitate the interaction of the metal with the biological target (e.g., nucleic acids or proteins) through the generation of monofunctional adducts on guanine nucleobases by the activated aqua species. Although anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes has been attributed in most cases to DNA ruthenation, some compounds such as 1 do not experience aqueous hydrolysis of the Ru–Cl bond,²⁴ which hinders the covalent interaction with the biological target.

On the basis of these precedents, the stability of conjugates 2 and 3 (Scheme 1) was investigated in aqueous solution at a chloride concentration mimicking the typical cell nucleus (4 mM). As previously found with 1 or its peptide conjugate,²⁴ reversed-phase HPLC analysis together with MS revealed that

no hydrolysis occurred in the case of the ruthenium-(guanidino)neomycin conjugates on incubation at 37 °C for 48 h. Surprisingly, the compounds also remained unaltered upon incubation at 37 °C for 72 h with a large excess of glutathione (250 mol equiv) under physiologically relevant conditions (pH 7 phosphate buffer containing 22 mM NaCl, the cytoplasmatic concentration of chloride).³⁰ These results suggest that the ruthenium moiety in the amino(guanidino)-glycoside conjugates (2–4) does not follow the typical activation mechanisms of most organometallic anticancer complexes (e.g., hydrolysis of the Ru–Cl bond and/or redox activation through the participation of the tripeptide glutathione).¹⁴ The presence of a bulky ligand such as triphenylphosphine might explain this behavior, which is different from other anticancer ruthenium(II) arene complexes such as $[(\eta^6\text{-biphenyl})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+ \cdot 1.14$.

Cytotoxicity in Cancer (MCF-7 and DU-145) and Normal (HEK293) Cell Lines. Our next objective was to evaluate the cytotoxicity of conjugates 2, 3, and 4 to determine their potential as anticancer agents. Their antiproliferative activity, together with that of cisplatin as positive control and the unconjugated compounds (complex 1, neomycin, neamine, and guanidinoneomycin), was first determined in two human tumor cell lines, the breast cancer cell line MCF-7 and the prostate carcinoma cell line DU-145, by using the MTT test that measures mitochondrial dehydrogenase activity as an indication of cell viability (Table 1). The compounds were screened at a wide range of concentrations (from 0 to 250 μM) to determine the concentration that inhibits cell growth by 50% (IC_{50}). The compounds that did not inhibit cell growth by more than 50% at 250 μM were considered to be inactive. Interestingly, conjugates 2–4 were completely soluble in water.

The concentration–response curves, plotted in Figure 2, revealed that the cytotoxic activity of conjugates 2–4 was very dependent on the nature of the glycoside moiety in these cell lines. As previously reported,²⁴ the effectivity of the complex $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{RuCl}(\text{Im-BzCOOMe})(\text{PPh}_3)]^+$ (1) was comparable to that of cisplatin and slightly higher in MCF-7 cells than in DU-145 cells, showing IC_{50} values of $3.99 \pm 1.45 \mu\text{M}$ and $6.48 \pm 0.54 \mu\text{M}$, respectively (Table 1). Neomycin–ruthenium conjugate 2 had moderate antiproliferative activity in both cell lines ($\text{IC}_{50} \approx 80$), but its guanidinyllated analogue (3) was highly cytotoxic ($\text{IC}_{50} = 11.33 \pm 2.56$ in MCF-7 cells and $\text{IC}_{50} = 7.17 \pm 0.29$ in DU-145 cells), with an IC_{50} value similar to that of complex 1 in the prostate cancer cell line. However, conjugation of the ruthenium complex to the small neamine aminoglycoside led to a strong decrease in cytotoxic activity ($\text{IC}_{50} \approx 200$). Interestingly, neither the aminoglycosides alone (neomycin or neamine) nor guanidinoneomycin were found to be cytotoxic ($\text{IC}_{50} > 250$).

Despite the promising anticancer activities of the ruthenium–glycoside conjugates, particularly those of guanidinoneomycin conjugate 3, an efficient targeted strategy requires that the potential anticancer drug must be less toxic to normal cells than to tumor cells. Otherwise, such anticancer agents generate undesired side effects, as current platinum drugs in clinical use do.

To assess the conjugates' selectivity for tumor cells rather than normal cells, we determined the cell viability of a nontumorigenic HEK293 cell line, in the presence of conjugates 2–4. To our surprise, ruthenium complex 1 ($\text{IC}_{50} = 2.50 \mu\text{M}$) was found more cytotoxic in the normal cell line than in the two cancer cell lines, whereas cisplatin cytotoxicity

was similar ($\text{IC}_{50} = 4.63 \mu\text{M}$) (Table 1). Again, control aminoglycosides and guanidinoneomycin were found to be nontoxic ($\text{IC}_{50} > 250$). As shown in Figure 2, the cytotoxicity of the ruthenium–glycoside conjugates against HEK293 cells can be ranked in the following order: $3 \gg 2 > 4$, which reproduces the tendency found in cancer cell lines. Interestingly, although control complex 1 and aminoglycoside–ruthenium conjugates (2 and 4) were more cytotoxic in the normal cell line than in both cancer cell lines, this tendency was reversed for the guanidinyllated conjugate (3), which was much less active in HEK293 than in DU-145 cells.

Cell Uptake in DU-145 and HEK293 Cell Lines. To gain insight into the involvement of the glycoside moiety in the cytotoxic activity of the compounds, the cell uptake of the control ruthenium complex (1) and of the neomycin–ruthenium (2) and guanidinoneomycin–ruthenium (3) conjugates was investigated in the prostate cancer cell line and in the normal cell line. Ruthenium accumulation (determined here as the net effect of influx and efflux of Ru) in both cell lines was quantified by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)^{24,56–58} after a 24 h exposure to the compounds at equicytotoxic concentrations, which were in all cases a fifth of their IC_{50} values in each cell line.

As shown in Figure 3, the intracellular level of ruthenium after exposure to neomycin conjugate 2 ($107.14 \pm 8.93 \text{ pmol}$

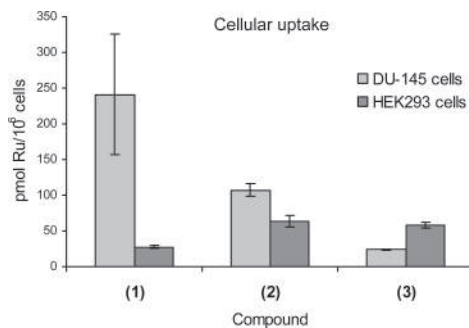


Figure 3. Ruthenium uptake in DU-145 and HEK293 cell lines after 24 h exposure to equicytotoxic concentrations of compounds 1–3. The ruthenium content is related to the cell number. Results are means of three independent samples and are expressed as mean \pm SD.

$\text{Ru}/10^6$ cells) was substantially higher in the DU-145 cell line than guanidinyllated analogue 3 ($24.10 \pm 0.72 \text{ pmol Ru}/10^6$ cells) was, whereas a similar level was obtained in the HEK293 cell line for both compounds ($63.75 \pm 8.46 \text{ pmol Ru}/10^6$ cells for 2 and $58.02 \pm 3.95 \text{ pmol Ru}/10^6$ cells for 3).

On the basis of the amount of intracellular ruthenium after exposure to compounds 1–3, the molar intracellular concentration was calculated by considering the mean cellular volume, as previously reported by Osella et al.⁵⁹ The accumulation ratio was obtained from the ratio between the intracellular concentration and the concentration of the compounds in the extracellular medium at the beginning of the incubation period ($\text{IC}_{50}/5$). As shown in Table 2, the accumulation ratio of the neomycin–ruthenium conjugate (2) was similar in both cell lines. However, the accumulation ratio of the guanidinyllated analogue (3) was much higher than that of 2 both in the cancer DU-145 cell line (about 3-fold) and in the nontumorigenic HEK293 cell line (about 4-fold). Hence, these results are

Table 2. Intracellular Ruthenium Concentrations Determined in DU-145 and HEK293 Cells after Exposure to Compounds 1-3 for 24 h at a Concentration That Was a Fifth of their IC₅₀ Value^a

compound/cell line	intracellular concentration (μM)		accumulation ratio	
	DU-145	HEK293	DU-145	HEK293
ruthenium complex 1	120.40	13.82	80.29	27.64
Ru-neomycin 2	53.57	31.87	3.15	3.19
Ru-guanidinoneomycin 3	12.05	29.01	8.61	12.09

^aThe volume of a single cell was considered to be about 2 pL.⁶³ The accumulation ratio⁵⁹ represents the ratio between the intracellular Ru concentration and the Ru concentration in the extracellular medium at the beginning of the incubation period (DU-145: 1: 1.5 μM , 2: 17 μM , 3: 1.4 μM ; HEK293: 1: 0.5 μM , 2: 10 μM , 3: 2.4 μM).

consistent with the generally accepted idea that the incorporation of guanidinium groups in a molecule facilitates its internalization through cell membrane,^{60–62} such as in the case of cell-penetrating peptides. As previously mentioned, cell uptake studies with amino- and guanidinoglycosides had demonstrated an approximately 20-fold internalization enhancement of neomycin upon guanidinylation.⁴⁵ In fact, guanidinoneomycin shows similar or even better cell uptake efficiency than some polyarginine-containing peptides,^{45,60–62} which has been attributed to the semirigid preorganization of the guanidinium groups on the glycoside core.⁴⁵ Accordingly, ICP-MS accumulation studies with conjugates 2 and 3 showed the same tendency in both cell lines, since guanidinylation of the neomycin moiety leads to a compound (conjugate 3) with greater accumulation than its amino precursor (conjugate 2). Moreover, it should be noted that accumulation of the guanidinylated analogue (3) is about 1.4-fold higher in the normal cell than in the tumor cell, whereas 2 is accumulated at the same ratio in both cell lines.

Regarding the parent complex (1), as shown in Figure 3, the intracellular level of ruthenium in DU-145 cells (240.86 ± 84.40 pmol Ru/ 10^6 cells) was much higher than in HEK293 cells (27.64 ± 2.29 pmol Ru/ 10^6 cells). Similarly, the accumulation ratio was about 3-fold higher in DU-145 than in HEK293 cells (Table 2), which indicates higher accumulation in the prostate cancer cell line than in the normal cell line. In consequence, we can conclude that conjugation of the ruthenium complex through the imidazole ligand to a hydrophilic molecule, either neomycin or guanidinoneomycin, leads to compounds (2 and 3) with reduced accumulation in both cell lines, particularly in the case of conjugate 2, since the incorporation of the guanidinium groups in the glycoside moiety seems to ameliorate this reduction.

Finally, the fact that in all cases the intracellular concentrations were greater than the extracellular concentrations indicates an active cell uptake process for all the compounds, particularly in the case of complex 1 and, to a lesser extent, its guanidinoneomycin conjugate 3.

DISCUSSION

Current research efforts in metal-based anticancer complexes have focused on the development of new compounds, with the aim of overcoming the high toxicity and sensitivity to resistance of platinum-based drugs in clinical use, such as cisplatin and its analogues.^{1–8} Organometallic complexes, in particular ruthenium(II) arene complexes, have attracted attention

because of their promising cytotoxic activities in several tumor cell lines, including cisplatin-resistant cells.^{6–12} In medicinal chemistry terms, their “piano-stool” structure allows the optimization of lead compounds through structure–activity relationship studies by modifying ligands around the metallic center.^{15,16} Among such modifications, derivatization of nonleaving ligands with a carrier molecule has tremendous potential to generate selective, less toxic metallodrugs. The potential of this targeted strategy is particularly promising when metal complexes, either organometallic or classical coordination compounds, are attached to biomolecules^{17–24} whose receptors are overexpressed on the membrane of tumoral cells^{25–28} or to organic molecules with high affinity with a given biological target (proteins or nucleic acids).²⁹ Besides improving selectivity against cancer cells or affinity toward the ultimate target, such modified ligands are also expected to generate hybrid compounds with better pharmacological properties than the original metal complex, such as aqueous solubility or cellular uptake.

This paper reports the effect of conjugating an anticancer ruthenium(II) arene complex (1) to amino- and guanidinoglycosides on the cytotoxic activity and cell uptake of the resulting hybrid compounds in cancer and normal cells. The ultimate aim of this project is to develop novel metal-based anticancer compounds with reduced toxicity and side effects that might have RNA as a final biological target. The fact that amino- and guanidinoglycosides are known to be selective RNA binders, might facilitate the interaction of the ruthenium moiety with potential RNA targets involved in the pathogenesis of cancer, such as miRNAs or their precursors (pre-miRNAs). For the synthesis of neomycin- (2) and neamine–ruthenium conjugates (4), the imidazole ligand incorporated on the suitably protected aminoglycoside moieties was reacted under microwave irradiation with the complex $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2]^+$ (Scheme 1). For the guanidinylation analogue of the neomycin conjugate (3), the use of *N,N'*-di-Boc-*N''*-triflylguanidine was found compatible with the integrity of the ruthenium moiety. After TFA deprotection, all conjugates were isolated by semipreparative HPLC (overall yields: 45–55%) and fully characterized by high resolution MS and NMR spectroscopy.

The cytotoxicity of conjugates 2–4 together with that of cisplatin, complex 1 and control amino- and guanidinoglycosides was tested in two human cancer cell lines, MCF-7 (breast) and DU-145 (prostate), as well as in a normal cell line, HEK293 (human embryonic kidney). As shown in Table 1, the cytotoxic activity of the ruthenium–glycoside conjugates against cancer and normal cells can be ranked in the following order: $3 \gg 2 > 4$. The fact that both natural aminoglycoside antibiotics, neamine and neomycin, and guanidinoneomycin were found to be noncytotoxic in all cell lines ($\text{IC}_{50} > 250$) indicates that the anticancer activity of compounds 2–4 is provided by the ruthenium moiety. However, an accurate analysis of the IC_{50} values of the compounds reveals that, as well as the ruthenium or the glycoside moieties, the nature of the cell (tumoral or healthy) is another key factor to be considered. Two important observations can be drawn when comparing IC_{50} values of these compounds in the normal cell line with those in cancer cells. On the one hand, ruthenium–aminoglycoside conjugates (2 and 4) were more cytotoxic in the nontumorigenic cell line than in cancer cells. Effectively, their antiproliferative activity in HEK293 cells was increased by about 2-fold in both cases (e.g., $\text{IC}_{50} \approx 80 \mu\text{M}$ for conjugate 2 in both cancer cell lines vs $\text{IC}_{50} = 49.4 \mu\text{M}$ for 2 in the normal

cell line). On the other hand, the guanidynylated conjugate 3 was about 2-fold less cytotoxic in the healthy cell line than in the DU-145 cell line (e.g., $IC_{50} = 12.75 \mu\text{M}$ vs $IC_{50} = 7.17 \mu\text{M}$, respectively), whereas a similar IC_{50} value was obtained when compared with the MCF-7 cell line ($IC_{50} = 11.33 \mu\text{M}$), revealing that the response to 3 is also related to the nature of the cancer cells. These results indicate that aminoglycoside-containing conjugates 2 and 4 show the same behavior as their parent ruthenium complex 1, since their cytotoxicity in normal cells was always greater than in cancer cells. However, this tendency was inverted with the guanidynylated analogue of the neomycin-ruthenium conjugate, since the antiproliferative activity of 3 in cancer cells was similar to or even higher than in a normal cell line.

Such differences in cytotoxic activity for each compound in a particular cell line, either normal or tumoral, could be interpreted in terms of cell uptake and accumulation efficiency. First, the nature of the aminoglycoside moiety seems to be an important factor, since the cytotoxicity of the neomycin-ruthenium conjugate (2) in the three cell lines is about 2.5-fold higher than that of the neamine-containing conjugate (4). Although both aminoglycosides are polycations at physiological pH, the greater number of ammonium groups in neomycin than in neamine (six vs four) might favor accumulation of conjugate 2, resulting in a slightly greater antitumoral activity. Second, the fact that the cytotoxicity of the guanidynylated conjugate (compound 3) in the three cell lines is substantially higher than that of the parent aminoglycoside conjugate (compound 2) (7-fold in MCF-7 cells, 12-fold in DU-145 cells and 4-fold in HEK293 cells) could be attributed to greater permeability through cell membranes, a property that might facilitate its accumulation in the cell and, for instance, higher antiproliferative activity. Hence, an apparently good correlation between the expected glycoside uptake efficiency in eukaryotic cells (guanidinoneomycin \gg neomycin $>$ neamine) and cytotoxic activity (3 \gg 2 $>$ 4) can be established in all cell lines, although this does not explain the differences between normal and cancer cells in antiproliferative activity of the conjugates.

Ruthenium accumulation studies performed by ICP-MS with neomycin (2) and guanidinoneomycin (3) conjugates in DU-145 and HEK293 cells clearly support the above conclusions. As shown in Table 2, guanidinylation of the aminoglycoside moiety leads to a compound (3) with higher accumulation than that of its amino precursor 2. Indeed, the accumulation ratio of 3 in the cancer cell line was about 3-fold greater than that of 2, whereas this tendency increased even more in the normal cell line (about 4-fold). These results indicate that guanidinylation of the amino functions at the aminoglycoside moiety in conjugate 2 had a positive effect on cell uptake, thus improving intracellular accumulation. Moreover, it should be noted that the accumulation ratio of conjugate 3 in the normal cell line was 1.4-fold higher than in the cancer cell line, thus revealing behavior the opposite of its amino precursor 2, which was equally accumulated in both cell lines, or that of control complex 1, which accumulated at a higher proportion (about 3-fold) in DU-145 than in HEK293.

On the one hand, recent studies have revealed that guanidinoneomycin uptake in CHO cells is mediated by cell-surface heparin-sulfate proteoglycans, which has been used to transport large bioactive cargo into cells at low concentration (nM order) in a selective proteoglycan-dependent manner.^{47–49} Thus, we may speculate that differences in the

expression level and/or in the composition of proteoglycan receptors on the cell membrane surface between cancer cells and normal cells would be responsible for such differences in the accumulation ratio of 3 between DU-145 and HEK293 cells.⁶⁴

On the other hand, the fact that neomycin- and guanidinoneomycin-ruthenium conjugate's accumulations were lower than that of the parent ruthenium complex 1 also indicates that conjugation to polar, polycationic glycosides results in reduced cell uptake in both cell lines, although this reduction was more dramatic in the cancer cell line. It is well-known that lipophilic compounds can cross cell membranes more readily than hydrophilic compounds, which results in increased intracellular accumulation. This is also true for ruthenium(II) arene complexes since an increase in their lipophilicity, for example by increasing the size of the arene ligand, correlates with greater cytotoxicity.⁶⁵ Accordingly, the decrease in accumulation of complex 1 when conjugated to neomycin or guanidinoneomycin could be attributed to an overall decrease in the lipophilicity of the compound induced by the highly hydrophilic glycoside moiety, which would therefore diminish cell uptake. Although the lipophilicity provided by the ruthenium complex (e.g., *p*-cymene and PPh_3 ligands) may modulate the ability of amino(guanidino)-glycosides to cross cell membranes when conjugated together, these results seem to indicate that the glycoside moiety, particularly in the case of guanidinoneomycin, has a fundamental weight in the cell uptake of the conjugates.

Overall, on the basis of cytotoxicity and cell uptake studies, in DU-145 cells there is a correlation between accumulation (1 \gg 3 $>$ 2) and antiproliferative activity (1 \approx 3 \gg 2). The same tendency was found in the case of the normal cell line, since the cytotoxic activity ranking (1 $>$ 3 \gg 2) follows that of cellular accumulation data (1 $>$ 3 \gg 2). Interestingly, despite the fact that neomycin-ruthenium conjugate (2) accumulation was similar in both cell lines, its antiproliferative activity was higher in the normal cell than in the tumor cell (about 1.7-fold). An opposite tendency was found for the guanidynylated analogue (3), since the cytotoxic activity was higher in the tumor cell line than in the normal cell line (about 1.8-fold), although the accumulation ratio in the normal cell was slightly higher (about 1.4-fold). These results suggest that the glycoside moiety cannot be seen as a simple carrier that modulates the lipophilicity of the anticancer ruthenium(II) arene complex and, for instance, cell uptake, but rather as a dynamic moiety that also modulates the antiproliferative activity of the metal fragment, depending on the cell type. Indeed, the fact that the antiproliferative activity of 3 in the DU-145 cancer cells was higher than in the HEK293 normal cells, with a lower accumulation ratio, suggests that guanidinoneomycin provides some kind of selectivity against cancer cells. This hypothesis is supported by the greater cytotoxicity of ruthenium complex 1 or its neomycin conjugate 2 in normal cells than in cancer cells, despite the fact that their accumulation in normal cells is much lower than (1) or similar to (2) that found in cancer cells. Hence, conjugation to guanidinoneomycin leads to a compound (3) with reduced cytotoxicity against normal cells but with a similar antiproliferative activity to that of the parent ruthenium complex 1 in DU-145 cells.

Finally, we cannot rule out the possibility that amino-(guanidino)glycoside conjugation may also modify not only cell uptake in cancer and normal cells, but also the mechanism of action of the ruthenium complex or its biological target. As

previously mentioned, guanidinoglycosides have higher binding affinity with RNA sequences than their parent aminoglycosides do. Among aminoglycosides, neomycin derivatives bind stronger RNA structures than neamine-containing compounds. Hence, given the significant differences in cytotoxicity of the conjugates in both cancer cell lines ($IC_{50} \approx 7\text{--}11 \mu\text{M}$ for **3**, $IC_{50} \approx 80 \mu\text{M}$ for **2** vs $IC_{50} \approx 200 \mu\text{M}$ for **4**) and in the normal cell line ($IC_{50} \approx 12 \mu\text{M}$ for **3**, $IC_{50} \approx 50 \mu\text{M}$ for **2**, vs $IC_{50} \approx 125 \mu\text{M}$ for **4**), we may well speculate about the involvement of RNA as a target for these conjugates, since there is close correlation between their antiproliferative activity ($3 \gg 2 > 4$) and the RNA binding affinity of the glycoside moiety (guanidinoneomycin \gg neomycin $>$ neamine). The fact that the ruthenium moiety in conjugates **2** and **3** does not follow the typical activation mechanisms of most anticancer organometallic ruthenium complexes (aqueous hydrolysis of the Ru–Cl bond and/or glutathione mediated redox activation) suggests that ruthenation at RNA nucleobases would not occur. However, binding to this biological target could be based on noncovalent interactions such as electrostatic forces and/or hydrogen bonds between the negatively charged skeleton of RNA and the polycationic glycoside moiety. Moreover, aromatic ligands from the ruthenium complex (phenyl rings in PPh_3 and *p*-cymene) could interact with RNA through intercalation or stacking with nucleobases.

In conclusion, the overall results demonstrate the potential of conjugating anticancer metal complexes, in particular organometallic ruthenium(II) complexes, to aminoglycosides, especially to their guanidinylated derivatives, to generate anticancer metal-based drugs with new modes of action. As far as we are aware, such differences between cancer and healthy cells in the cytotoxic activity of amino(guanidino)glycosides conjugated to a ruthenium complex are unprecedented and open the way to the use of guanidinoglycosides to deliver metal-based anticancer agents selectively into tumor cells, with the aim of developing new drugs with reduced toxicity and side effects. Modifications on the aminoglycoside scaffold, on the metal complex or its properties, or in the number of guanidinium groups might lead to increasing such differences in cytotoxic activity between cancer and normal cells. Moreover, the use of cleavable linkers in the biological media or metal complexes that might be selectively activated (e.g., via irradiation) is expected to improve their potential as anticancer drugs. Since aminoglycosides and their guanidinylated derivatives might be accumulated in some specific cellular compartments such as lysosomes, this strategy would facilitate the detachment of the metaldrug from the glycoside carrier, thus increasing the effective concentration of the anticancer active species. Further work is in progress to investigate the anticancer activity of these compounds in a wide panel of tumoral cells, as well as to establish their mechanism of action and if RNA is involved as a drug target.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

High-resolution ESI MS and NMR spectra of conjugates **2–4** and of intermediates **6** and **9**. Reversed-phase HPLC traces of pure conjugates. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +34 934021249. Fax: +34933397878. E-mail: vmarchan@ub.edu.

Author Contributions

A.G.-C. and A.M. contributed equally to this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by funds from Spain's Ministerio de Ciencia e Innovación (grant CTQ2010-21567-C02-01), the Generalitat de Catalunya (2009SGR208), the Instituto de Salud Carlos III (grants RD06/0020/0041), and the Programa d'Intensificació de la Recerca (UB).

■ REFERENCES

- (1) Peacock, A. F. A.; Sadler, P. J. Medicinal organometallic chemistry: Designing metal arene complexes as anticancer agents. *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 1890–1899.
- (2) Hartinger, C. G.; Dyson, P. J. Bioorganometallic chemistry-from teaching paradigms to medicinal applications. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 391–401.
- (3) Casini, A.; Hartinger, C. G.; Nazarov, A.; Dyson, P. J. Organometallic antitumor agents with alternative modes of action. *Top. Organomet. Chem.* **2010**, *32*, 57–80.
- (4) Gasser, G.; Ott, I.; Metzler-Nolte, N. Organometallic anticancer compounds. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3–25.
- (5) Noffke, A. L.; Habtemariam, A.; Pizarro, A. M.; Sadler, P. J. Designing organometallic compounds for catalysis and therapy. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5219–5246.
- (6) Levina, A.; Mitra, A.; Lay, P. A. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. *Metallicomics* **2009**, *1*, 458–470.
- (7) Süß-Fink, G. Arene ruthenium complexes as anticancer agents. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 1673–1688.
- (8) Bergamo, A.; Sava, G. Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 7817–7823.
- (9) Yan, K. Y.; Melchart, M.; Habtemariam, A.; Sadler, P. J. Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. *Chem. Commun.* **2005**, *38*, 4764–4776.
- (10) Kisova, A.; Zerkankova, L.; Habtemariam, A.; Sadler, P. J.; Brabec, V.; Kasparkova, J. Differences in the Cellular Response and Signaling Pathways between Cisplatin and Monodentate Organometallic Ru(II) Antitumor Complexes Containing a Terphenyl Ligand. *Mol. Pharmaceutics* **2011**, *8*, 949–957.
- (11) Allardyce, C. S.; Dyson, P. J.; Ellis, D. J.; Heath, S. L. $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})Cl_2(pta)]$ ($pta = 1,3,5\text{-triazol-7-phosphatrimethyl-}3,3,1,1\text{-decane}$): a water soluble compound that exhibits pH dependent DNA binding providing selectivity for diseased cells. *Chem. Commun.* **2001**, *15*, 1396–1397.
- (12) Scolaro, C.; Bergamo, A.; Brescacin, L.; Delfino, R.; Cocchiotto, M.; Laurency, G.; Geldbach, T. J.; Sava, G.; Dyson, P. J. In Vitro and In Vivo Evaluation of Ruthenium(II)-Arene PTA Complexes. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4161–4171.
- (13) Wang, F.; Chen, H.; Parsons, S.; Oswald, I. D. H.; Davidson, J. E.; Sadler, P. J. Kinetics of aquation and anation of ruthenium(II) arene anticancer complexes, acidity and X-ray structures of aqua adducts. *Chem.—Eur. J.* **2003**, *9*, 5810–5820.
- (14) Pizarro, A. M.; Habtemariam, A.; Sadler, P. J. Activation mechanisms for organometallic anticancer complexes. *Top. Organomet. Chem.* **2010**, *32*, 21–56.
- (15) Jakupec, M. A.; Galanski, M.; Arion, V. B.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K. Antitumor metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Trans.* **2008**, *2*, 183–194.

rigidity and static presentation of guanidinium groups increases cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 453–458.

(63) Reile, H.; Bernhardt, G.; Koch, M.; Schonenberger, H.; Hollstein, M.; Lux, F. Chemosensitivity of human MCF-7 breast cancer cells to diastereoisomeric diaqua(1,2-diphenylethylenediamine) platinum(II) sulfates and specific platinum accumulation. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1992**, *30*, 113–122.

(64) Bishop, J. R.; Schuksz, M.; Esko, J. D. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* **2007**, *446*, 1030–1037.

(65) Yan, Y. K.; Melchart, M.; Habtemariam, A.; Sadler, P. J. Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. *Chem. Commun.* **2005**, 4764–4776.



La teràpia farmacològica antineoplàstica és en l'actualitat un dels pilars del tractament oncològic. Tot i això, la majoria dels agents quimioterapèutics tenen un ús limitat com a conseqüència dels efectes adversos que produeixen i de les resistències que desenvolupen les cèl·lules tumorals a aquests tractaments. En aquesta tesi, s'ha contribuït en el coneixement d'aquestes limitacions a través de dos estudis.

Per una banda, s'ha analitzat un mecanisme basat en millorar la selectivitat per les cèl·lules tumorals d'alguns complexos metàl·lics amb potencial activitat antitumoral a través de la seva unió a anàlegs de l'octreotide i l'àcid fòlic, dues molècules que tenen els seus receptors sobreexpressats en determinats tipus de tumors.

D'altra banda, s'ha estudiat un mecanisme de resistència a les teràpies dirigides a inhibir el receptor EGFR basat en la sobreexpressió de receptors i lligands de la pròpia via HER-EGF alternatius a l'inhibir. En concret, s'ha estudiat si aquest mecanisme està involucrat en la manca d'eficàcia de les teràpies dirigides a inhibir l'EGFR en el càncer de pròstata.

En conjunt, els resultats que s'han obtingut en ambdós treballs han resultat ser rellevants en el coneixement del tractament oncològic actual, ja que han obert noves portes per tal de millorar les limitacions de les teràpies utilitzades.