



Derivats del (-)3-galat d'epigalocatequina com a nous inhibidors de la sintasa d'àcids grassos amb efectes antitumorals en models cel·lulars i animals de càncer de mama

Glòria Oliveras i Serrat

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Facultat de Medicina
Departament de Medicina

Tesi Doctoral

Derivats del (-)-3-galat d'epigalocatequina com a
nous inhibidors de la sintasa d'àcids grassos amb
efectes antitumorals en models cel·lulars i animals de
càncer de mama

Glòria Oliveras i Serrat

2012

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Medicina

Departament de Medicina

Derivats del (-)-3-galat d'epigallocatequina com a nous inhibidors de
la sintasa d'àcids grassos amb efectes antitumorals en models
cel·lulars i animals de càncer de mama

Memòria presentada per Glòria Oliveras i Serrat per optar al títol de doctor per
la Universitat de Barcelona

Directora de la tesi doctoral

Tutor de la tesi doctoral

Dra. Teresa Puig Miquel
Dept. Ciències Mèdiques
Facultat de Medicina
Universitat de Girona

Dr. César Picado Vallés
Catedràtic d' Universitat
Departament de Medicina
Universitat de Barcelona

A en Jordi, en Jaume i a una gran dona, la meva mare.

*En els moments de crisi només la imaginació
és més important que el coneixement*

Albert Einstein

AGRAÏMENTS

Bé, això d'escriure uns agraïments sempre he pensat que era una tasca molt difícil. Es tracta de ser genial, diferent, original per en definitiva dir una paraula tant senzilla i sincera com **gràcies** doncs ho intentaré fer.

He arribat fins aquí després d'un camí molt llarg, en el temps i les distàncies, en el qual m'he creuat amb moltes persones especials i totes elles han contribuït en alguna part de mi, ja sigui a nivell personal com professional, per això em resultaria impossible mencionar-les a totes, però tinc la certesa que elles ja saben que els hi estic plenament agraïda.

De totes maneres voldria fer menció especial a unes quantes d'elles:

En primer lloc gràcies Teresa per confiar en mi, encoratjar-me i donar-me totes les facilitats per elaborar aquesta tesi. També a tota la gent del laboratori del parc i de l'hospital, i de manera especial a l'Adriana per la seva franquesa.

A totes les meves amigues i amics que m'entenen, m'ajuden i em fan sentir tant afortunada. Gràcies nenes, gràcies *ximets*.

I evidentment no podia faltar la meva gran família que són els meus eterns incondicionals en tot, sense ells no hauria arribat fins aquí..... mil gràcies a tots i sobretot a les àvies pels cangurs d'aquesta última etapa.

Per últim, gràcies Jordi per escoltar-me, ajudar-me, acompanyar-me en tot i fer-me sentir especial i a tu Jaume que ho estàs descobrint tot i ens encomanes d'aquesta meravellosa innocència.

Índex

Índex de taules i figures.....	<i>i</i>
Resum / Resumen / Summary	<i>iii</i>
Abreviatures	<i>ix</i>
INTRODUCCIÓ	3
Metabolisme dels àcids grassos i càncer.....	3
1.- FASN	6
Estructura	7
Funció.....	8
2.- Regulació de FASN	9
Cèl·lules normals	9
Cèl·lules tumorals.....	11
3.- FASN i càncer	14
Inhibició de FASN	15
Inhibidors de FASN	16
EGCG	19
Nous compostos derivats de l'EGCG	20
Càncer	22
1.- Càncer de mama.....	23
Estructura de la mama	24
2.- Classificació dels tumors de mama.....	26
Tipus de càncer de mama	26
3.- Factors pronòstic	29
Grau histològic	29
Afectació ganglionar.....	30
Mida del tumor	30
Taxa de proliferació.....	30
Receptors hormonals	31
HER2	31
4.- Classificació molecular del càncer de mama	32
Luminals	32
Tumors HER2 positius	33
Tumors triples negatius.....	33
Càncer de mama HER2+	35
1.- Descripció	35
2.- Funció	35
3.- Lligands de la família HER	38
Tractaments del càncer de mama	41
1.- Cirurgia	41
2.- Radioteràpia	42
3.- Quimioteràpia.....	43
4.- Teràpia hormonal	45
5.- Teràpies biològiques.....	47
5.1.- Inhibidors de la tirosina cinasa.....	48
LAPATINIB	48
ERLOTINIB	49
GEFITINIB	50

5.2.- Inhibidors de PARP.....	52
5.3.- Anticossos monoclonals.....	52
CETUXIMAB.....	53
BEVACIZUMAB.....	54
PERTUZUMAB.....	55
TRASTUZUMAB.....	55
Mecanismes d'acció del trastuzumab.....	56
Resistències a trastuzumab.....	57
HIPÒTESI i OBJECTIUS.....	63
RESULTATS.....	69
Article 1.....	69
Article 2.....	83
DISCUSSIÓ.....	101
CONCLUSIONS.....	117
BIBLIOGRAFIA.....	123
ANNEX.....	133

Índex de Figures

- Figura 1.** Metabolisme dels àcids grassos.
- Figura 2.** Estructura proteica de FASN amb els seus dominis.
- Figura 3.** Síntesi d'àcids grassos.
- Figura 4.** Regulació de FASN en les cèl·lules normals.
- Figura 5.** Regulació de FASN en cèl·lules tumorals.
- Figura 6.** Estructura química dels inhibidors més coneguts de FASN.
- Figura 7.** Ruta sintètica general per a la síntesi de nous compostos polifenòlics.
- Figura 8.** Esquema de la síntesi dels nous compostos de fórmula I.
- Figura 9.** Avantatges biològics que han d'adquirir les cèl·lules tumorals per poder formar un tumor i metastasi.
- Figura 10.** Anatomia de la mama femenina.
- Figura 11.** Els quatre receptors de la família HER amb els seus corresponents lligands.
- Figura 12.** Representació esquemàtica de l'activació d'HER2.
- Figura 13.** Vies de senyalització regulades pels membres de la família HER. I lloc d'actuació d'alguns fàrmacs anti-HER.
- Figura A1.** Nivells proteics de FASN en les diferents línies cel·lulars.

Índex de Taules

- Taula 1.** Inhibidors de FASN.
- Taula 2.** Fàrmacs quimioterapèutics més usats en càncer de mama.
- Taula A1.** Quimioteca dels nous compostos derivats de l'EGCG i citotoxicitat en cèl·lules de càncer de mama amb diferents nivells de FASN i en fibroblasts N1, cèl·lules no tumorals.

Resum

La sintasa d'àcids grassos (FASN), enzim que realitza la síntesi *de novo* dels àcids grassos, es sobreexpressa en alguns càncers, sobretot en càncer de mama, i s'associa a un mal pronòstic. La seva regulació està relacionada amb la via de senyalització d'HER2, receptor cel·lular de membrana que pertany a la família dels receptors de creixement epidèrmic (HER), tot i que encara es desconeixen els mecanismes moleculars d'aquesta relació. El coneixement de la implicació del paper del metabolisme dels àcids grassos en la iniciació i la progressió del càncer de mama i el desenvolupament d'inhibidors farmacològics de l'activitat de FASN té un gran interès científic-mèdic. L'ús clínic d'inhibidors de FASN, com la cerulenina o el C75, presenten una baixa estabilitat i efectes col·laterals com l'anorèxia i la pèrdua de pes, ja que activen la Carnitina Palmitoil Transferasa 1 (CPT1), enzim regulador de la β -oxidació dels àcids grassos. Anteriorment el nostre grup va demostrar que el (-)-3-galat d'epigallocatequina (EGCG), un polifenol present en el té verd, inhibeix FASN, té efectes antitumorals i és més selectiu que la cerulenina i el C75 perquè no afecta la CPT1, i en conseqüència no produeix pèrdua de pes *in vivo*. L'ús terapèutic de l'EGCG com agent antitumoral es veu limitat per l'elevat valor de la IC_{50} ($\sim 150 \mu M$) i també per la inestabilitat en condicions fisiològiques. En base a aquests resultats, en aquest treball es presenta el disseny d'una família de compostos polifenòlics relacionats estructuralment amb l'EGCG per millorar-ne la seva activitat antitumoral, la biodistribució i l'estabilitat. *In vitro* s'ha realitzat l'avaluació de l'activitat biològica i molecular d'aquests compostos per tal de valorar-ne l'especificitat, la capacitat inhibidora específica de FASN i l'activitat citotòxica en diferents models de càncer de mama. S'ha determinat que el compost G28UCM presenta una inhibició de l'activitat de

FASN d'un 90% i una elevada citotoxicitat en cèl·lules de càncer de mama ($IC_{50} = 30 \mu M$). Per altra banda, s'han analitzat les interaccions cel·lulars i moleculars del compost G28UCM en combinació amb les teràpies anti-HER existents (trastuzumab, lapatinib, erlotinib i cetuximab) en un model cel·lular de càncer de mama FASN/HER2 positiu. El G28UCM mostra un clar sinergisme farmacològic amb els fàrmacs anti-HER, trastuzumab, lapatinib i erlotinib, a diferència de l'EGCG que tant sols mostra additivisme amb el trastuzumab. A més al laboratori s'han desenvolupat models cel·lulars de càncer de mama resistents als fàrmacs anti-HER2, trastuzumab i lapatinib, i s'ha avaluat si el G28UCM té activitat antitumoral en aquests models cel·lulars. Els resultats obtinguts ens mostren que el G28UCM segueix mostrant activitat citotòxica amb les cèl·lules resistents als fàrmacs anti-HER2.

In vivo, primer es va desenvolupar el millor model murí de carcinoma de mama FASN i HER2+ utilitzant els compostos inhibidors de FASN de referència EGCG i C75. Un cop establert el model animal es va caracteritzar l'activitat antitumoral i el perfil de toxicitat del compost seleccionat G28UCM. Es va obtenir una inhibició del creixement tumoral en un terç dels ratolins tractats amb el G28UCM, els quals no varen mostrar cap tipus de toxicitat (renal, hepàtica, cardíaca) ni pèrdua de pes.

Aquests resultats proporcionen el fonament pel desenvolupament preclínic del G28UCM, ja sigui sol o en combinació amb les teràpies anti-HER existents en els tumors de mama que sobreexpressen HER2 i els que han progressat al tractament.

Paraules clau: càncer de mama, sintasa d'àcids grassos (FASN), HER2, inhibidors farmacològics, síntesi química, resistència.

Resumen

La sintasa de ácidos grasos (FASN), enzima que realiza la síntesis *de novo* de los ácidos grasos, se sobreexpresa en algunos cánceres, sobretodo en cáncer de mama, y se asocia a un mal pronóstico. Su regulación está relacionada con la vía de señalización de HER2, receptor celular de membrana que pertenece a la familia de los receptores de crecimiento epidérmico (HER), aunque se desconocen los mecanismos moleculares de dicha relación. El conocimiento de la implicación del papel del metabolismo de los ácidos grasos en la iniciación y la progresión del cáncer de mama y el desarrollo de los inhibidores farmacológicos de la actividad de FASN tiene un gran interés científico medico. El uso clínico de los inhibidores de FASN, como la cerulenina o el C75, presentan una baja estabilidad y efectos colaterales como la anorexia y la pérdida de peso al activar la Carnitina Palmitoil Transferasa 1 (CPT1), enzima regulador de la β -oxidación de los ácidos grasos. Anteriormente, nuestro grupo demostró que el (-)-3-galato de epigallocatequina (EGCG), un polifenol presente en el te verde, inhibe FASN, tiene efectos antitumorales y es más selectivo que la cerulenina y el C75 porque no afecta la CPT1, y en consecuencia no produce pérdida de peso *in vivo*. El uso terapéutico del EGCG como agente antitumoral se ve limitado por el elevado valor de la IC_{50} ($\sim 150 \mu M$) y también por la inestabilidad en condiciones fisiológicas. En base a estos resultados en este trabajo se presenta el diseño de una familia de compuestos polifenólicos relacionados estructuralmente con el EGCG para mejorar su actividad antitumoral, la biodistribución y la estabilidad. *In vitro* se ha realizado la evaluación de la actividad biológica y molecular de estos compuestos para así valorar la especificidad, la capacidad inhibidora específica de FASN y la actividad citotóxica en diferentes modelos de cáncer de mama. Se ha determinado que el compuesto G28UCM presenta una inhibición de la actividad de FASN de un 90% y una

elevada citotoxicidad en células de cáncer de mama ($IC_{50}=30 \mu M$). Además se han analizado las interacciones celulares y moleculares del compuesto G28UCM en combinación con las terapias anti-HER existentes (trastuzumab, lapatinib, erlotinib y cetuximab) en un modelo celular de cáncer de mama FASN/HER2 positivo. El G28UCM muestra un claro sinergismo farmacológico con los fármacos anti-HER, trastuzumab, lapatinib y erlotinib, a diferencia del EGCG que tan solo muestra additivismo con el trastuzumab. Además en el laboratorio se han desarrollado modelos celulares de cáncer de mama resistentes a los fármacos anti-HER2, trastuzumab y lapatinib, y se ha evaluado si el G28UCM tiene actividad antitumoral en estos modelos celulares. Los resultados obtenidos nos muestran que el G28UCM sigue mostrando actividad citotóxica en las células resistentes a los fármacos anti-HER2.

In vivo, primero se desarrolló el mejor modelo murino de carcinoma de mama FASN y HER2+ utilizando los compuestos inhibidores de FASN de referencia EGCG y C75. Una vez establecido el modelo animal se caracterizó la actividad antitumoral y el perfil de toxicidad del compuesto seleccionado G28UCM. Se obtuvo una inhibición del crecimiento tumoral en un tercio de los ratones tratados con el G28UCM los cuales no mostraron ningún tipo de toxicidad (renal, hepática y cardíaca) ni pérdida de peso.

Estos resultados proporcionan el fundamento para el desarrollo preclínico del G28UCM, ya sea solo o en combinación con las terapias anti-HER existentes en los tumores de mama que sobreexpresan HER2 y que han progresado al tratamiento.

Palabras clave: cáncer de mama, sintasa de ácidos grasos (FASN), HER2, inhibidores farmacológicos, síntesis química, resistencia.

Summary

Fatty Acid Synthase (FASN), an enzyme responsible for the *de novo* synthesis of fatty acids is overly manifested in certain types of cancer, especially in breast cancer, and it is associated with a poor diagnosis. Its regulation is associated with the signaling of HER2, a cellular receptor belonging to the human epidermal growth receptors (HER) family. However, the molecular mechanisms associated with this relationship are not well understood. Understanding the importance of the role played by fatty acids metabolism in the appearance and progress of breast cancer, as well as the development of pharmacological inhibitors of FASN activity, is of great interest to the scientific and medical fields. The clinical use of FASN inhibitors, such as cerulenin or C75, offers low levels of stability and present side effects, like anorexia and weight loss, since they activate Carnitina Palmitoil Transferasa 1 (CPT1), a regulator enzyme of fatty acids' β -oxidation. Previously our research group has proven that epigallocatechin 3-gallate (EGCG), a polyphenol present in green tea, inhibits FASN, has anti-tumoral effects and since it does not affect CPT1, is more selective than both cerulenin and C75. Consequently it does not trigger weight loss *in vivo*. The therapeutic use of EGCG as an anti-tumoral agent is limited by its high IC_{50} value ($\sim 150 \mu\text{M}$), as well as by its instability in physiological conditions. Following these results, a family of polyphenol compounds structurally related to EGCG has been designed with the goal of enhancing its anti-tumoral activity, its biodistribution and its stability. *In vitro*, an evaluation of the biological and molecular activity of these compounds was carried out with the objective of assessing their specificity, their FASN-specific inhibiting capacity and their cytotoxic activity in different models of breast cancer. The results show that the G28UCM compound shows a 90% inhibition of FASN activity and a high cytotoxicity levels in breast cancer cells ($IC_{50} = 30 \mu\text{M}$). Also, the cellular and

molecular interactions of the G28UCM compound were analyzed in combination with already existing anti-HER therapies (trastuzumab, lapatinib, erlotinib, and cetuximab) in a cellular model of FASN/HER2-positive breast cancer. The G28UCM compound shows a clear pharmacological synergy with anti-HER, trastuzumab, lapatinib, and erlotinib drugs, as opposed to EGCG, which only shows additivism with trastuzumab. Further, the team also developed cellular models of breast cancer, which were resistant to anti-HER2, trastuzumab, and lapatinib drugs, and assessed whether the G28UCM compound presents anti-tumoral activity in said cellular models. The results show that the G28UCM compound presents cytotoxic activity with anti-HER2 drug resistant cells.

In vivo, the research group first developed the best murine model of FASN and HER2+ breast carcinoma using the EGCG- and C75-reference FASN inhibitor compounds. Once the animal model was established, the tumoral activity and the toxicity profile of the selected G28UCM compound were characterized. The observations show an inhibition of the tumoral growth in one third of the mice treated with G28UCM and the mice did not manifest any type of (renal, hepatic, cardiac) toxicity or weight loss.

These results offer the basis for the pre-clinical development of G28UCM, either for its use in isolation or in combination with the already existing anti-HER therapies, in breast tumors overexpressing HER2 and those having shown progress to the treatment.

Keywords: breast cancer, fatty acids synthase (FASN), HER2, pharmacological inhibitors, chemical synthesis, resistance.

Llistat abreviatures

ACC	acil-CoA carboxilasa
ACP	proteïna transportadora d'acil
ADCC	citotoxicitat cel·lular dependent d'anticòs
AG	àcid gras
AKT	proteïna cinasa B
AR	amfiregulina
ATP	adenina trifosfat
ATP	adenosina trifosfat
BCRA1	gen 1 de càncer de mama
BTC	β -celulina
cAMP	monofosfat cíclic d'adenosina
Cdk2	ciclina cinasa 2
CK	citoqueratina
CoA	coenzim A
CPT1	carnitina palmitoil transferasa 1
DH	deshidrogenasa
DNA	àcid desoxiribonucleic
EGCG	(-)-3-galat d'epigallocatequina
EGF	factor de creixement epidèrmic
EMA	agència europea del medicament
EPR	epiregulina
ER	enoil reductasa
ERK1/2	cinasa extracel·lular reguladora de senyals
FASN	sintasa d'àcids grassos
FDA	administració d'aliments i fàrmacs
FISH	hibridació fluorescent <i>in situ</i>
GF	factor de creixement
GFR	receptor de factor de creixement
GTP	guanosina trifosfat
HB-EGF	factor de creixement semblant a EGF que uneix heparina
HER	receptor del factor de creixement epidèrmic
HER1	receptor 1 del factor de creixement epidèrmic
HER2	receptor 2 del factor de creixement epidèrmic
HER3	receptor 3 del factor de creixement epidèrmic
HER4	receptor 4 del factor de creixement epidèrmic
HIF-1α	factor 1 α induïble d'hipòxia
IA	inhibidors de l'aromatasa
IGF-1R	factor de creixement insulínic 1
IgG1	immunoglobulina G1
IHQ	immunohistoquímica
ITK	inhibidor tirosina cinasa
KDa	kilo Daltons
KR	β -ketoacil reductasa
KS	β -ketoacil sintasa
MAPK	proteïna mitògena cinasa activada
MAT	malonil acetil transferasa
MEK1/2	cinasa 1/2 activada per mitògens

mTOR	proteïna de mamífers diana de la rapamicina
MUC4	mucina 4
NADPH	nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat
NFκB	factor nuclear kappa β
NF-Υ	factor nuclear Υ
NRG	neuregulina
NRGs-1	neuregulines-1
NRGs-2	neuregulines-2
p21	proteïna 21
p27	proteïna 27
p53	proteïna 53
PARP	inhibidor de la poli ADP-ribose polimerasa
PI3K	fosfatidilinositol 3 cinasa
PIP3	fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat
PKC	la proteïna cinasa c
PLC	fosfolipasa c
PTEN	fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat 3-fosfatasa
RA	receptor d'androgen
RE	receptor d'estrogen
RP	receptor de progesterona
SERM	modulador selectiu del receptor d'estrogen
SHR	receptor de l'hormona esteroide
Skp2	proteïna cinasa 2 associada a la fase S
SP1	proteïna estimuladora 1
SREBP	proteïna d'unió a elements reguladors d'esterols
SREBP 1c	proteïna 1c d'unió a elements reguladors d'esterols
T3	triiodotironina
TAG	triacilglicèrid
TE	tioesterasa
TGF-α	factor de creixement transformant α
TK	tirosina cinasa
USF	factor estimulant
USP2a	proteïna preproteosomal 2a ubiquitina específica
VEGF	factor de creixement endotelial vascular
VEGFR1	receptor 1 del factor de creixement endotelial vascular
VEGFR2	receptor 2 del factor de creixement endotelial vascular

Introducció

Metabolisme dels àcids grassos i càncer

Els àcids grassos són el major substrat metabòlic del cos humà, tenen una densitat energètica superior a la glucosa i s'acumulen en el teixit adipós en forma de triacilglicèrids (TAGs). Aquests poden ser d'aportació exògena, a través de la dieta, o per reaccions endògenes, com la hidròlisi de TAGs emmagatzemats, l'alliberació de lípids de membrana o la biosíntesi *de novo* (lipogènesi).

El metabolisme lipídic comença amb la hidròlisi dels TAGs per lipases específiques on s'allibera una molècula de glicerol i tres d'àcids grassos. Aquests àcids grassos arribaran als diferents teixits mitjançant el sistema limfàtic i el circulatori. Per acció de la lipoproteïna lipasa associada a cèl·lules endotelials dels capil·lars, els àcids grassos són novament alliberats i així poden ser captats pels teixits. Al teixit adipós els àcids grassos lliures seran reesterificats i emmagatzemats com a TAGs, i en teixits com l'hepàtic o el muscular seran utilitzats com a substrat energètic.

La lipogènesi és la síntesi *de novo* dels àcids grassos. Aquest procés es dona en el fetge o en el teixit adipós blanc. L'Acetil-Coenzim A (CoA), resultat de l'oxidació dels carbohidrats, mitjançant l'enzim acil-CoA carboxilasa (ACC) es converteix en malonil-CoA, el primer intermediari de la síntesi d'àcids grassos de cadena llarga i substrat de la **sintasa d'àcids grassos (FASN: Fatty-Acid Synthase)**.

FASN és un complex multienzimàtic molt ben estructurat i encarregat de la síntesi *de novo* dels àcids grassos de cadena llarga, principalment el palmitat, a partir de la condensació d'acetil-CoA i malonil-CoA depenent de nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (NADPH) [1].

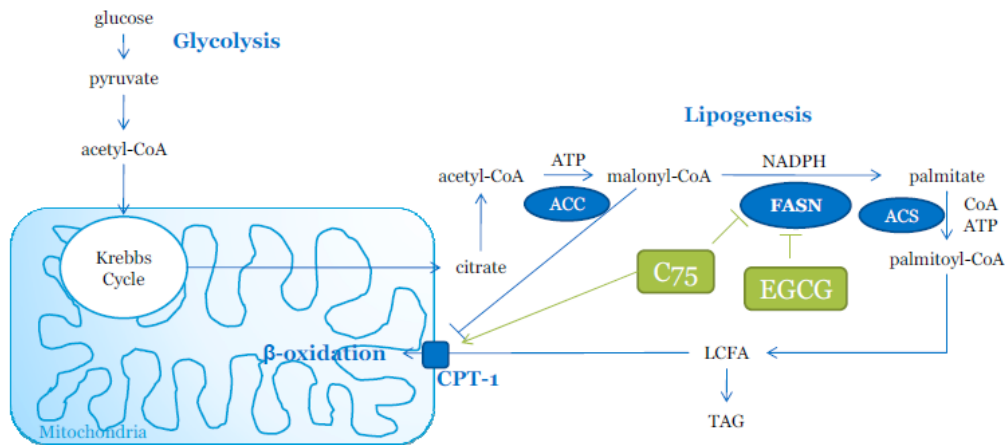


Figura 1. Metabolisme dels àcids grassos. La glucosa es transportada del mitocondri al citoplasma en forma de citrat que és convertit en Acetil-Coa. Aquest és metabolitzat a malonil-CoA que juntament amb el acetil-CoA i el NADPH són els substrats de FASN per la formació del palmitat. El malonil-CoA inhibeix la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), bloquejant la β -oxidació dels àcids grassos sintetitzats. C75 inhibeix l'activitat de FASN i estimula l'activitat de CPT1. El (-)-3-galat d'epigallocatequina (EGCG) només inhibeix l'activitat de FASN. Modificada de Puig T et al. *Med Clinica*, 2009.

En condicions normals als teixits lipogènics la síntesi d'àcids grassos es dona amb la finalitat d'emmagatzemar energia en forma de TAGs. En dejú s'inhibeix l'expressió i l'activació de FASN, disminueixen els valors de malonil-CoA i s'activa l'oxidació dels àcids grassos. Durant la lipogènesi, el malonil-CoA actua inhibint el complex enzimàtic carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1) [2], llançadora dels àcids grassos de cadena llarga del citoplasma a la matriu mitocondrial, on té lloc la β -oxidació (Figura 1).

Als teixits tumorals els àcids grassos de síntesi endògena no són esterificats i emmagatzemats en forma de TAGs, sinó en forma de fosfolípids. Això ens indica que la inhibició de FASN reduiria la font de fosfolípids estructurals de membrana per les cèl·lules tumorals. A més, la síntesi d'àcids grassos en cèl·lules tumorals està regulada per factors transcripcionals (hormones, factors de creixement) o per oncoproteïnes relacionades amb les rutes de senyalització depenent de cinases, a diferència de les cèl·lules normals on està regulat bàsicament per factors dietètics.

Des de 1920 és conegut que les cèl·lules tumorals presenten una alteració del metabolisme i actualment aquesta característica s'inclou com un dels punts

determinants de la supervivència de les cèl·lules canceroses i es té en conte en el disseny de fàrmacs antitumorals [3]. Una característica de les cèl·lules tumorals és el seu gran consum d'energia degut a la síntesi de proteïnes i àcid desoxiribonucleic (DNA) per mantenir la divisió cel·lular [4-7].

Warburg i col·laboradors van observar que les cèl·lules tumorals consumien una gran quantitat d'energia i produïen àcid làctic, tot en presència d'oxigen, és el que es coneix com l'*efecte Warburg* o la glucòlisi aeròbica [8]. Aquest fenomen implica que hi ha una gran formació de lactat en condicions aeròbiques. Aquest procés és d'una alta ineficiència energètica comparat amb la respiració mitocondrial on només es gasta el 5% de l'energia disponible de la glucosa, això fa augmentar el consum de glucosa en cèl·lules tumorals. Però tot això proporciona avantatge a les cèl·lules malignes en l'ambient tumoral i un fenotip que les fa diferents a les altres. Tres aspectes fan que les cèl·lules tumorals adquireixin aquest fenotip diferent:

i) Alts nivells de carboni, producte de la glucòlisi aeròbica, donen a les cèl·lules tumorals aquest avantatge dins el microambient tumoral.

ii) La gran despesa energètica per la síntesi proteica i també la síntesi de DNA, fan que aquestes cèl·lules tinguin unes necessitats metabòliques diferents.

iii) Alta producció de la síntesi *de novo* d'àcids grassos totalment relacionat amb el metabolisme glicolític de les cèl·lules tumorals [9].

Aquest augment de la glucòlisi en les cèl·lules tumorals produeix un excés de piruvat que és transformat a lactat (en un 85% aprox.) i en acetil-CoA (en un 5% aprox.) per ser oxidat. El fet de que les cèl·lules tumorals proliferin tant ràpid fa augmentar les seves necessitats d'àcids grassos com a substrat per la biosíntesi de fosfolípids que són els components essencials de les membranes cel·lulars i participen en l'acilació de proteïnes i la producció d'energia a través de la β -oxidació [10]. Per

tant, cal destacar que degut a aquest augment de la glucòlisi les cèl·lules tumorals tenen prou piruvat per sintetitzar els substrats dels àcids grassos.

Els àcids grassos estan presents com a substrats metabòlics en cèl·lules normals i es conserven en forma de TAGs en el teixit adipós. Aquests àcids grassos provenen de diferents fonts: exògena o sigui de la dieta i de manera endògena per la hidròlisi dels triglicèrids del teixit adipós i la lipogènesi (*síntesi de novo*). Aquest tret és el que proporciona una de les principals diferències entre les cèl·lules normals i les tumorals. Les primeres obtenen els àcids grassos a través de la dieta és a dir de manera exògena, en canvi les cèl·lules tumorals prefereixen fer la síntesi de nou [11]. Aquesta necessitat de les cèl·lules tumorals de sintetitzar els àcids grassos de nou posa en relleu la importància de dos enzims reguladors: FASN i l'ACC com a dianes en el tractament del càncer.

Les cèl·lules tumorals presenten un patró d'expressió i activitat de FASN totalment diferent a les cèl·lules normals. Per això FASN té un paper molt important en la supervivència, la progressió i la malignitat de les cèl·lules tumorals [12, 13].

1.- FASN

En cèl·lules eucariotes s'han descrit dues proteïnes FASN respecte a la seva localització cel·lular. FASN I és una proteïna citosòlica de 270 KDa responsable de la síntesi *de novo* dels àcids grassos i, FASN II localitzada als mitocondris produeix octanoil, precursor essencial per la síntesi de lípids importants per les funcions dels mitocondris [14].

En cèl·lules normals els nivells d'expressió de FASN són relativament baixos ja que els àcids grassos provenen de la dieta. Tot i així FASN juga un paper important en

el metabolisme energètic dels teixits lipogènics com el fetge, el teixit adipós, les mames i l'endometri [15].

Per contrari, FASN s'expressa en nivells significativament elevats en gran varietat de càncers humans com el de mama, tiroides, colon, ovari, pulmó i pròstata [12, 16].

Recentment també s'ha estudiat la importància de la sobreexpressió de FASN en càncers hematològics [17].

En molts més estudis s'ha demostrat que els nivells d'expressió de FASN es correlacionen amb la progressió del tumor així com amb la seva agressivitat i metàstasi [10].

Estructura

FASN és una proteïna multienzimàtica de 250-270 KDa constituïda per 7 dominis funcionals formant un homodímer: β -ketoacil sintasa (KS), malonil/acetil transferasa (MAT), deshidrogenasa (DH), enoil reductasa (ER), β -ketoacil reductasa (KR), proteïna transportadora d'acil (ACP) i la tioesterasa (TE) [18](Figura 2).

Es creu que l'estructura atòmica de FASN segueix un model entrecreuat en forma de X que permet múltiples interaccions inter i intra subunitats entre els dominis funcionals, i el domini KS situat al centre de l'estructura [1, 19].

La centralització espacial de diverses reaccions ordenades seqüencialment en un sistema multienzimàtic com és FASN presenta uns avantatges fonamentals en comparació amb els enzims separats. En aquest tipus de sistemes les reaccions competitives s'inhibeixen i els passos individuals d'una reacció es donen de forma coordinada com en una producció en sèrie. Per això són especialment eficaces i assolixen unes altes concentracions de substrat degut a què les pèrdues per difusió són molt poques [20].

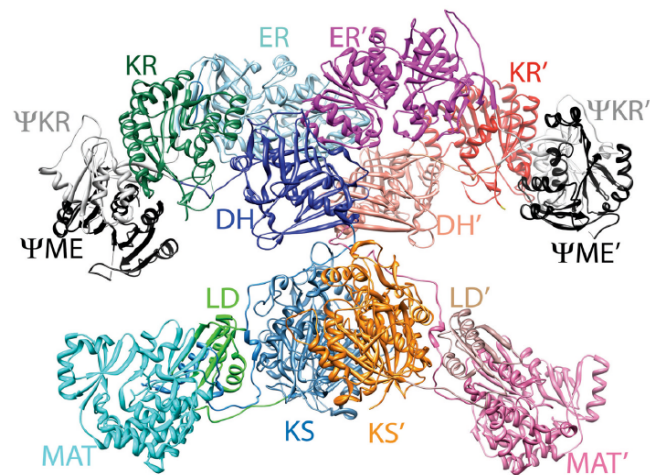


Figura 2. Estructura proteica de FASN amb els seus dominis. *Protein Data Bank 2009.*

Funció

FASN és l'enzim que participa en la síntesi d'àcids grassos de cadena llarga, principalment palmitat, després d'una sèrie de trenta dues reaccions, on l' acetil-CoA i el malonil-CoA són els substrats i NADPH el donador d'electrons [21] (Figura 3).

Aquestes reaccions s'agrupen en tres fases:

La **condensació** del malonil-CoA i l'acetil-CoA que es produeix a l'inici de la reacció, i està catalitzada per la MAT.

L'**elongació**, el cicle repetit de reducció i rehidratació, per afegir dos carbonis a cada cicle de l'elongació de la cadena de l'àcid gras, aquestes reaccions són catalitzades per KS, DH, ER i KR.

La **terminació**, o alliberació del palmitat de l'ACP, reacció és catalitzada per TE. Per tant la síntesi d' 1 palmitat consumeix: 1 acetil-CoA, 7 malonil-CoA, 7 adenosines trifosfat (ATP) i 14 NADPH [20].

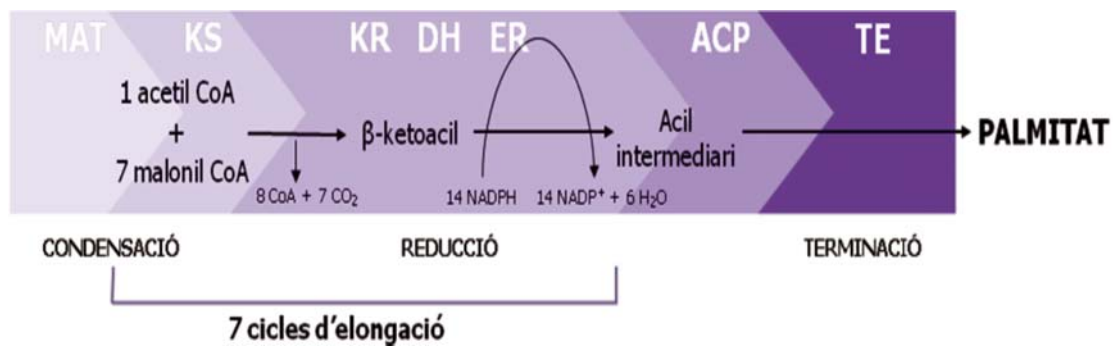


Figura 3. Síntesi d'àcids grassos. En cèl·lules de mamífers, FASN és l'enzim principal de la síntesi dels àcids grassos de cadena llarga. La síntesi d'àcids grassos és un procés que inclou trenta-dues reaccions catalitzades per l'activitat coordinada dels set dominis de FASN, el producte final és un àcid gras de 16 carbonis, el palmitat. Primer de tot el malonil-CoA i l'acetil-CoA es condensen per l'acció de la malonil-CoA acetil transferasa (MAT). El resultat és el β-ketoacil que serà reduït mitjançant els dominis de la β-ketoacil reductasa (KR), la β-hidroxiacil deshidratasa (DH) i l'enoil reductasa (ER) a un acil intermediari saturat. Aquest procés es repeteix en set cicles. A partir del segon cicle la cadena d'acil s'uneix al malonil-CoA a través del domini de la ketoacil sintasa (KS) en comptes del domini MAT. El palmitat és alliberat pel domini de la tioesterasa (TE). El consum net de la reacció és: 1 acil-CoA, 7 malonils-CoA i 14 NADPH i, el resultat 1 molècula de àcid palmític, 7 de CO₂, 8 CoAs, 14 NADP⁺ i 6 molècules de H₂O.

2.- Regulació de FASN

Cèl·lules normals

FASN s'expressa principalment: i) en teixits lipogènics: com el fetge o el teixit adipós, ii) en cèl·lules sensibles a les hormones: com glàndules mamàries, endometri, vesícules seminals, etc., iii) en diferents tipus de cèl·lules especialitzades: com les cèl·lules alveolars tipus II, l'hipotàlem per controlar la ingesta d'aliments, iv) en cèl·lules fetals en proliferació.

La síntesi *de novo* d'àcids grassos en adults es realitza en les següents situacions: i) per emmagatzemar l'excés d'energia en forma de TAGs degut a la ingesta de carbohidrats, ii) en dietes pobres en greixos per sintetitzar-ne a partir d'altres substrats com carbohidrats o proteïnes, iii) en teixits o situacions especials com per exemple en la síntesi d'àcids grassos de cadena mitjana en la lactància.

Tenint en compte aquestes funcions, el paper de FASN en una població ben

alimentada, no és de gran importància ja que els lípids de la dieta cobreixen els requisits per mantenir l'homeòstasi [22].

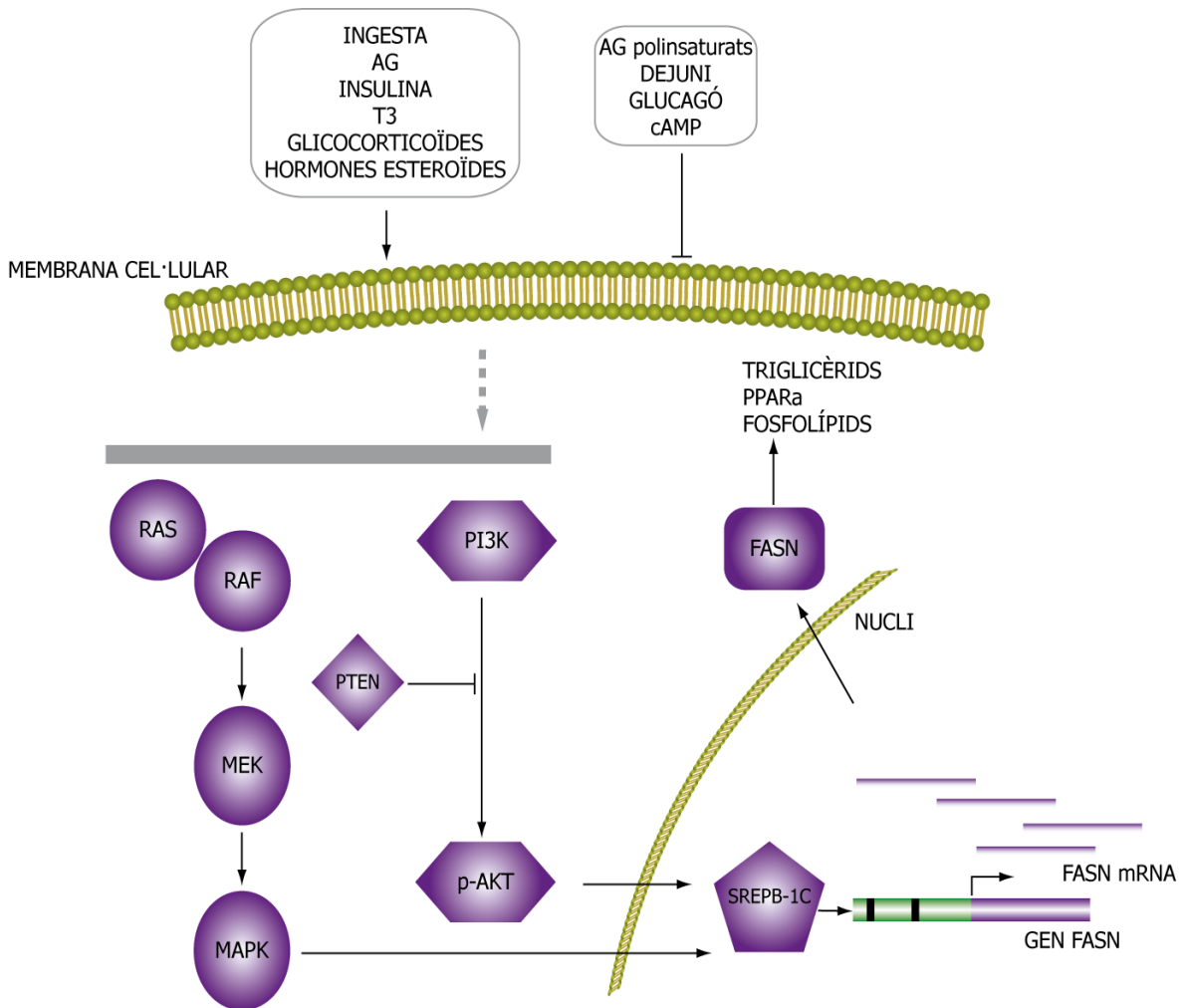


Figura 4. Regulació de FASN en les cèl·lules normals. L'expressió de FASN en cèl·lules normals depèn en bona part de l'estat nutricional i hormonal. La transcripció de FASN augmenta per la ingesta d'aliments, els àcids grassos o hormones (on s'inclou la insulina, la triiodotironina (T3), els glucocorticoides i les hormones sexuals) i disminueix pels AG poliinsaturats, el monofosfat cíclic d'adenosina (cAMP) o pel dejuni (glucagó). Aquest estímul a la superfície de les cèl·lules permet activar diferents cascades, com les vies de la PI3K-AKT o la MAPK(ERK1/2), que finalment modulen l'expressió i maduració de la SREBP1, anomenat SREBP1c. La forma activa de la SREBP1c va al nucli on es podrà unir als elements del promotor de FASN. Modificada de *Puig T and Relat J 2010*.

En les cèl·lules normals FASN es troba poc expressada i la regulació depèn majoritàriament dels factors nutricionals i hormonals. Molts factors de transcripció estan implicats en mantenir aquesta regulació com factors estimulants (USF), el factor

nuclear Y (NF-Y), la proteïna estimuladora (SP1) i sobretot les proteïnes d'unió a elements reguladors d'esterols (SREBPs) [23, 24] (Figura 4). S'ha observat que el promotor de FASN podria organitzar-se en dos segments; un reprimiria l'activació de FASN i interferiria en el reclutament de factors de transcripció del segon segment del promotor [25]. Així doncs podríem dir que FASN s'activa per l'estat nutricional i la seva expressió està regulada per vies de senyalització com la fosfatidil inositol 3 cinasa/proteïna cinasa B (PI3K/AKT) i la proteïna mitògena cinasa activada/cinasa extracel·lular reguladora de senyals (MAPK/ERK1/2), vies que modulen l'expressió i l'estat de maduració de SREBP-1, per produir l'últim element que participa en totes aquestes cascades el SREBP-1c, que entra el nucli i es pot unir al promotor de FASN [26] (Figura 4).

Cèl·lules tumorals

L'expressió de FASN es troba disminuïda en la majoria de teixits humans i només s'eleva en situacions on cal la síntesi *de novo* d'àcids grassos. Les cèl·lules tumorals es caracteritzen per tenir un increment de la glucòlisi, això comporta tenir una activació dels enzims glucolítics [8], i també un alt nivell de síntesi d'àcids grassos que es correlaciona amb una sobreexpressió i hiperactivitat dels enzims lipogènics com ara FASN.

Les cèl·lules tumorals altament proliferants requereixen un subministrament constant de lípids, per tot això cal que augmenti el catabolisme de la glucosa produint grans quantitats de piruvat que s'utilitza per la síntesi d'aquests àcids grassos [27, 28].

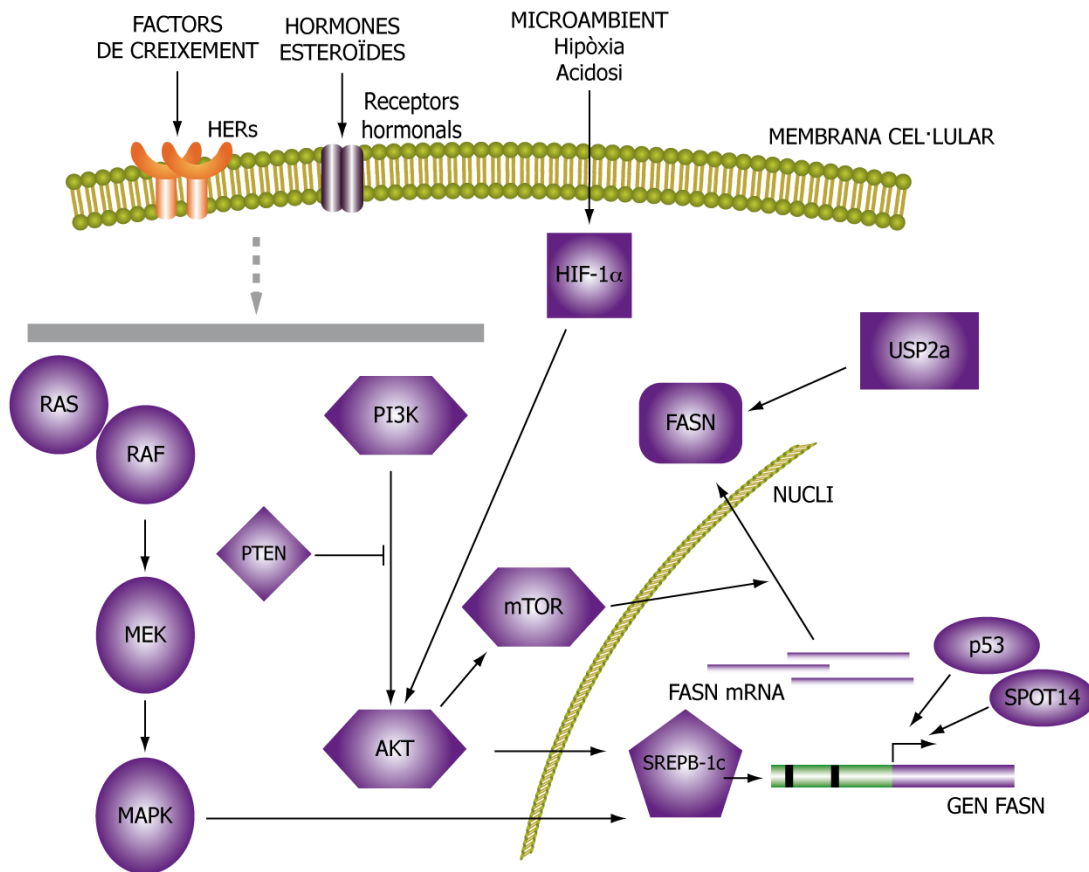


Figura 5. Regulació de FASN en cèl·lules tumorals. En càncer FASN no és sensible a l'estat nutricional. A la superfície de les cèl·lules tumorals, els factors de creixement (GF), les hormones esteroides (esterols, andrògens, progesterona) a través dels seus receptors (GFR/SHR, RE, RA,RP) inhibeixen l'activació de les vies PI3K-AKT i de MAPK/ERK1/2, que són (com en les cèl·lules normals) les que modulen l'expressió i la maduració de la proteïna 1c que s'uneix a elements reguladors d'esterol (SREBP1c). Els efectes que produeixen GF/GFR a FASN són complexes i impliquen l'activació o interferència de moltes vies de transducció de senyals que acaben afavorint la unió de SREBP1c amb els elements de resposta de la regió promotora de FASN. En les cèl·lules cancerígenes l'expressió de FASN també és activada pel microambient tumoral (hipòxia i acidosis) a través de la sobreexpressió HIF-1 α , que provoca la fosforilació d'AKT. Hi ha altres proteïnes com p53 o SPOT14 (proteïna nuclear implicada en la regulació dels gens necessaris per a la síntesi d'àcids grassos en les cèl·lules normals i en cèl·lules malignes epitelials i de teixit adipós de mama) que poden augmentar la transcripció de FASN. En cèl·lules tumorals FASN pot estar sobreexpressada pels nivells proteics. La proteïna mTOR millora la traducció de FASN mitjançant un mecanisme dependent d'AKT. La sobreexpressió de FASN també es pot donar a nivell post-traduccional amb la interacció de la proteïna preproteosomal específica d'ubiquitina, USP2a, que treu una ubiquitina de FASN donant molta estabilitat a l'enzim. Cal dir que tots aquests diferents mecanismes es poden donar de forma simultània en les cèl·lules tumorals. Modificada de Puig T and Relat J 2010.

S'han proposat diferents mecanismes de la sobreexpressió de FASN en cèl·lules tumorals, tot i que encara no estan del tot ben entesos (Figura 5):

i) A nivell transcripcional la sobreexpressió de FASN ve provocada principalment per factors de creixement com el factor de creixement epidèrmic (EGF) i els receptors

dels factors de creixement epidèrmic humà (com HER1 i HER2) i també per les hormones esteroides (estrogen i progesterona). Els efectes són complexes i involucren l'activació i encreuament de múltiples vies de transducció de senyals. Per exemple les vies de PI3K-AKT i les ERK1/2 que modifiquen l'expressió i maduració del factor de transcripció SREBP1c el qual va al nucli i augmenta la transcripció de FASN. Per tant, els inhibidors de PI3K i ERK1/2 disminueixen l'activitat de SREBP1c i en conseqüència fan que disminueixi la transcripció de FASN, això repercuteix en la reducció de la lipogènesi en cèl·lules cancerígenes [29]. A part dels factors de creixement i les hormones esteroides hi ha altres estímuls externs que poden augmentar l'expressió de FASN. El microambient del tumor, la hipòxia i el pH baix, també juguen un paper molt important en la sobreexpressió de FASN i la progressió de la malaltia. En aquest context hostil moltes vies de senyalització intracel·lulars s'activen com el factor 1α induïble d'hipòxia (HIF- 1α) que fa augmentar els nivells de SREBP1c a través de la fosforilació d'AKT [30].

ii) La sobreexpressió de FASN també es pot aconseguir a nivell de la post-traducció mitjançant la interacció amb la proteïna preproteosomal 2a específica d'ubiquitina (USP2a) que, mitjançant l'eliminació de la ubiquitina de FASN, dona una forta estabilitat a l'enzim [9].

iii) La sobreexpressió de FASN a nivell d'amplificació gènica. El gen de FASN es troba a la regió 17q22-17q24 [31]. En cèl·lules cancerígenes s'ha vist que aquesta regió es propensa a ser amplificada. En adenocarcinoma de pròstata s'ha observat, mitjançant tècniques d'immunohistoquímica (IHQ) i hibridació fluorescent *in situ* (FISH) en teixit en parafina, un increment de la funció de FASN que es correlaciona amb un increment de l'expressió proteica [32].

iv) Els nivells proteics de FASN també poden estar relacionats amb la proteïna de mamífers diana de la rapamicina (mTOR), la qual és una proteïna serina-treonina cinasa que participa en la regulació de la síntesi proteica. La regulació d'HER2 sobre FASN i ACC podria tenir lloc a través de mecanismes depenent de PI3K/AKT o mTOR [33].

Cal assenyalar que aquestes vies de regulació de FASN, en cèl·lules tumorals, poden tenir lloc al mateix temps [26].

3.- FASN i càncer

Hanahan i Weiberg en el seu primer treball [34], definien les sis característiques diferencials que ha de tenir una cèl·lula per esdevenir tumoral. Recentment en el seu nou treball *Hallmarks of cancer: the next generation* [3], afegixen dues característiques diferencials que tenen les cèl·lules tumorals respecte les normals; una es poder evitar la destrucció del sistema immune i l'altra es la desregulació del metabolisme energètic. Otto Warburg va observar per primera vegada un comportament anòmal en el metabolisme energètic del càncer. Les cèl·lules canceroses poden reprogramar el metabolisme de la glucosa, i per tant la seva producció d'energia, limitant el seu metabolisme energètic en gran part a la glicòlisi, donant lloc a un estat que s'ha denominat "glucòlisi aeròbica" [8].

Els canvis lipogènics i glucolítics que es produeixen en les cèl·lules tumorals els hi confereixen una major malignitat [9]. Quan comença a augmentar el nombre de cèl·lules malignes llavors apareixen regions amb hipòxia a l'interior del tumor [35]. El tumor encara no es troba vascularitzat i les cèl·lules internes que no reben prou oxigen canvien el seu metabolisme realitzant la glucòlisi aeròbica (*efecte Warburg*, pàgina 3). En aquest context de poc oxigen i sense nutrients les cèl·lules malignes volen

progressar, només podran les que tinguin una activitat constitutiva de FASN ja que seran metabòlicament autònomes [9]. Així podem dir que alts nivells de FASN donen avantatges a les cèl·lules tumorals.

S'ha demostrat que l'expressió i l'activitat de FASN és un fenotip comú en moltes cèl·lules tumorals. Molts estudis troben una relació entre l'expressió de FASN i el pronòstic del càncer. En càncer de mama i pròstata hi ha diversos estudis que demostren l'associació entre l'expressió de FASN i el mal pronòstic de la malaltia [36, 37]. També s'ha trobat una relació entre l'expressió de FASN i HER2 en tumors de mal pronòstic [38]. L'expressió diferencial de FASN entre cèl·lules normals i tumorals, els valors elevats de l'expressió de l'enzim en la majoria de tumors sòlids recurrents i la seva relació amb un mal pronòstic avalen el paper de FASN com a potencial diana terapèutica pel tractament del càncer [39]. I en concret del càncer de mama ja que s'ha observat que en estadi I de càncer de mama els valors elevats d'expressió de FASN en teixit tumoral comporten un risc quatre vegades més gran de morir per la malaltia que els valors baixos [36].

Inhibició de FASN

La inhibició de FASN afecta a diferents mecanismes cel·lulars tal i com es resumeix en la revisió de Menéndez i Lupu [9].

FASN té un paper molt important en la síntesi de fosfolípids de membrana que són necessaris per la proliferació de cèl·lules tumorals. Inhibint FASN es produeix una inanició de la fosfatidilcolina, fosfolípid molt important en la membrana cel·lular. Per tant la manca d'aquest fosfolípid a causa de la inhibició de FASN, seria similar a la inhibició de la colina cinasa, enzim que catalitza la síntesi *de novo* de fosfatidilcolina, i indueix selectivament la mort cel·lular en cèl·lules tumorals [40].

Alteració en la funció de membrana: la inhibició de FASN, mitjançant la inducció de canvis en la síntesi de fosfolípids de la membrana i microdominis de glicolipo-proteïnes (lípid rafts), pot afectar la correcta localització i/o funcionament dels receptors de tirosina cinasa com el receptor del factor de creixement epidèrmic, HER, en la membrana cel·lular de les cèl·lules tumorals [41, 42].

Inhibició de la replicació del DNA. La biosíntesi de fosfolípids és més gran durant les fases G1 i S del cicle cel·lular. El bloqueig de FASN produeix un inhibició de la replicació del DNA, es bloqueja el cicle abans de G1 a través d'un mecanisme molecular que pot implicar, entre altres, els inhibidors de cinases dependents de ciclina com les proteïnes p21 i p27, BRCA1, la proteïna cinasa associada a la fase S (Skp2) i el factor nuclear kappa B (NFkB) [43, 44].

p53 regula l'estrès metabòlic no genotòxic. Després d'inhibir FASN depèn de l'estat del p53 que les cèl·lules siguin apoptòtiques o que aturin el creixement cel·lular (resposta citostàtica). Els inhibidors de FASN són més eficaços per iniciar l'apoptosi en les cèl·lules tumorals amb p53 no funcional, mentre que les cèl·lules amb la funció de p53 intacte tendeixen a mostrar respostes citostàtiques [45, 46].

Acumulació tòxica de malonil-CoA: a l'inhibir FASN hi ha una acumulació del seu substrat això fa que s'inhibeixi la CPT1 que regula la β -oxidació dels àcids grassos. Provocant una acumulació de ceramida (esfingolípid de membrana) que indueix a la pro-apoptosi als gens involucrats a la ruta apoptòtica regulada per la ceramida [47].

Inhibició de proteïnes antiapoptòtiques. Inhibint FASN hi ha una desregulació de la via de senyalització d'AKT, que precedeix a la inducció de l'apoptosi de cèl·lules tumorals *in vitro* i *in vivo*, el que suggereix un mecanisme potencial d'inhibició de FASN relacionat amb la mort cel·lular [48].

Inhibidors de FASN

El primer compost inhibidor de l'activitat de FASN amb efectes citotòxics en cèl·lules tumorals i en models animals conegut des de els anys 1960 fou la cerulenina, un producte natural (Figura 6) del fong *Cephalosporium ceruleans* [49]. La cerulenina bloqueja l'activitat del domini β -ketoacil de FASN evitant així la condensació entre l'acil intermediari i el maloil-CoA [50]. Degut a que aquest compost presentava inestabilitat química en medi fisiològic a causa de la presència d'un grup epoxi i, a més, una baixa disponibilitat sistèmica, es van desenvolupar dues molècules sintètiques derivades de la cerulenina, el C75 i el C93 [10, 51].

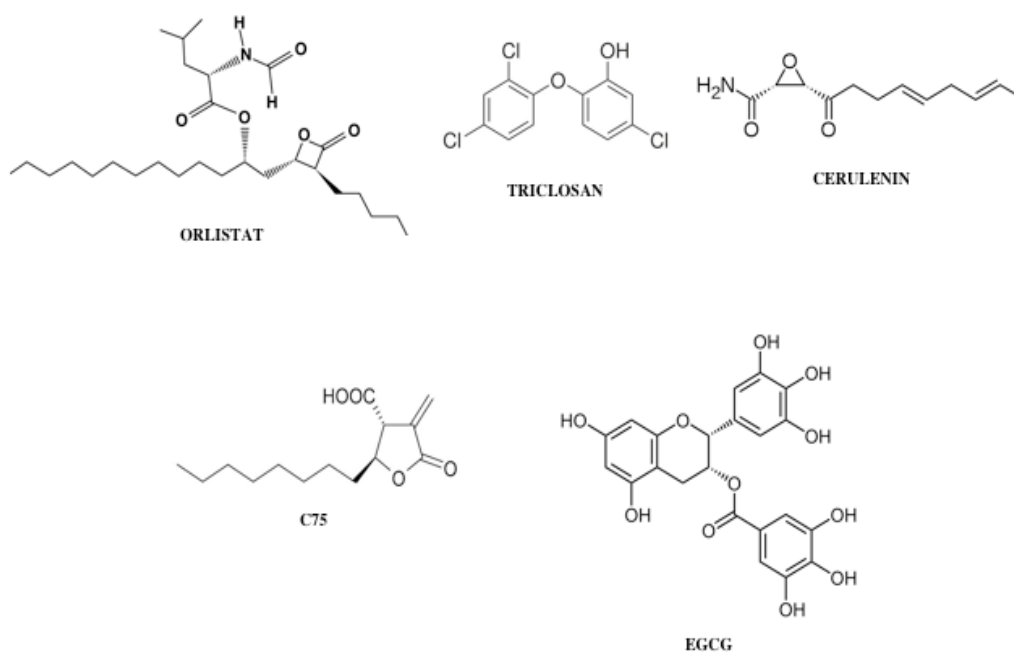


Figura 6. Estructura química dels inhibidors més coneguts de FASN.

Altres inhibidors farmacològics de FASN són la β -lactona orlistat i l'antibiòtic triclosan (Taula 1 i Figura 6).

Un altre derivat de la cerulenina és el C75 (alfa-metilè-gamma-butirolactona) que presenta la mateixa capacitat antitumoral tant *in vitro* com *in vivo*. Aquest compost és

molt més estable químicament que la cerulenina perquè no té el grup epoxi que li donava la inestabilitat. Tot i que el C75 va aportar la primera evidència *in vivo* de la reducció tumoral mitjançant la inhibició de FASN, el tractament va haver de ser suspès degut a la pèrdua de pes i els efectes anorèxics que patien els animals [52]. Estudiant el mecanisme d'acció del C75, tant nosaltres com altres grups d'investigació, hem vist que a part d'inhibir FASN el C75 també estimula la CPT1 i a conseqüència activa l'oxidació dels àcids grassos (Figura 1) [53] i *in vivo* produeix una pèrdua de pes d'un 20% a les 24 hores després del tractament dels ratolins amb C75 [54].

Posteriorment, es va sintetitzar el C93 un anàleg del C75 però que no provocava anorèxia, ja que no estimulava la CPT1 i per tant no activava l'oxidació dels àcids grassos. Hi ha dades preclíniques publicades de l'ús del C93 pel tractament de càncer de pulmó i la prevenció del seu desenvolupament [55, 56].

Els polifenols constitueixen un grup ampli de diferents estructures moleculars que inclouen les catequines, els flavoids i els tanins, entre altres. Aquests compostos podrien tenir efectes beneficiosos sobre la salut a través de les seves accions biològiques. Alguns polifenols del te són capaços de controlar el pes corporal, inhibir el creixement de cèl·lules canceroses, disminuir l'acumulació de greix al fetge i a la sang i actuar com a antioxidants. Ho fan mitjançant diferents mecanismes com ara la inducció de l'apoptosi, l'estimulació del metabolisme lipídic, la inhibició de les lipases, la regulació de la termogènesi, el control de la ingesta d'aliments i la inhibició de FASN [57-61]. Tenint en compte totes aquestes peculiaritats dels polifenols, una de les més interessants en el camp de l'oncologia seria l'habilitat per inhibir la síntesi *de novo* d'àcids grassos.

EGCG

El (-)-3-galat d'epigalocatequina (EGCG) és la catequina polifenòlica més abundant en el te verd i és la més activa com a compost antitumoral. El nostre grup de recerca ha demostrat que l'EGCG inhibeix l'activitat de FASN i indueix l'apoptosi en vèries cèl·lules tumorals humanes [62, 63].

Taula 1. Inhibidors de FASN.

COMPOST	DOMINI FASN INHIBIT	ACTUACIÓ
CERULENINA	KS	evitar la condensació entre el compost intermediari acil CoA i Malonil CoA [50]
C75	KS	imitar el malonil CoA a més d'estimular l'oxidació dels àcids grassos (CPT1) provocant anorèxia [52, 53]
C93	KS	imitar el malonil CoA sense estimular CPT1, no provocant anorèxia [55]
ORLISTAT	TE	bloquejar l'alliberament del palmitat [66]
TRICLOSAN	ER	augmentar la concentració d'intermediari de FASN [67]
POLIFENOLS (catequines, flavoids, tanins)	ACP, KR i KS	bloquejar l'activitat d'aquests dominis de manera reversible o irreversible [61]
EGCG	KR	competir amb el NADPH pel mateix lloc d'unió [68]

També s'ha observat que l'EGCG té efectes comparables al C75, en la capacitat d'inhibir l'activitat de FASN, la inducció de l'apoptosi en les cèl·lules tumorals, la inhibició de la proliferació cel·lular i el bloqueig de l'activitat de l'oncogèn HER2 i les rutes de transducció de senyal PI3K/AKT i MAPK. Però la diferència entre el C75 i

l'EGCG està en què aquest últim és un inhibidor més específic de FASN ja que no afecta l'activitat de la CPT1, per tant no es veu afectada l'oxidació dels àcids grassos i el tractament amb EGCG no provoca pèrdua de pes [64, 65] (Figura 1). Però tot i aquesta especificitat l'EGCG presenta dos característiques que poden limitar el seu us terapèutic: l'elevada dosi d'administració per tenir activitat antitumoral (elevada IC_{50}) i la baixa estabilitat química en condicions fisiològiques.

Nous compostos derivats de l'EGCG

Basant-nos amb les dades experimentals generades pel nostre grup de recerca entorn a l'EGCG, ens vam centrar en la síntesi d'una sèrie de nous compostos inhibidors de FASN relacionats estructuralment amb l'EGCG, amb una potent activitat antitumoral sense afectar l'oxidació dels àcids grassos ni la pèrdua de pes i a més estables químicament. El nostre grup de recerca en col·laboració amb el grup de Química Mèdica de la Professora María Luz López-Rodríguez de la Universidad Complutense de Madrid, hem dissenyat i sintetitzat una nova sèrie de derivats polifenòlics relacionats amb l'EGCG [69]. Aquests compostos s'han sintetitzat mitjançant processos químics estàndards a partir de l'àcid gàl·lic convenientment protegit, tal com es descriu a la Figura 7, on hi ha la síntesi dels compostos de l'1 al 8 i del 9 al 16. Les dades espectroscòpiques dels compostos sintetitzats van ser consistents amb les estructures proposades.

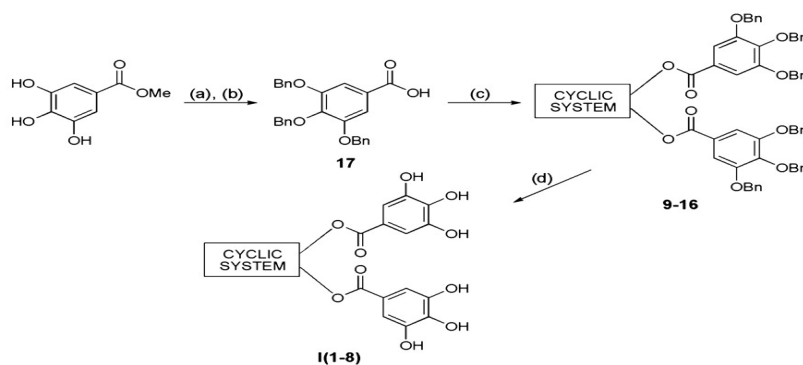


Figura 7. Ruta sintètica general per a la síntesi de nous compostos polifenòlics. Reactius i condicions, (a) PhCH_2Cl , K_2CO_3 , DMF; (b) NaOH, MeOH, H_2O ; (c) Diol cíclic, DCC, DMAP, THF; (d) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, EtOH, CH_2Cl_2 . Puig T et al. *Clin Cancer Res* 2009;15:7608-7615

Tenint en compte tots els resultats obtinguts amb els derivats de galoiol d'estructura general, avaluats fins al moment [70], es va considerar l'ampliació del camp estructural de les diferents subunitats dels nous compostos de fórmula I. Es va realitzar la síntesi dels nous compostos de fórmula I mitjançant un programa químic de llibreries enfocades. En la Figura 8 es descriu la ruta sintètica posada a punt pels compostos sintetitzats. Consistia en una primera etapa de condensació entre el compost dihidroxil que conté el sistema cíclic i dos equivalents de l'àcid o d'àcid adequat, els hidroxils dels quals es van protegir prèviament amb grups benzil, terc-butidimetilsilil, etc. En el cas dels compostos no simètrics, es van realitzar dues etapes successives de condensació del diol amb cadascun dels corresponents àcids o derivats de l'àcid. L'últim pas fou la desprotecció dels grups hidroxils presents en la molècula.

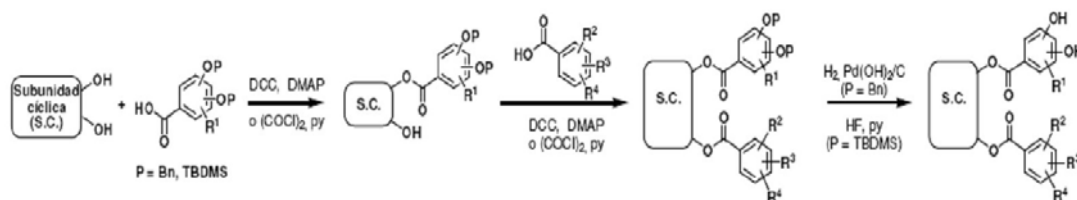


Figura 8. Esquema de la síntesi dels nous compostos de fórmula I

Càncer

El diccionari de l' Institut d'Estudis Catalans defineix **càncer** com un creixement tumoral dels teixits, de caràcter maligne i pertorbador de les funcions biològiques normals. El creixement tumoral és quan una massa de teixit anormal creix i persisteix independentment dels teixits que l'envolten.

El càncer és el terme que s'utilitza per englobar un conjunt de malalties on un grup de cèl·lules desenvolupen un creixement descontrolat, dividint-se més enllà dels límits normals, envaint i destruint els teixits adjacents i a vegades estenent-se a altres punts del cos a través de la limfa o la sang, procés anomenat metàstasi.

Recentment en un treball de Hanahan i Weinberg [3] que completa el que van fer ells mateixos l'any 2000 expliquen els deu "hallmarks", característiques diferencials, que ha de tenir una cèl·lula per esdevenir tumoral (Figura 9). En el seu primer treball [34] definien les sis característiques biològiques que han d'adquirir les cèl·lules per esdevenir tumorals, serien: **el manteniment del senyal de proliferació, l'evasió dels supressors de creixement, la resistència a la mort cel·lular** i això els permetria adquirir les capacitats de: **la immortalitat replicativa, la inducció a l'angiogènesi i l'activació d'invasió i metàstasi**. En el seu darrer treball (Hanahan and Weinberg 2011) expliquen que és degut a la **inestabilitat del genoma** que les cèl·lules tumorals poden adquirir totes aquestes capacitats i al **sistema inflamatori** que ho potencia. També afegixen dues característiques emergents com són la **desregulació del metabolisme energètic** i el fet **d'evitar la destrucció del sistema immune**. El microambient tumoral afavoreix totes aquestes característiques diferencials o "hallmarks".

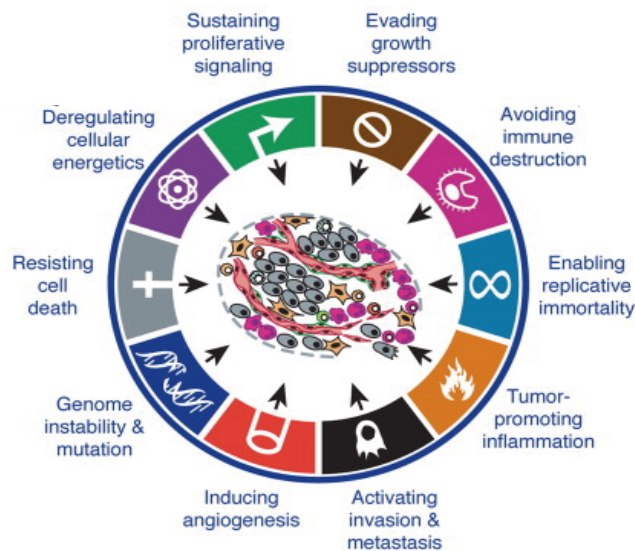


Figura 9. Avantatges biològics que han d'adquirir les cèl·lules tumorals per poder formar un tumor i metastasiar. Modificada de *Hanahan and Weinberg, Cell 2011*

1.- Càncer de mama

El càncer de mama és el tumor maligne que s'origina en el teixit mamari. Quan les cèl·lules tumorals procedeixen del teixit glandular de la mama i tenen capacitat d'envair els teixits sans del voltant i, d'arribar a òrgans allunyats per implantar-s'hi, parlem de càncer de mama (www.aecc.es).

A Espanya es diagnostiquen uns 22.000 casos de càncer de mama a l'any, el que representa gairebé el 30% de tots els tumors malignes del sexe femení. La majoria dels casos es diagnostiquen entre els 35 i els 80 anys, amb un pic entre els 45 i els 65. Tant el nombre de casos com les taxes d'incidència augmenten lentament a Espanya i al món, probablement a causa de l'envelliment de la població i a un diagnòstic cada vegada més precoç. L'augment de la incidència es troba entre un 1-2% anual i és constant des de 1960 als Estats Units. S'estima que el risc de patir càncer de mama és de, aproximadament, 1 de cada 8 dones (www.aecc.es).

A Espanya hi ha una distribució geogràfica d'incidència notablement variable segons les províncies. Així a Girona la incidència és de 95,5 casos/100.000 dones

(període 2000-2004), mentre que a Espanya es situa en 83,8 casos/100.000 dones en el mateix període [71].

El càncer de mama és el més freqüent en les dones a Catalunya, amb aproximadament 4879 casos l'any 2008, la qual cosa suposa gairebé el 30% de tots els tumors diagnosticats en dones. La incidència d'aquest càncer augmenta en un 2,5% anual, bàsicament entre les dones més grans; mentre que en les dones més joves, per sota dels 45 anys, la tendència és a estabilitzar-se o, fins i tot, a disminuir. Al contrari l'evolució de la mortalitat, mostra una disminució significativa, a partir de principi dels anys 90. La taxa ajustada de mortalitat va ser de 17,8 per 100.000 dones (any 1985), de 18,8 (any 1995) i ha baixat fins a 15,3 (any 2004). A Catalunya, el càncer de mama, en el període del 1995 al 1999 presentava una supervivència del 81% al cap de 5 anys, una mica superior a la mitjana europea que, en el mateix període observat, és del 79%. Les causes d'aquesta millora són el progrés en el diagnòstic en etapes precoces de la malaltia, el cribatge mitjançant la mamografia i les millores en els tractaments [72].

Així doncs el càncer de mama es considera un problema de salut pública molt important, tant per la seva alta incidència com per la mortalitat que ocasiona. A més de ser la primera causa de càncer en dones entre 35 i 45 anys. És per tot això que cal obrir noves possibilitats en la detecció, el tractament i les dianes terapèutiques del càncer de mama.

Estructura de la mama

Un conjunt de quinze a vint lòbuls mamaris conformen la glàndula mamària o mama, cadascun amb el seu aparell excretor, que s'obre al mugró per mitjà d'un conducte lactífer. Els lòbuls mamaris estan constituïts per nombrosos lobels que es

troben units entre si per teixit connectiu, vasos sanguinis i pel seu sistema excretor, els conductes lactífers. Els lòbuls i els conductes mamaris es troben immersos en el teixit adipós i en el teixit conjuntiu que juntament amb el teixit limfàtic formen la mama. La pell recobreix i protegeix tota l'estructura mamària i com a mur de contenció hi ha el múscle pectoral que es troba entre les costelles i el pit (Figura 10). Els conductes i lobels estan entapissats per dos tipus de cèl·lules: les cèl·lules mioepitelials contràctils i amb miofilaments que es troben en forma de xarxa sobre la membrana basal, són les que ajuden a l'excreció de la llet durant la lactància i proporcionen el suport estructural als lobels, i les cèl·lules epitelials luminals que es sobreposen a les mioepitelials. Només les cèl·lules luminals lobulillars són capaces de produir llet [73]. En la regeneració de l'epiteli mamari adult una sola cèl·lula mare en el conducte terminal pot donar lloc tant a cèl·lules luminals com mioepitelials [74]. La mama també conté vasos sanguinis que són els que proporcionen la irrigació sanguínia a la glàndula i vasos limfàtics que recullen la limfa. Els vasos limfàtics conflueixen en petites formacions arrodonides denominades ganglis limfàtics. Els ganglis limfàtics més propers a la mama es troben a l'axil·la i banda i banda de l'estèrnum. Des del naixement fins a l'edat adulta, les mames són els òrgans que pateixen més canvis. Sota la influència de les hormones femenines, estrògens i progesterona, les mames creixent durant la pubertat i es veuen influenciades en l'edat reproductiva pels cicles menstruals. En la menopausa els nivells hormonals baixen i gran part de la glàndula mamària s'atrofia i és substituïda per grassa (www.aecc.es).

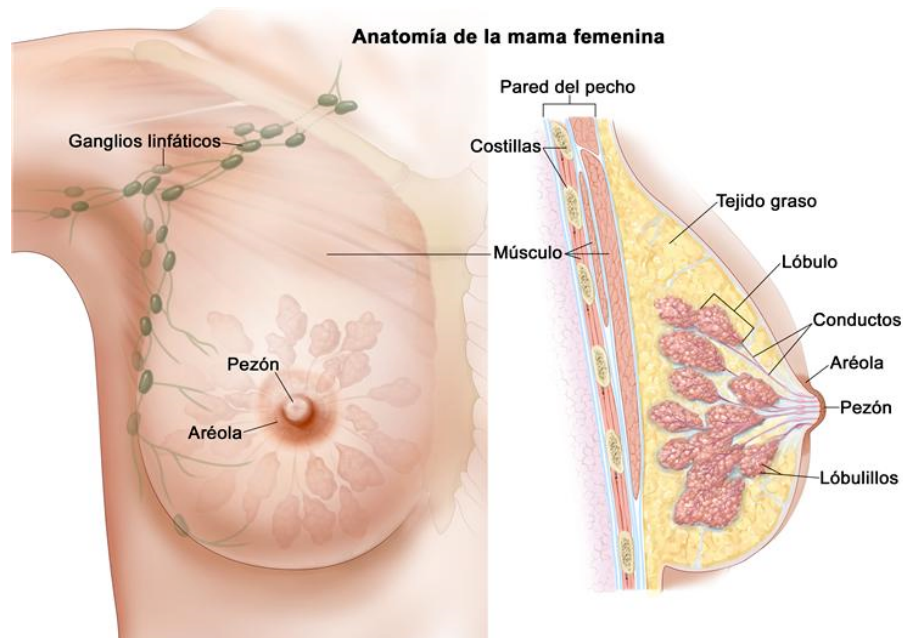


Figura 10. Anatomía de la mama femenina. Es mostra el mugró i l'arèola a l'exterior de la mama. També els ganglis limfàtics, els lòbuls, els lobels, els conductes i altres parts de l'interior de la mama. *National Cancer Institute*

2.- Classificació dels tumors de mama

Tipus de càncer de mama

De tumors malignes de mama n'hi han de varis tipus; en funció del lloc de la mama on s'hagi produït el creixement anormal de les cèl·lules i segons l'estadi en què es trobin. El tumor pot ser ben localitzat o pot ser que s'hagi estès a través dels vasos sanguinis o limfàtics, donant a lloc a una metàstasi, és a dir a un creixement neoplàsic en un òrgan distant a l'originari. Més del 65% de les neoplàsies de mama són adenocarcinomes, dividits en carcinomes *in situ* (lesions preinvasives) i carcinomes invasius.

Lesions preinvasives:

Són els carcinomes *in situ* una proliferació neoplàsica limitada en els conductes i lòbuls per la membrana basal. El carcinoma *in situ* es classificava en ductal o lobulillar segons la semblança amb les cèl·lules on s'originava, els conductes o els lòbuls. Però

ara s'ha vist que els patrons de creixement *in situ* no tenen relació amb el lloc ni amb la cèl·lula d'origen, sinó amb les diferències biològiques de les cèl·lules tumorals com l'expressió o no de la proteïna E-cadherina [73].

Carcinoma ductal *in situ* es tracta d'una lesió limitada a l'interior del conducte mamari que no ha trencat la membrana basal del mateix i per tant no ha envaït el teixit adjacent i no té capacitat metastàsica. Per això es considera una lesió premaligna que cal tractar ja que amb el temps podria esdevenir invasiva.

Carcinoma lobulillar *in situ* són els tumors que tenen la peculiaritat que les seves cèl·lules no expressen la proteïna E-cadherina i això els hi confereix una morfologia peculiar. És un tumor freqüent abans de la menopausa i si es detecta requereix controls periòdics per vigilar la possible transformació i evolució del càncer.

Lesions invasives:

És el carcinoma invasiu o infiltrant, el que ha penetrat a l'estroma a través de la membrana basal. En aquest cas les cèl·lules tumorals poden envair la vascularització i arribar als ganglis limfàtics regionals i a altres regions més distants.

Carcinoma ductal infiltrant és el carcinoma invasiu que no pertany a cap tipus especial. S'inicia en el conducte mamari però aconsegueix travessar-lo i passar a l'estroma adjacent de la mama, d'aquesta manera pot accedir als vasos limfàtics i sanguinis i així estendre's a altres parts del cos. És dels carcinomes de mama més freqüents, es dona en un 80% dels casos. Si es detecta a temps pot ser tractat efectivament.

Carcinoma lobulillar infiltrant (o invasiu) es caracteritza histològicament per la presència de cèl·lules tumorals infiltrants no cohesives i disposades en files o grupets. Aquest tipus de càncer representa un 10% dels càncers de mama invasius.

Carcinoma medul·lar. És un tipus de càncer invasiu molt estrany, caracteritzat per la presència de cèl·lules cancerígenes allargades i de forma anormal. La prognosi és bona sempre que es detecti a temps.

Carcinoma tubular. També és un tipus de càncer poc freqüent i estrany es caracteritza per la presència de cèl·lules tumorals de forma tubular, està relacionat amb una prognosi excel·lent.

Carcinoma mucinós o col·loide. És poc habitual, pertany al grup de tumors secretors i representa entre un 1,5-2% dels tumors mamaris. És freqüent en dones d'edat més avançada i tendeix créixer amb lentitud al llarg del temps

Carcinoma papil·lar i micropapil·lar. Són tumors molt poc freqüents representen menys d'1% dels càncers invasius. El component infiltrant està constituït per formacions micropapil·lars i níus epitelials situats a l'interior d'espais separats per un estroma de teixit conjuntiu. El carcinoma papil·lar té un pronòstic més favorable que el micropapil·lar que sol ser molt més agressiu.

Carcinoma metaplàsic. Aquest tipus de carcinoma engloba una varietat de càncer de mama de tipus rars com poden ser els carcinomes escamosos, carcinomes amb component fusocel·lular prominent. Solen ser carcinomes amb pronòstic desfavorable.

Carcinoma inflamatori és una variant clínica de càncer poc comú, representa només un 1% del total dels tumors cancerígens de mama. És molt agressiu, presenta un gran potencial de disseminació i, és de creixement ràpid. És causat per l'obstrucció de les cèl·lules cancerígenes en els vasos limfàtics del pit, per això es caracteritza per l'aparició de signes d'aspecte inflamatori a la mama.

Tumors estromals

Els dos tipus d'estroma de la mama, intra i interlobulillar, donen lloc a dos tipus diferents de neoplàsies. L'estroma intralobulillar molt especialitzat pot elaborar factors de creixement per les cèl·lules epitelials això provoca la proliferació del component epitelial no neoplàsic. Exemples d'aquests tumors són el fibroadenoma i el tumor fil·loides que són de comportament benigne. Els tumors de l'estroma interlobulillar de la mama es componen de cèl·lules estromals sense un component epitelial, exemples d'aquest tipus de tumor serien el lipoma, el miofibroblastoma entre d'altres, tractant-se de lesions benignes. Els tumors estromals malignes inclouen els sarcomes [73].

3.- Factors pronòstic

Hi ha molt factors a estudiar per determinar l'evolució del tumor de mama. A l'hora de fer un diagnòstic en càncer de mama és molt important determinar: si els ganglis del voltant de la mama estan afectats, la mida del tumor, la taxa de proliferació, així com l'estat dels receptors hormonals i de l'HER2, entre d'altres.

Grau histològic

Un dels sistemes més usats per la gradació dels tumors és la "Nottingham Histologic Score" que combina el grau nuclear, la formació de túbuls i la taxa mitòtica i així classifica els carcinomes invasius amb tres grans grups: grau I, grau II i grau III, relacionats amb la supervivència. La supervivència de les pacients amb carcinomes grau I ben diferenciats disminueix de forma gradual fins a un 70% als 24 anys. En contrast els carcinomes de grau III poc diferenciats presenten un grau de mortalitat d'un 46% durant els 10 primers anys. Per últim els carcinomes de grau II

moderadament diferenciats tenen millor supervivència inicial però a llarg termini és només lleugerament millor al carcinoma de grau III [73].

Afectació ganglionar

L'estat dels ganglis limfàtics axil·lars afectats és el factor pronòstic més important en el carcinoma invasiu, ja que ens indica si hi ha metàstasi. Per això cal l'anàlisi dels primers ganglis limfàtics de l'axil·la ja que es considera el primer lloc d'extensió del tumor. Per fer aquest anàlisi s'utilitza la tècnica del gangli sentinella [75], que ens permet analitzar l'afectació d'aquests primers ganglis sense haver d'extirpar tota la cadena ganglionar, tenint en compte les complicacions que això podria ocasionar.

Mida del tumor

En un carcinoma invasiu la mida del tumor és un factor pronòstic molt important. El risc de metàstasi en els ganglis limfàtics axil·lars augmenta amb la mida del tumor primari tot i que són factors pronòstics independents. Pacients amb carcinoma de mama amb els ganglis negatius i tumors de mida >1 cm tenen una taxa de supervivència als 10 anys superior al 90%, mentre que la supervivència es redueix a un 77% en tumors >2 cm [73].

Taxa de proliferació

La proliferació es mesura contant les mitosis, als laboratoris d'anatomia patològica es sol fer mitjançant la detecció IHQ de proteïnes cel·lulars produïdes durant el cicle cel·lular com poden ser les ciclines o Ki67. Els carcinomes amb taxes altes de proliferació tenen un pronòstic més desfavorable tot i que poden respondre millor a la quimioteràpia [73].

Receptors hormonals

La relació entre el càncer de mama i la influència hormonal data de 1896, quan George Beatson, va publicar a la revista Lancet un cas de disminució de la mida del carcinoma de la glàndula mamària després de realitzar una ooforectomia bilateral. El càncer de mama és dependent d'hormones, de manera que el seu comportament biològic depèn molt de l'acció de les hormones ovàriques, l'estrògen i la progesterona. Els estrògens són responsables de l'elongació i ramificació dels conductes mamaris i la progesterona del desenvolupament i diferenciació dels lobels. Ambdues hormones actuen en els teixits blancs a través de receptors específics i s'ha vist que tenen una expressió alterada en càncer de mama [76].

Als laboratoris d'anatomia patològica, mitjançant tècniques IHQ s'analitza si les cèl·lules del tumor presenten receptors hormonals: d'estrògen (RE) i de progesterona (RP). L'interès rau en que si presenten expressió proteica dels receptors, els tumors respondran a la teràpia hormonal i això és un indicador de millor pronòstic (Apartat 4, Teràpia hormonal).

HER2

HER2 és el receptor 2 del factor de creixement epidèrmic humà; proteïna de membrana que participa en el creixement cel·lular. És present en les cèl·lules normals i en la majoria de tumors, però en un 15-20 % dels tumors de mama es troba en concentracions molt elevades i això dona al tumor una major agressivitat. Mitjançant tècniques d'IHQ o per hibridació *in situ* fluorescent (FISH), es detecta si hi ha sobreexpressió d'aquesta proteïna en el cas de la IHQ o amplificació del gen en el cas de FISH, ja que aquests tumors amb sobreexpressió d'HER2 normalment són sensibles

a la teràpia amb l'anticòs monoclonal anti-HER2, el trastuzumab (Apartat 5.3, Anticossos monoclonals).

4.- Classificació molecular del càncer de mama

Es va observar que tumors de mama semblants histològicament i amb factors pronòstics similars es comportaven de forma diferent. Per això es va suposar que les diferències s'establien a nivell molecular, a l'expressar diferents gens que els hi conferien un comportament biològic i una sensibilitat als tractaments diferent [77]. Basant-se en aquest raonament hi ha treballs d'investigació dels patrons d'expressió gènica de cents de gens en carcinomes mamaris, utilitzant la tècnica dels microarrays, que permet obtenir un retrat molecular de cada tumor i així agrupar-los en diferents categories en base al seu perfil d'expressió gènica [78]. Així doncs classificaríem els tumors molecularment en:

Luminals

S'anomenen així perquè les cèl·lules tumorals tenen una forma similar a les del lumen del conducte epitelial. Aquests tipus de tumors es caracteritzen perquè expressen receptors hormonals (RE i RP) i citoqueratines de baix pes molecular (CK7, CK8, CK18). Els tumors luminals es divideixen en: **LUMINALS A** que expressen receptors hormonals i HER2 i **LUMINALS B** que expressen els receptors hormonals però no l'HER2. El tumors luminals s'associen a una millor resposta al tractament hormonal que a la quimioteràpia, però el subtipus luminal B té un pitjor pronòstic que el luminal A [79].

Tumors HER2 positius

La identificació del subtipus HER2 confirma la impressió clínica que aquest tipus de tumor té una història natural diferent a la resta de tumors de mama. Des del punt de vista del perfil genètic, el subtipus HER2 positiu (HER2+) es refereix només a tumors que no expressen RE i PP, de manera que no s'han de confondre amb els tumors HER2+ que també expressin receptors hormonals, ja que aquests corresponen genotípicament a tumors del subtipus luminal [80, 81]. Entre el 40-80% d'aquests tumors presenten mutacions a p53, el gen anomenat supressor de tumors, molt important en càncer ja que participa en l'activació de proteïnes que participen en la reparació del DNA danyat i pot iniciar l'apoptosi cel·lular si el dany al DNA és irreparable. També és més probable que siguin de més alt grau histològic que els tumors del subtipus luminal i que presentin afectació ganglionar amb una freqüència dues vegades més gran que els tumors luminals A [82]. D'altra banda, són més sensibles que el subtipus luminal a la quimioteràpia neoadjuvant, i són també sensibles als fàrmacs que bloquegen la via d'HER2 com el trastuzumab i el lapatinib (Apartat 5, Teràpies biològiques).

Tumors triples negatius

Aquests tumors també s'anomenen "basal like" perquè les cèl·lules s'assemblen a les de l'epiteli basal que hi ha a moltes parts de l'organisme, i concretament a les cèl·lules mioepitelials dels ductes mamaris. Són tumors que tenen una expressió d'HER2, de RP i de RE negativa, però sí que expressen citoqueratines basals com CK5/6 i CK17 i gens de proliferació. La majoria d'ells tenen mutacions en p53 i són d'alt grau histològic [83].

Clínicament, la majoria de les dones portadores de la mutació BRCA1 tenen tumors que pertanyen a aquest subtipus. Són els tumors que presenten el pitjor pronòstic i a més no tenen dianes terapèutiques específiques.

Càncer de mama HER2+

1.- Descripció

El receptor del factor 2 de creixement epidèrmic humà, HER2, és un receptor transmembrana de 185 kDa que pertany a la família dels factors de creixement epidèrmic (EGF) amb receptors tirosina cinasa (TK).

Els receptors de l'EGF són una família de receptors transmembrana mediadors potents del creixement i desenvolupament de les cèl·lules.

Aquesta família de receptors està composta per 4 receptors transmembrana TK tipus I que són: HER1 o EGFR (*epidermal growth factor receptor*), HER2, HER3 i HER4. Cada un d'ells té un domini extracel·lular d'unió al lligand, un segment α -hèlix transmembrana i un domini intracel·lular TK, excepte HER3 que no presenta domini TK (Figura 11).

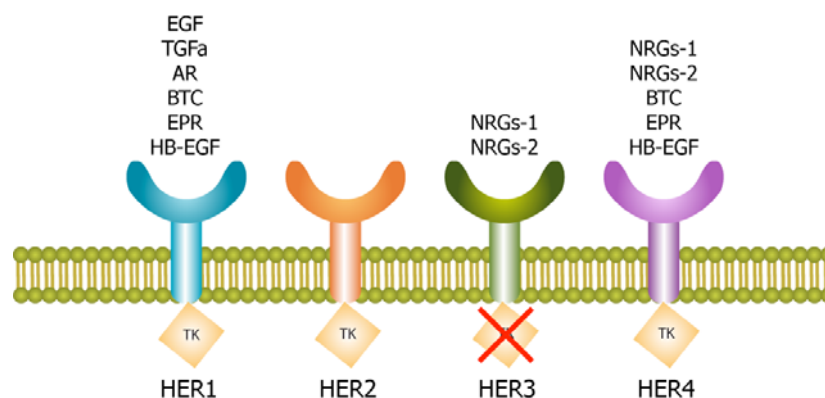


Figura 11. Els quatre receptors de la família HER amb els seus corresponents lligands.

2.- Funció

La dimerització dels receptors EGF és essencial per la seva funció i per l'activitat de senyalització de tots els seus receptors. La dimerització pot ser entre dos

HERs diferents (heterodimerització) o entre dues molècules del mateix receptor (homodimerització). Aquests receptors es troben plegats de manera que eviten la dimerització. El domini extracel·lular d'HER2, a diferència dels altres tres receptors pot adoptar una conformació fixa semblant a l'activada per un lligand, permetent així la dimerització en absència de lligand [84]. No tots els dímers d'HER tenen la mateixa capacitat i potència de senyalització; els homodímers presenten una perpetuació del senyal més feble en comparació amb els heterodímers. HER1, HER2 i HER3 són els implicats en el desenvolupament i la progressió del càncer, HER4 encara no es coneix ben bé el seu paper en oncogènesi. L'heterodímer HER2:HER3 és considerat el dímer més potent a l'hora de generar reaccions com la resistència a la interacció, la fosforilació de la tirosina induïda pels lligands [85].

L'activitat de les diverses rutes intracel·lulars es veu activada pels diferents lligands, per la dimerització dels membres d'HER a la superfície cel·lular i els efectors intracel·lulars, produint diferents respostes cel·lulars als diversos estímuls. La fosforilació dels receptors estimula una cascada d'esdeveniments de senyalització intracel·lular que modula l'expressió de gens claus involucrats en múltiples processos cel·lulars. Les dues vies que activen els membres de la família HER són la via de PI3K i la de MAPK (ERK1/2) [86]. HER3 no presenta domini TK però té 6 llocs d'unió pel PI3K per tant estimula aquesta via cooperant amb HER1 i HER2.

Veiem en la Figura 11 que els diferents lligands s'uneixen al domini extracel·lular dels receptors, induint la homodimerització o la heterodimerització formant diferents combinacions dels receptors que activen l'activitat del domini intracel·lular tirosina cinasa. HER2 és el receptor preferit per fer les diferents unions. La fosforilació dels receptors ve donada per l'activitat TK dins els dominis intracel·lulars activant diferents

vies de senyalització. Com ja hem mencionat les dues vies més importants activades pels receptors HER són:

*i) la **via de senyalització PI3K/AKT** regulada per fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat 3-fosfatasa (PTEN) supressor tumoral on també hi ha involucrats altres efectors com el NFkB i mTOR. L'activació descontrolada de la ruta de PI3K contribueix a la transformació cel·lular i la progressió tumoral. L'activació d'aquesta via pot passar per RAS activat o directament pels receptors TK que responen als EGF, autofosforilant la seva part intracel·lular i així es desencadenen les reaccions de senyalització ens aquesta via. PTEN actua com un gen supressor de tumors. La proteïna codificada per PTEN es troba en gairebé tots els teixits del cos. Actua com una fosfatasa al desfosforilar el fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat (PIP3). Aquesta desfosforilació és important perquè dóna lloc a la inhibició de la via de senyalització d'AKT [87] (Figura 13).*

*ii) la **via de Raf/MAPK**. (MAPK també anomenada ERK). El primer component d'aquesta cascada de senyalització és Raf, que s'activa a la membrana plasmàtica a través de Ras-GTP. Raf fosforila la cinasa 1/2 activada per mitògens (MEK1/2 cinasa), que activa per fosforilació la ERK1/2 cinasa o MAPK p44/42, que duu a terme la fosforilació d'altres proteïnes involucrades, i finalment tot es tradueix en canvis en l'expressió gènica i en les activitats catalítiques dels enzims [88]. Aquesta via de senyalització es relaciona amb un fenotip maligne que inclou un augment de la proliferació, defectes en l'apoptosi, invasivitat i capacitat d'induir neovascularització. Ras es troba a la part superior d'aquestes cascades i actua com un transductor del senyal d'autoinactivació [89]. Per això hi ha diferents teràpies inhibidores d'aquesta ruta com pot ser l'inhibidor TK sorafenib [90]. Un tercer factor important en la xarxa és la proteïna cinasa C (PKC), la qual és activada per la fosfolipasa C (PLC).*

Com a resultat d'aquestes vies de senyalització, diferents factors nuclears són reclutats per modular la transcripció dels gens implicats en la progressió del cicle cel·lular, la proliferació i la supervivència [91].

3.- Lligands de la família HER

Es coneixen diferents lligands d'HER1, HER3 i HER4, però fins ara no s'ha identificat cap lligand específic per HER2, que es defineix com un receptor orfe de lligand. Majoritàriament HER2 funciona com a coreceptor sempre amb la seva conformació activa fins i tot en absència de lligand i tal com ja hem mencionat és el preferit per a la dimerització amb els altres membres de la família HER quan són activats pels seus lligands [91].

Hi ha un gran nombre de lligands per als receptors HER que tenen l'anomenat mòdul semblant a EGF. A part del propi EGF tenim: el factor de creixement transformant α (TGF- α : *transforming growth factor- α*), la amfiregulina (AR), el factor de creixement semblant a EGF que uneix heparina (HB-EGF: *Heparin-binding EGF-like growth factor*), la β -celulina (BTC) i la epiregulina (EPR) [92-95]. Recentment, han estat descrites dues noves famílies de lligands de diversos receptors HER; aquestes són les neuregulines-1 (NRGs-1), també anomenades factors de diferenciació Neu (NDFs: *Neu differentiation factor*) o heregulines, i les neuregulinas-2 truncades (NRG-2) [96, 97] (Figura 11).

Dins de la família de lligands dels receptors HER es distingeixen tres grups funcionals pel que fa a les seves capacitats d'unir i activar a un o altre receptor. En el primer grup estarien inclosos el EGF, el TGF- α i l'AR, els quals són capaços d'unir i activar homodímers d'HER1 i heterodímers d'aquest amb altres receptors d'aquesta família. En un segon grup inclouríem a les NRGs-1 i les NRGs-2, les quals s'uneixen a

homodímers de HER3 o de HER4 i heterodímers d'aquests amb altres receptors d'aquesta família. En el tercer grup estarien la BTC, l'EPR i l'HB-EGF, que poden activar tant a homodímers d'HER1 o de HER4, com a heterodímers de cada un d'ells amb altres membres de la família. Tal com ja hem dit HER2 és un receptor orfe que no té lligand directe conegut, encara que és activat per EGF, TGF- α , BTC o neuroregulines (NRG) quan heterodimeritza amb altres receptors de la família [96, 98].

L'activació d'HER2 es produeix amb la dimerització amb un altre receptor per què tal com hem dit anteriorment HER2 no té un lligand específic. Així un cop activat HER2 és capaç d'induir la senyalització que promou la proliferació i la supervivència. (Figura 12)

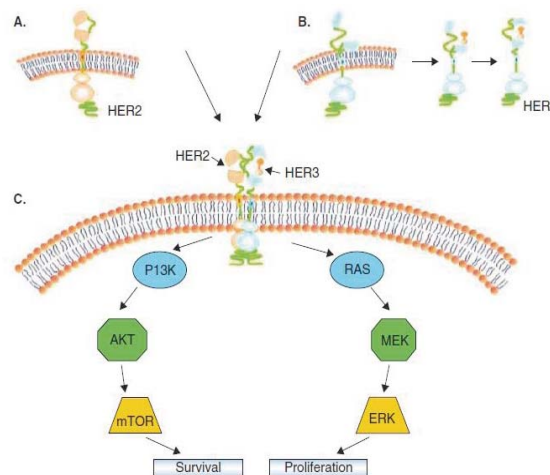


Figura 12. Representació esquemàtica de l'activació d'HER2. A.- Conformació fixa d'HER2 similar a l'activació per lligand, el que permet al receptor formar dímers en absència d'un lligand. B.- Canvi de la conformació del domini extracel·lular induïda pel lligand d'HER3. C.- Senyal induïda per l' heterodímer HER2/HER3. *Tagliabue et al. Expert Opin Biol Ther. 2010.*

La sobreexpressió d'HER2 és present amb molts carcinomes però l'amplificació del gen no és freqüent excepte en el carcinoma de mama. Degut als nivells alts d'expressió d' HER2 en càncer de mama en comparació amb el teixit normal de la

mama, i també la participació de HER2 en l'agressivitat del tumor, aquesta oncoproteïna representa una diana ideal per teràpia específica anti-HER2.

Tractaments del càncer de mama

El tractament del càncer de mama depèn de la mida, l'estadiatge i el tipus biològic del tumor (grau de diferenciació cel·lular, receptors hormonals i HER2), i també de la situació de salut pròpia de cada persona. Com en altres tumors, el tractament és multidisciplinari, és a dir, diverses disciplines de la salut intervenen per treballar juntes i combinar teràpies.

El càncer de mama i el seu tractament poden ocasionar diferents efectes secundaris, produïts per molts factors, com ara el tipus de cirurgia, dosi, durada i tipus de quimioteràpia o radioteràpia i, també, per les característiques individuals de cada persona.

1.- Cirurgia

En general, com més petit és el tumor més opcions quirúrgiques es poden donar. La cirurgia és un dels tractaments més freqüents en el càncer de mama. N'hi ha de diferents tipus:

Cirurgia conservadora. En aquest cas, després de la intervenció s'aplica radioteràpia sobre la zona afectada. La combinació de la cirurgia i la radioteràpia rep el nom de tractament conservador. Si calgués aplicar quimioteràpia, la radioteràpia s'ha de posposar per al final.

Tumorectomia. Consisteix en l'extirpació del tumor i d'un petit marge de teixit no maligne al voltant del tumor.

Mastectomia parcial o segmental. Extirpació d'un quart o segment de la mama que comprèn el tumor.

Cirurgia radical. Mastectomia radical simple. Consisteix en l'extirpació de tota la mama, inclòs el mugró, però no dels ganglis limfàtics.

Mastectomia radical modificada. S'extirpa la mama i els ganglis limfàtics de l'aixel·la.

Biòpsia del gangli sentinella. L'objectiu és identificar el primer gangli sobre el qual drena la mama. Si el gangli està afectat pel tumor cal revisar la resta de ganglis axil·lars i extirpar-los. Si no ho està es pot evitar la limfadenectomia i els efectes que se'n poden derivar (limfedema).

Limfadenectomia axil·lar. Consisteix, independentment de la tècnica quirúrgica utilitzada, en l'extirpació dels ganglis de l'aixel·la. La quantitat de ganglis extirpats pot variar. L'objectiu és treure tots els afectats i evitar deixar cè·l·lules que puguin portar a una recaiguda.

Reconstrucció de la mama. Aquesta intervenció no està dirigida al tractament del càncer, sinó a restablir la forma de la mama en els casos en què s'ha practicat una mastectomia. Aquesta intervenció es pot fer en el mateix moment en què es practica l'extirpació de la mama (reconstrucció immediata) o posteriorment en una altra intervenció quirúrgica (reconstrucció diferida). La reconstrucció es pot dur a terme amb teixits d'una altra part del cos (empelts) o amb implants sintètics (pròtesis internes). També és possible no fer la reconstrucció i utilitzar pròtesis externes. L'elecció d'una opció o un altre també necessita d'una valoració individual per cada persona ([www.gencat.cat/canal salut/cancer](http://www.gencat.cat/canal_salut/cancer)).

2.- Radioteràpia

Consisteix en utilitzar irradiacions d'alta energia per tal d'eliminar les cè·l·lules canceroses. S'administra sempre després de la cirurgia conservadora, tot i que en

ocasions també es pot aplicar després de la cirurgia radical. També es recomana quan el tumor és gran, o quan hi ha un nombre elevat de ganglis de l'axil·la afectats per cèl·lules tumorals. La radioteràpia ha de ser administrada a dosis petites, per reduir els seus efectes secundaris

3.- Quimioteràpia

La quimioteràpia és el tractament sistèmic principal en el tractament del càncer. Es defineix com quimioteràpia l'ús de compostos químics que impedeixen la proliferació cel·lular. El primer tractament quimioteràpic va ser contra bacteries i el va desenvolupar Paul Ehrlich al 1909, però la quimioteràpia antineoplàsica es va iniciar amb el descobriment dels efectes del gas mostassa, un agent alquilant del DNA sintetitzat per primera vegada al 1886 el qual va ser usat com a arma química durant la primera Guerra Mundial. Derivats del gas mostassa van ser usats per primera vegada als anys 1940 pel tractament del limfoma [99]. Actualment hi ha un nombre important de compostos quimioterapèutics aprovats per la FDA (Food and Drug Administration) i la EMA (Agència Europea del Medicament). Aquests poden ser classificats com a naturals o sintètics i segons els seu mecanisme d'acció es classifiquen també com agents antimetabòlits, alquilants o intercalants o els que interfereixen en la cadena del DNA entre d'altres [100] (Taula 2). La majoria d'aquests fàrmacs lesionen la cèl·lula en el moment en què té lloc la divisió cel·lular, s'aprofiten de la falta de control i creixement desordenat de les cèl·lules tumorals per complir la seva missió: reduir o eliminar el tumor, aquests fàrmacs s'anomenen citostàtics. Donat que també danyen cèl·lules no tumorals, és necessari donar la quantitat necessària per afectar el tumor sense produir efectes adversos intolerables. Aquesta dosi o quantitat s'ha de repetir periòdicament, ja que per eliminar el tumor fan falta alguns cicles de

tractament. Hi ha diferents modalitats de la quimioteràpia en funció del moment en el qual s'administra:

Quimioteràpia Neoadjuvant: és la quimioteràpia que s'administra abans d'un tractament amb intenció curativa o radical o de la cirurgia. La intenció de la neoadjuvència és principalment la disminució de la grandària tumoral per a practicar una cirurgia conservadora i la valoració de la resposta a la quimioteràpia per a posteriors tractaments. Està indicada en els càncers de mama localment avançats, i en aquells que mesurin més de 3 cm o que tinguin adenopaties axil·lars.

Quimioteràpia Adjuvant: la quimioteràpia adjuvant és la que s'administra després de la cirurgia o d'un tractament amb intenció curativa o radical. La seva indicació depèn dels factors pronòstic clàssics que són l'edat, la grandària tumoral, l'afectació ganglionar axil·lar, el grau de diferenciació cel·lular (grau histològic) i els receptors hormonals. Si els ganglis axil·lars són negatius d'infiltració tumoral, les pacients es classifiquen en baix i mig-alt risc. Les de baix risc (receptors hormonals positius, tumors menors de 2 cm), grau I histològic, i majors de 35 anys no són susceptibles de quimioteràpia adjuvant. Les de risc (receptors hormonals negatius o receptors hormonals positius però amb graus histològics II o III i tumors majors de 2cm), es beneficien de la quimioteràpia adjuvant. Les pacients amb ganglis axil·lars positius, sempre es beneficien de la quimioteràpia adjuvant, excepte en dones majors (70-75 anys) o que pateixin altres malalties que contraindiquen la quimioteràpia.

Quimioteràpia Pal·liativa: la quimioteràpia davant una malaltia disseminada o de recaiguda està indicada de primera línia davant receptors hormonals negatius, malaltia visceral, interval curt des de la cirurgia o simptomatologia relacionada amb la recaiguda o la metàstasi (www.gencat.cat/canal_salut/cancer).

Taula 2. Fàrmacs quimioterapèutics més usats en càncer de mama.

GRUP TERAPÈUTIC	PRINCIPI ACTIU	PUNT D'ACCIÓ	MECANISME D'ACCIÓ
Taxans	Docetaxol Paclitaxel	Inhibidors de la mitosi	Bloquejar els microtúbuls i així interferir en la mitosi
Antimetabòlits anàlegs de pirimidines	Flurouracil	Actua sobre el DNA	Interfereix en la síntesi i la duplicació del DNA, produint cadenes defectuoses que activen l'apoptosi
Complexes platí	Cisplatí	Actua sobre el DNA	Produeixen errors en la transcripció i la impossibilitat de la separació de les cadenes replicades
Antraciclina	Doxorubicina Epirubicina	Actuen sobre el DNA	Provoquen talls en el DNA mitjançant un mecanisme complexa i també s'intercalen en el DNA fent cadenes anòmals
Agents alquilants, mostasses nitrogenades	Ciclofosfamida Capacetabina	Actuen sobre el DNA	Actua en la fase S del cicle cel·lular, forma ponts intercatenaris en la doble hèlix de DNA
Antimetabòlit anàleg de l'àcid fòlic	Metrotexat	Actua sobre el DNA	Interfereix en la síntesi de bases púriques i pirimidíniques, inhibeix l'àcid fòlic i es actiu en la fase S del cicle cel·lular

4.- Teràpia hormonal

Les rutes de senyalització dels receptors hormonals RE i RP juntament amb les d'HER2 són les conductores de la proliferació cel·lular i la supervivència en el 85% dels tumors de mama. Actuar sobre aquestes vies, hormonal o biològicament, és una de les teràpies més efectives. Perquè tingui lloc l'efecte de les hormones esteroides sobre la proliferació cel·lular, és necessària l'expressió de receptors específics, i la unió de l'hormona al seu receptor és el punt inicial del control del cicle cel·lular en les cèl·lules hormonodepenents. Els principals lligands dels receptors hormonals són els estrògens circulants en la dona i la dihidrotestosterona en l'home. Aquests receptors es localitzen al citoplasma i després de la unió hormona-receptor pateixen canvis conformacionals, com ara la dimerització del RE, que provoca la seva activació, translocació al nucli i

unió al DNA, que finalment origina un augment de la transcripció amb producció de proteïnes específiques (per ex. l'activació del RE augmenta la síntesi de RP), que regulen els processos de proliferació i diferenciació cel·lular. La hormonoteràpia té com a objectiu impedir l'estímul hormonal sobre la proliferació cel·lular tumoral, actuant ja sigui de forma directa sobre els receptors, bloquejant-los o sobre les rutes metabòliques de producció d'hormones, reduint-ne els seus nivells [80]. Els principals tipus de tractament hormonal es descriuen a continuació.

El **tamoxifè**, un modulador selectiu del receptor d'estrogen (SERM: *selective estrogen receptor modulator*) que s'utilitza freqüentment en tractament i prevenció del càncer de mama [101]. El 1998 la FDA va aprovar el tamoxifè per la prevenció de càncer de mama amb dones amb alt risc de desenvolupar la malaltia [102]. El tamoxifè actua bloquejant l'estrogen a l'unir-se als receptors d'estrogen en les cèl·lules canceroses, reduint el creixement tumoral i incrementant la mortalitat de les cèl·lules tumorals. En el procés de metabolització del tamoxifè al fetge es produeixen tres diferents metabòlits. Tant la molècula pròpia de tamoxifè com els seus metabòlits són considerats SERM a causa de la seva capacitat d'unió a l'ADN dels receptors d'estrògens. En estudis *in vivo* s'ha comprovat que els SERM competeixen amb els estrògens per unir-se als seus receptors, provocant una atenuació de la resposta cel·lular mediada per estrògens [103]. El tamoxifè pot ser utilitzat en dones pre i post menopàusiques (Treatments and drugs by mayo clinic staff, www.mayoclinic.com).

El **fulvestrant**, un antagonista del RE, actua disminuint la regulació del RE, s'uneix al lloc receptor i competeix amb l'estrogen del cos. Una vegada que es col·loca en aquest lloc, provoca la descomposició dels receptors, de manera que prevé la resposta cel·lular normal a l'estrogen. El fulvestrant s'utilitza generalment en dones

post menopàusiques perquè altres teràpies de bloqueig hormonal no són eficaces o perquè no poden prendre tamoxifè (www.chemocare.com).

Els **Inhibidors de l'Aromatasa (IA)**, aquests fàrmacs actuen sobre l'enzim aromatasa que converteix els andrògens en estrògens; això farà que els tumors que depenen d'aquesta hormona redueixin la mida. Aquests IA només són efectius en dones post menopàusiques. Els IAs d'ús clínic actual inclouen: anastrozol, letrozol i exemestà [104].

En dones premenopàusiques per aturar la producció hormonal dels ovaris es pot practicar una ovariectomia també anomenada menopausa clínica o administrar els fàrmacs que impedeixin la producció d'estrógen per part dels ovaris.

5.- Teràpies biològiques

Les teràpies biològiques dirigides actuen ajudant el sistema immunològic a lluitar contra el càncer. Amb la intenció d'actuar només sobre les cèl·lules malignes i no sobre les sanes, per tant, els efectes secundaris són menors i, generalment, ben tolerats. Han aparegut importants fàrmacs anomenats en conjunt teràpia dirigida, que reconeixen una característica cel·lular concreta i actuen sobre ella.

Els tractaments dirigits utilitzats per tractar el càncer de mama són: els anticossos monoclonals, els inhibidors de la tirosina cinasa (ITK), els inhibidors de la poli ADP-ribosa polimerasa (PARP) que estan en estudi pel càncer de mama triple negatiu (www.cancer.gov).

HER2 és un receptor de membrana TK, es troba amplificat en un 20% dels càncers de mama. Quan està activat dóna a la cèl·lula una capacitat de proliferació i supervivència imprescindible pel desenvolupament i la progressió tumoral [105]. Tal i com ja hem explicat anteriorment (Apartat 3, HER2) la família dels receptors HER, està

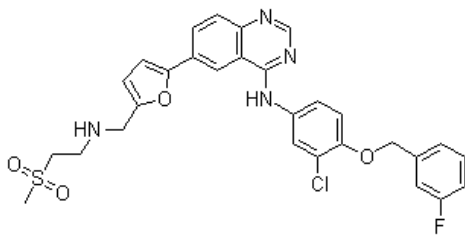
formada per quatre receptors HER1, HER2, HER3 i HER4 amb una estructura de tres dominis: un extracel·lular d'unió al lligand, un transmembrana i un domini intracel·lular amb activitat TK [106]. A través de la unió al lligand el domini extracel·lular indueix a la formació d'homodímers i heterodímers. A partir d'aquí es produeix una fosforilació dels receptors a través de la TK que posarà en marxa varies vies de senyalització intracel·lular interrelacionades amb molts processos cel·lulars com l'apoptosi, la migració, creixement, adhesió i la diferenciació cel·lular.

5.1.- Inhibidors de la tirosina cinasa (ITK)

Aquests fàrmacs actuen sobre el domini TK dels receptors bloquejant-los, i impedit l'activació de la seva via de senyalització (Figura 13).

ITKs d'ús freqüent en clínica són:

LAPATINIB



Nom comercial: Tyverb® de GlaxoSmithKline.

Fórmula química: $C_{29}H_{26}N_4ClFO_4S$.

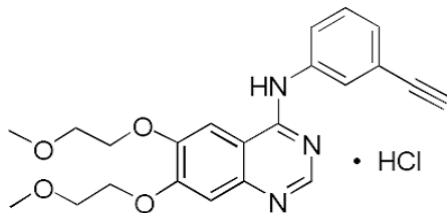
Pes molecular 581,058 g/mol.

El lapatinib inhibeix l'acció de la TK associada als dos oncògens HER1 i HER2. Lapatinib inhibeix el procés de recepció de senyals mitjançant la unió al lloc on s'uniria l'adenina trifosfat (ATP) del domini proteïna cinasa de HER1/HER2, prevenint l'autofosforilació i la subsegüent activació del mecanisme de senyalització [107].

El lapatinib està indicat en combinació amb capacetabina, per al tractament de pacients amb càncer de mama avançat o metastàtic que sobreexpressin HER2. Els pacients han de presentar malaltia en progressió després d'haver rebut tractament previ, el qual ha d'incloure antraciclina i taxans i tractament amb trastuzumab per a

malaltia metastàtica. I en combinació amb un inhibidor de l'aromatasa en dones postmenopàusiques amb càncer de mama metastàtic amb receptors hormonals positius per a les quals la quimioteràpia no és adequada (EMA, febrer 2010).

ERLOTINIB



Nom comercial: Tarceva® de Roche.

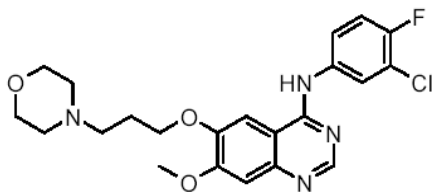
Fórmula química: C₂₂H₂₃N₃O₄

Pes molecular: 393,44 g/mol

L'erlotinib és una molècula ITK del receptor HER1, competeix amb l'ATP per unir-se al domini intracel·lular d'aquest receptor inhibint així l'activitat TK, tot i la presència del lligand. La inhibició de l'activitat TK del receptor conduirà a la parada del cicle cel·lular en G1 i a l'apoptosi.

Erlotinib està descrit i aprovat en el càncer de pulmó no microcític localment avançat o metastàtic en monoteràpia com a tractament de manteniment en pacients amb malaltia estable després de 4 cicles de tractament quimioterapèutic estàndard de primera línia amb platí (EMA juny 2011 i FDA abril 2010). En càncer de pulmó no microcític localment avançat o metastàtic, quan ha fracassat, com a mínim, un tractament quimioterapèutic anterior (EMA setembre 2005 i FDA novembre 2004). En primera línia en càncer de pulmó no microcític localment avançat o metastàtic amb mutacions activadores d'HER1 [108]. I en càncer de pàncrees metastàtic en combinació amb gemcitabina (EMA març 2007 i FDA febrer 2005). Pel que fa al càncer de mama existeixen estudis fase I i II amb erlotinib, alguns encara en fase de reclutament i altres pendents de resultats. Hi ha diversos assaigs en marxa en l'actualitat que avaluen la combinació de erlotinib amb altres fàrmacs [109].

GEFITINIB



Nom comercial: Iressa® de Astrazeneca

Fórmula química: C₂₂H₂₄ClFN₄O₃

Pes molecular: 446,902 g/mol

Gefitinib és una molècula de baix pes molecular que inhibeix varis receptors amb activitat TK, particularment l'HER1 [110]. El 2005 la FDA va aprovar el gefitinib pel tractament del càncer de pulmó no microcític. El gefitinib ha demostrat activitat antiproliferativa en cultiu cel·lular i en xenògrafs de tumors humans, tant com a fàrmac únic com en combinació amb altres fàrmacs o radioteràpia. En combinatòria ha mostrat un efecte sinèrgic rellevant [111]. El gefitinib pot afectar els efectes antitumorals de la teràpia hormonal, en un estudi es va combinar el gefitinib amb fulvestrant un inhibidor de l'aromatasa (explicat anteriorment). Van utilitzar la combinació per tractar diferents línies cel·lulars de càncer de mama (tumors RE positius, càncer postmenopàusic, HER2 positiu, etc.). Els resultats van demostrar que gefitinib augmenta els efectes del fulvestrant augmentant l'apoptosi i el bloqueig del cicle cel·lular en la síntesi d'ADN [112]. Hi ha més estudis per veure els efectes del gefitinib en càncer de mama, com el de Baselga i col·laboradors per comprovar la inhibició d'HER1 en pacients en càncer de mama avançat [113].

S'esperen resultats d'assajos clínics de gefitinib amb càncer de mama recurrent. Cal més recerca per comprendre l'impacte potencial d'aquest fàrmac en el tractament del càncer de mama

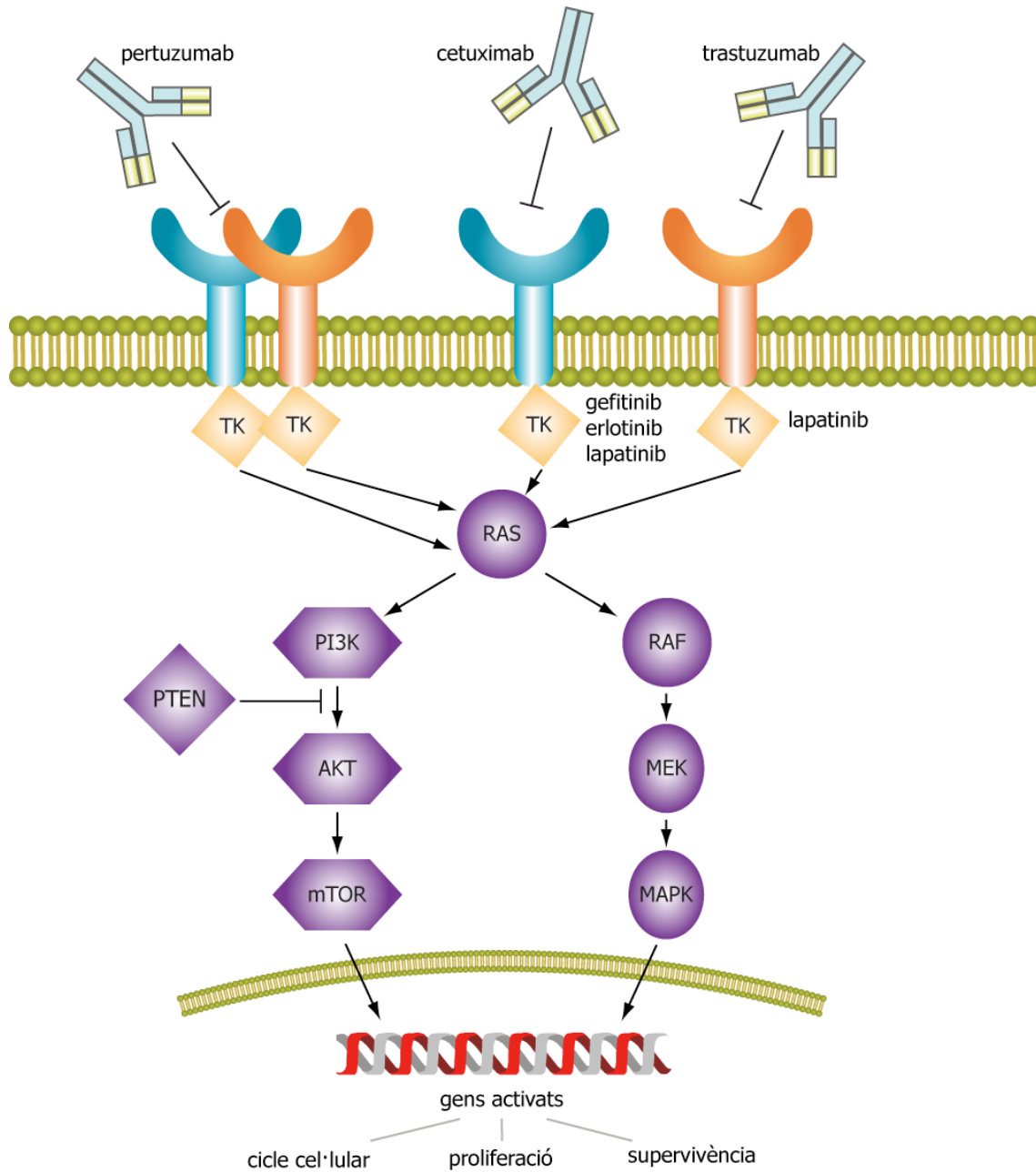


Figura 13. Vies de senyalització regulades pels membres de la família HER. Veiem la via PI3K/AKT regulada també per PTEN i la via Raf/MAPK. Lloc d'actuació d'alguns dels fàrmacs anti-HER. Els ITKs exclusius d'HER1: gefitinib, erlotinib i l'ITK dual per HER1 i HER2 el lapatinib. Els anticossos monoclonals cetuximab que actua sobre el domini extracel·lular d'HER1, el trastuzumab que actua sobre el domini extracel·lular d'HER2 i el pertuzumab l'íhnbidor dual per HER1 i HER2.

5.2.- Inhibidors de PARP

Els inhibidors de la PARP s'usen en la teràpia dirigida per bloquejar un enzim que participa en la reparació de l'ADN i podrien provocar la mort en les cèl·lules tumorals (www.cancer.gov).

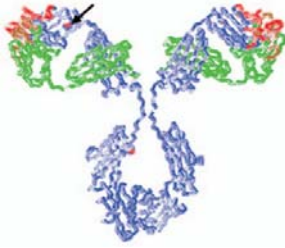
PARP es sobreexpresa en la carcinogènesi de mama, especialment en els tumors triple negatiu, i és també un indicador de mal pronòstic en el carcinoma invasiu de mama [114]. La teràpia amb inhibidors de PARP està en estudi per al tractament del càncer de mama triple negatiu.

5.3.- Anticossos monoclonals

Els anticossos monoclonals es van començar a generar en els anys 70 [115], i en paral·lel amb el desenvolupament científic i tecnològic han constituït un important avanç diagnòstic i terapèutic en múltiples malalties, sobretot en càncer. Els primers anticossos monoclonals eren murins i en utilitzar-se en humans generaven anticossos antimurins que limitaven de manera important l'eficàcia i la seguretat [116]. Posteriorment es van desenvolupar anticossos quimèrics muri-humans (exemple: cetuximab) en què es combinava la regió constant d'origen humà amb la regió variable d'origen murí. Aquests anticossos tenen al voltant d'un terç d'origen murí i segueixen sent potencialment immunogènics [80]. Després es van desenvolupar anticossos humanitzats (exemple: trastuzumab) en els quals la porció d'origen murí a la regió variable constitueix al voltant del 10% de l'anticòs, la qual cosa disminueix la immunogenicitat però no l'elimina totalment [117]. Finalment, a través de la generació de soques de ratolins transgènics s'han pogut sintetitzar anticossos monoclonals totalment humans en els quals la reacció immunògena és mínima o inexistent.

Anticossos monoclonals inhibidors de la família HER, usats en càncer (Figura 13):

CETUXIMAB



Nom comercial: Erbitux® d' Imclone Systems

Fórmula química: $C_{6484}H_{110042}N_{1732}O_{2023}S_{36}$

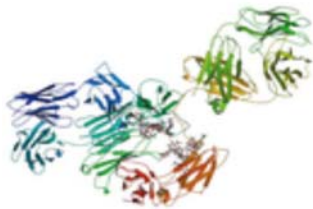
Pes molecular: 145781,6 g/mol

El cetuximab és un anticòs monoclonal quimèric. El cetuximab s'uneix al receptor HER1 amb una afinitat aproximada de 5 a 10 vegades superior a la dels lligands endògens. El que fa és bloquejar la unió dels lligands a l'HER1, inhibint la seva funció [118]. A més induïx a la internalització d'HER1 amb la corresponent disminució de la resta de receptors disponibles a la superfície cel·lular. El cetuximab també dirigeix a les cèl·lules efectores immunitàries citotòxiques cap a les cèl·lules tumorals que expressen HER1 (citotoxicitat mediada per cèl·lules dependent d'anticòs) [119]. El cetuximab inhibeix la proliferació i induïx l'apoptosi de les cèl·lules tumorals humanes que expressen HER1: *in vitro* inhibeix la producció de factors angiogènics per part de les cèl·lules tumorals i bloqueja la migració de les cèl·lules endotelials. *In vivo*, inhibeix l'expressió de factors angiogènics per part de les cèl·lules tumorals i provoca una reducció de la neovascularització i metàstasi tumorals [120].

El cetuximab està aprovat pel tractament del càncer colorectal avançat i per altres carcinomes com el de cap i coll. Actualment està inclòs en diferents estudis clínics amb combinació de quimioteràpia i altres noves dianes en diferents tumors com: cerebrals, mama, ovari. Segons els primers resultats de l'estudi aleatoritzat BALI-1 (fase II) dirigit pel Dr. Josep Baselga, presentats en el 35è congrés de la Societat Europea d'Oncologia Mèdica (ESMO), en el càncer de mama la combinació de cetuximab amb cisplatí dobla la taxa de resposta en pacients amb càncer de mama

metastàtic triple negatiu, en comparació amb el cisplatí sol (Resultats presentats en ESMO 2010).

BEVACIZUMAB



Nom comercial: Avastin™ de Roche amb Genetech

Fórmula química: $C_{6638}H_{10160}N_{1720}O_{2108}S_{44}$

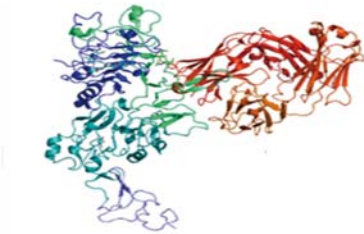
Pes molecular: 49838,57 g/mol

Bevacizumab és un anticòs monoclonal humanitzat dirigit contra el factor de creixement endotelial vascular (VEGF), factor proangiogènic. El bevacizumab s'uneix al VEGF inhibint així la unió d'aquest als seus receptors; el receptor 1 del VEGF (VEGFR1) i el receptor 2 del VEGF (VEGFR2), situats a la superfície de les cèl·lules endotelials. Al neutralitzar l'activitat biològica del VEGF es redueix la vascularització dels tumors i per tant s'inhibeix el seu creixement.

El bevacizumab està aprovat per diferents tractaments com el carcinoma metastàtic de colon o recte en combinació amb quimioteràpia (FDA febrer 2004, EMA gener 2005). El càncer renal avançat i/o metastàtic en combinació amb interferó α (EMA desembre 2007 i FDA juliol 2009 només metastàtic) entre d'altres. En càncer de mama la EMA havia aprovat el març 2007, bevacizumab en combinació amb paclitaxel o docetaxel pel tractament de càncer de mama metastàtic, i la FDA el febrer 2008 va aprovar el bevacizumab en combinació amb paclitaxel pel càncer de mama metastàtic HER2 negatiu (www.iconcologia.net). Posteriorment, i degut als resultats de varis estudis [121], el desembre de 2010 la FDA va retirar l'aprovació de la indicació de bevacizumab en càncer de mama i la EMA en va restringir el seu ús a la combinació amb paclitaxel per al tractament del càncer de mama metastàtic, veient l'evidència dels

resultats pobres del tractament en la milloria en la supervivència lliure de progressió sense impacte en la supervivència global

PERTUZUMAB



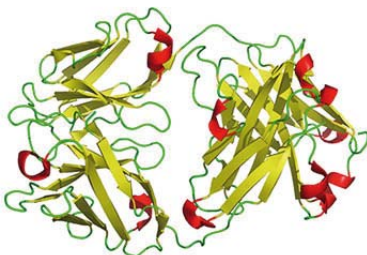
Nom comercial: Omnitarg™ de Roche amb Genetech

Fórmula química: no accessible.

Pes molecular: no accessible

Pertuzumab és un anticòs monoclonal humanitzat. És el primer d'una nova classe de fàrmacs dirigits contra el càncer coneguts com els inhibidors de la dimerització d'HER2 [122]. Està dissenyat per bloquejar la dimerització d'HER2 amb els altres receptors HER. D'aquesta manera bloqueja la senyalització cel·lular inhibint el creixement de les cèl·lules tumorals o conduint-les a la mort [123]. El pertuzumab inhibeix directament la formació de dímers amb HER2 incloent el dímer HER2:HER3 oferint l'únic mecanisme d'inhibició d'HER3 [85]. Actualment, està en estudi (fase III) pel tractament del càncer de mama HER2 positiu metastàtic, en combinació amb Trastuzumab. Els mecanismes d'acció del pertuzumab i el trastuzumab es creu que es complementen entre si ja que tots dos s'uneixen al receptor d'HER2 però en diferents regions. L'objectiu de la combinació es determinar si pot proporcionar un bloqueig més exhaustiu de les vies de senyalització (Estudi CLEOPATRA (Clinical Evaluation Of Pertuzumab And TRAstuzumab) fase III, juliol 2011).

TRASTUZUMAB



Nom comercial: Herceptin® de Roche

Fórmula química: $C_{6470}H_{10012}N_{1726}O_{2013}S_{42}$

Pes molecular: 145531,5 g/mol

El trastuzumab és un anticòs monoclonal murí humanitzat de tipus immunoglobulina G1 (IgG1), que es dirigeix específicament al domini extracel·lular d'HER2, unint-se als residus 529 i 626. Des de la seva aprovació per la FDA el 1998 el trastuzumab s'ha convertit en una eina terapèutica fonamental en les pacients amb càncer de mama que sobreexpressen HER2.

Mecanismes d'acció del trastuzumab

L'activitat antiproliferativa del trastuzumab ha estat àmpliament comprovada tant *in vitro* com en models animals. Els mecanismes d'acció del trastuzumab, citostàtics i citotòxics, van ser identificats en estudis preclínics. Es va comprovar que la inhibició i regulació negativa d'HER2 no permetia la dimerització d'aquest amb els altres receptors de la família HER i això afectava la cascada de senyalització PI3K, en conseqüència, les cèl·lules exposades al trastuzumab s'aturaven en la fase G1 del cicle cel·lular. També es va demostrar que trastuzumab té propietats antiangiogèniques, amb regulació negativa de les proteïnes involucrades. La citotoxicitat cel·lular dependent d'anticòs té un paper important en el mecanisme d'acció del trastuzumab, facilitant l'acció a cèl·lules "natural killer", que són citotòxiques. *In vivo* s'ha demostrat que el tractament amb trastuzumab dels tumors amb sobreexpressió de HER2 combinat amb interleuquina 2 o amb quimioteràpia produeix ampliació de cèl·lules "natural killer" i augmenta la citotoxicitat cel·lular dependent d'anticòs, intervinguda per les mateixes. Aquests tractaments combinats d'anticòs amb immunomoduladors i quimioteràpia són objecte de futures investigacions [124]. El trastuzumab té activitat sinèrgica i additiva amb fàrmacs citotòxics, tot i que el mecanisme molecular d'acció no resulta del tot clar. Aquest sinèrgisme s'observa amb carboplatí, ciclofosfamida, gemcitabina i

taxans, en especial amb el paclitaxel. També s'han comprovat efectes amb la doxorubicina i l'epirubicina, en tots els casos específicament en tumors amb sobreexpressió d'HER2 [125]. Al voltant d'una quarta part de les pacients de càncer de mama tenen tumors que es poden tractar amb trastuzumab combinat amb quimioteràpia. És un fàrmac d'administració endovenosa, molt ben tolerat en la majoria de pacients, que no provoca cap de les toxicitats habituals de la quimioteràpia. El seu principal efecte secundari és la cardiotoxicitat i també es poden veure reaccions al·lèrgiques al fàrmac [126].

Resistències a Trastuzumab

Aproximadament un 20% dels tumors de mama sobreexpressen HER2, factor indicador de mal pronòstic, però aquests tumors poden ser tractats amb el trastuzumab. Malgrat els bons resultats del tractament amb trastuzumab hi ha un percentatge important de pacients que no responen al fàrmac.

La resistències a trastuzumab poden ser intrínseques o adquirides.

Resistències intrínseques són degudes a canvis genètics en els receptors TK i a les seves corresponents vies de senyalització [127].

i) El principal canvi genètic és la deficiència de PTEN. La pèrdua de funció de PTEN, manté l'activitat de la via PI3K/AKT, en conseqüència no hi haurà apoptosi mediada per trastuzumab, seguirà la supervivència i proliferació cel·lular [128].

ii) La mutació en el gen PIK3CA que codifica per la subunitat catalítica PI3K és molt freqüent en carcinomes de mama, fent que aquests tipus de tumors siguin insensibles al trastuzumab [129].

iii) Una altra resistència és la forma truncada d'HER2 aquella que li manca el domini extracel·lular anomenat p95 on s'hi uneix el trastuzumab. Aquest receptor amb

la forma truncada manté la seva activitat TK mentre no hi actui cap bloquejador [130]. Per això els carcinomes que presenten aquesta resistència poden ser tractats amb lapatinib.

iv) La inhibició o mutació de p27, proteïna cinasa dependent d'una ciclina involucrada en el cicle cel·lular, intervé en la inhibició del creixement cel·lular causada per trastuzumab [131]. El trastuzumab promou la formació de p27Kip1-dependent de la ciclina cinasa 2 (CDK2), complex que deté el cicle cel·lular en fase G1; per això una alteració de p27 deixa el trastuzumab inactiu [132].

Resistències a trastuzumab adquirides

i) El trastuzumab pot trobar dificultats per arribar a HER2, degut a una glicoproteïna de membrana la mucina 4 (MUC4). Aquesta proteïna contribueix a la progressió del tumor protegint les cèl·lules tumorals del reconeixement immunològic, contribuint a la tumorigenicitat i a la metàstasi, a la supressió de l'apoptosi i a l'activació de HER2 [133]. MUC4 té una subunitat proteica que conté un domini similar a EGF, així MUC4 pot unir-se a HER2 i induir la seva fosforilació. A través d'aquesta interacció, MUC4 competeix amb trastuzumab per HER2 [134]. En aquests casos es pot utilitzar un fàrmac inhibidor de la TK com el lapatinib.

ii) Com ja hem explicat anteriorment HER2 tendeix a dimeritzar amb els altres membres de la família HER. Aquesta heterodimerització fa que s'activin les vies de senyalització de MAPK i PI3K. El trastuzumab evita la senyalització mediada per HER2 però no pot inhibir la promoguda per altres receptors EGF. L'acció del trastuzumab també pot ser impedida per l'activitat endògena dels lligands de la família HER que indueixen la senyalització de HER2/HER3 i HER2/HER1. Per tant tot això ens indica que l'eficàcia global del trastuzumab pot ser dictada per l'estat endogen dels membres de

la família HER, els seus lligands, i els seus inhibidors [127]. En aquests casos es recomana combinar el trastuzumab amb lapatinib o pertuzumab.

iii) El receptor del factor de creixement insulínic 1 (IGF-1R) és un receptor transmembrana TK que s'expressa amb tumors de mama i està involucrat amb la proliferació cel·lular i la metàstasi [135]. IGF-1R interacciona amb HER2 i contribueix a la resistència de trastuzumab en les cèl·lules de càncer de mama [136].

iv) També existeix una interacció entre la ciclina E i HER2 [137]. La sobreexpressió de ciclina E influeix en la resistència al trastuzumab això s'ha observat en estudis tant *in vitro* com *in vivo*. *In vitro*, la inhibició de l'activitat de la ciclina E en cèl·lules resistents a trastuzumab i amb ciclina E amplificada porta a una disminució de la proliferació cel·lular i un augment de l'apoptosi. *In vivo* en un model animal, es va observar que inhibint la ciclina E, amb un inhibidor del CDK2, es reduïa el creixement tumoral [138].

v) L'acció del trastuzumab en les cèl·lules tumorals pot ser deguda parcialment a la inducció de la resposta immune per l'anticòs. La citotoxicitat cel·lular depenent d'anticossos (ADCC) és induïda per trastuzumab i altres anticossos induint a l'apoptosi les cèl·lules tumorals [139].

La interacció d'HER2 amb els diferents receptors epidèrmics i receptors TK és molt important per l'activació de vies de senyalització alternatives que permeten el creixement tumoral [139]. Per tot això calen més estudis que investiguin la combinació de trastuzumab amb altres tractaments antidiària, per valorar si es pot vèncer aquesta resistència. Els resultats d'aquests estudis ens aproximaran al paper definitiu que exerceix cada agent en el càncer de mama.

Hipòtesi i Objectius

Hipòtesi

Els nous compostos polifenòlics sintetitzats a partir de l'(-)-3-galat d'epigallocatequina (EGCG) inhibeixen la sintasa d'àcids grassos (FASN), tenen activitat antitumoral, són més potents i estables que l'EGCG i potencien l'eficàcia dels tractaments existents contra el càncer de mama, tant *in vitro* com *in vivo*. A més, els nous inhibidors de FASN, sols o en combinació amb tractaments anti-HER, presenten activitat antitumoral en models cel·lulars resistents a les teràpies anti-HER existents (trastuzumab i lapatinib).

Objectius

ARTICLE 1

Caracterització molecular i biològica dels nous compostos polifenòlics derivats de l'EGCG.

Avaluació de l'activitat antitumoral dels nous compostos en diferents models cel·lulars de càncer de mama amb nivells diferencials d'expressió de FASN: AU565 i SKBr3 (FASN+++), MCF-7 (FASN+) i MDA-MB-231 (FASN+/-).

Selecció del compost més potent i específic en termes d'inhibició de l'activitat de FASN i citotoxicitat en models cel·lulars de càncer de mama amb sobreexpressió de FASN (AU565 i SKBr3).

ARTICLE 2

Anàlisi de les interaccions cel·lulars i moleculars del G28UCM (compost seleccionat en l'article 1) amb els actuals tractaments anti-HER (trastuzumab, lapatinib, erlotinib, gefitinib i cetuximab).

Estudi de l'efecte antitumoral del G28UCM en els models cel·lulars resistents a trastuzumab (AU565**TR**) i lapatinib (AU565**LR**) dissenyats i desenvolupats pel nostre grup de recerca.

Anàlisi de l'eficàcia antitumoral i perfil de toxicitat del G28UCM en un model murí de càncer de mama que presenta sobreexpressió de FASN i HER2.

Resultats

Article 1

"Novel anti-fatty acid synthase compounds with anti-cancer activity in HER2+ breast cancer"




En aquest treball es remarca la importància de la síntasa d'àcids grassos (FASN) com a diana terapèutica en el tractament del càncer i especialment del càncer de mama. Per això el desenvolupament de compostos capaços d'inhibir l'acció de FASN té un gran interès científic-mèdic.

Prèviament, el nostre grup d'investigació en col·laboració amb el Laboratori de Química Mèdica de la Professora María Luz López-Rodríguez de la Universidad Complutense de Madrid, va dissenyar una família de nous compostos derivats de l'EGCG. De tota la bateria de més de 50 compostos sintetitzats se'n va avaluar la seva activitat citotòxica en línees tumorals humanes de càncer de mama amb diferents nivells d'expressió de FASN (SKBr3: nivells elevats, MCF-7: nivells moderats i MDA-MB-231: nivells baixos) (Figura A1; Taula A1). Dels compostos que mostraven activitat citotòxica selectiva també se'n va determinar la inhibició de l'activitat enzimàtica de FASN. La majoria de compostos sintetitzats van mostrar una activitat citotòxica ($IC_{50} < 50 \mu M$) superior a la del compost de referència EGCG ($IC_{50} = 149 \mu M$) en la línea cel·lular de càncer de mama SKBr3 (FASN +++). Es va observar una correlació entre els nivells de FASN de les línees cel·lulars utilitzades i l'activitat citotòxica dels compostos estudiats. Els compostos van resultar ser menys citotòxics a mesura que els nivells de FASN disminuïen. Aquesta tendència es destacà sobretot en els compostos G28UCM i el G37UCM (Taula 3). Aquestes dades ens suggeriren que hi ha una relació entre la inhibició directa de FASN i l'activitat citotòxica dels nous compostos [70].

Per tal de descartar una inespecificitat de la mort cel·lular induïda pels nous inhibidors, es va determinar els efectes citotòxics del G28UCM i el G37UCM en cèl·lules no tumorals (fibroblasts i adipòcits). Es tractaren aquestes cèl·lules amb els inhibidors G28UCM i G37UCM amb dosis dues vegades superiors al valor de la seva IC_{50} en cèl·lules tumorals i no es varen observar efectes significatius ni en la mort cel·lular ni

en canvis morfològics, en canvi l'EGCG en les mateixes condicions va produir una mort cel·lular massiva en les cèl·lules no malignes.

Taula 3. Activitat biològica dels nous inhibidors G28UCM i G37UCM

COMPOST	Estructura	Citotoxicitat en cèl·lules tumorals (IC ₅₀ µM)			Citotoxicitat en cèl·lules no tumorals (IC ₅₀ µM)		Inhibició de l'activitat de FASN %
		[Nivells d'expressió de FASN]			[Nivells d'expressió de FASN]		
		SKBr3 [+++]	MCF-7 [+]	MDA-MB-231 [+ / -]	N1 [-]	Adipòcits [-]	
EGCG		149 ± 20	205 ± 7	197 ± 20	125 ± 44	>100	20
G28UCM		21 ± 7	46 ± 18	79 ± 4	>100	>100	90
G37UCM		29 ± 0.3	44 ± 16	63 ± 11	>100	>100	69

Resum

L'expressió i l'activitat de la sintasa d'àcids grassos (FASN) s'ha convertit en un fenotip comú en la majoria de carcinomes humans, especialment el càncer de mama i la seva expressió està estretament vinculada a la via de senyalització d'HER2. En conseqüència, el desenvolupament d'inhibidors de FASN, emergeix com una nova teràpia antidiària en el tractament del càncer. L'ús clínic dels inhibidors de FASN, com la cerulenina, el C75 i l'epigallocatequina 3-gal·lat (EGCG), es veu limitat per l'anorèxia, la inducció de pèrdua de pes o per la seva baixa potència i estabilitat *in vivo*. Aquest treball es centra en el disseny i el desenvolupament de G28UCM, compost d'una nova família d'inhibidors sintètics de FASN, com també l'activitat d'aquest inhibidor tant *in*

vitro com *in vivo* en un model de càncer de mama humà amb sobreexpressió de FASN i d'HER2.

Així, podem dir que el G28UCM és un inhibidor potent de l'activitat de FASN, presenta una elevada citotoxicitat en models cel·lulars de càncer de mama. A més, de manera preliminar el tractament amb G28UCM mostra una reducció del volum dels tumors FASN/HER2+ en comparació amb els animals no tractats, i els animals tractats no presenten pèrdua de pes ni toxicitat cardíaca.

ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES

Issue: *Toward Personalized Medicine for Cancer***Novel anti-fatty acid synthase compounds with anti-cancer activity in HER2⁺ breast cancer**G. Oliveras,¹ A. Blancafort,¹ A. Urruticoechea,² O. Campuzano,¹ D. Gómez-Cabello,³ R. Brugada,¹ M. L. López-Rodríguez,⁴ R. Colomer,³ and T. Puig¹¹Institut d'Investigació Biomèdica de Girona – Facultat de Medicina, Girona, Spain. ²Institut Català d'Oncologia, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, Barcelona, Spain. ³Centro Oncológico MD Anderson España, Madrid, Spain. ⁴Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, Madrid, SpainAddress for correspondence: Teresa Puig, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona, Universitat de Girona, Girona, Spain. mtpuig@iconcologia.net

Fatty acid synthase (FASN) expression and activity has emerged as a common phenotype in most human carcinomas, including breast cancer, and its expression is tightly linked to HER2 signaling pathways. The development of inhibitors of FASN activity has consequently appeared as a novel antitarget modality for treating cancer. However, the clinical use of FASN inhibitors, such as cerulenin, C75, and epigallocatechin 3-gallate (EGCG), is limited by anorexia and induced body weight loss or by its low *in vivo* potency and stability. Here, we summarize the design and development of G28UCM, the lead-compound of a novel family of synthetic FASN inhibitors, with both *in vitro* and *in vivo* activity in a human breast cancer model of FASN⁺ and HER2⁺.

Keywords: breast cancer; fatty acid synthase (FASN); novel anti-FASN compounds; HER2; preclinical study

New approaches to cancer treatment: lipogenesis and cancer

Since the 1920s, cancer cells have been known to exhibit an altered metabolism; currently, it is known that this point is crucial for both cancer cell survival and anticancer drug development. One hallmark of malignant cells is their higher rate of energy-consuming processes due to the increased protein and DNA synthesis needed to maintain cell division.¹ In 1924, Warburg and colleagues observed that cancer cells consume glucose through an anaerobic pathway in order to produce lactic acid (the Warburg effect),² providing malignant cells with an advantage in the tumor microenvironment.³ This enhanced anaerobic glycolysis produces an excess of pyruvate that is transformed into lactate and acetyl-CoA. The high proliferation ratio of cancer cells increases their need for fatty acids (FA) as substrates for the biosynthesis of phospholipids, which are essential constituents of biological membranes and are involved in protein acylation and energy production through β -oxidation.⁴

FA are present as metabolic substrates in normal cells and are stored as triglycerides (TG) in adipose tissue. The body's pool of FA comes from different sources, both exogenous (e.g., dietary FA) and endogenous, including both the hydrolysis of TG (from adipose tissue) and the lipogenic pathway (*de novo* synthesis). Thus, this constitutes one of the important metabolic differences between normal and cancer cells. While most human tissues prefer using exogenous lipids for the synthesis of new structural lipids (including phospholipids, TG, and cholesterol esters), and so fatty acid synthase (FASN) expression is low, it has been reported that in cancer cells, FA were derived mainly from *de novo* synthesis.⁵ The imperative need of cancer cells to synthesize FA has promoted the selection of two regulatory enzymes—FASN and acetyl-CoA carboxylase (ACC)—and one intermediate enzyme, malonyl-CoA, as drugable targets as a new approach to cancer treatment. Accordingly, FASN expression and activity have emerged as a common phenotype in most human cancer cells and is mostly absent in the corresponding normal cells.⁶ Since the 1990s,

mounting evidence has pointed to an important role of FASN in cancer cell survival, progression, and malignity. FASN has emerged as a prognosis biomarker in breast, prostate, and other carcinomas and we have shown that its inhibition is specifically cytotoxic for human cancer cells.^{5,7} Although part of these effects could be due to the accumulation of malonyl-CoA,⁸ similar effects have been observed by inhibiting other lipogenic enzymes, suggesting that lipogenesis has an important role in the cancer physiopathology.⁹ In summary, FASN plays an essential role in energy homeostasis and could be a good target for the development of both anti-obesity and anticancer agents.

FASN expression and regulation in normal and cancer cells

FASN (E.C.2.3.1.85) is a homodimeric multienzymatic protein of 250–270kD divided into seven functional domains, assembled into two homodimers.¹⁰ Through a series of 32 reactions, FASN is able to synthesize long chain fatty acids (LCFA), mainly palmitate, using acetyl-CoA and malonyl-CoA as substrates and NADPH as an electron donor.¹¹

FASN is expressed mainly in lipogenic tissues, in some hormone-sensitive cells (e.g., lactating mammary glands, cycling endometrium, and seminal vesicles), in various specialized cell types (type II alveolar cells to produce surfactant, hypothalamus to control food intake), and in proliferating fetal cells.^{12,13} In adults, lipogenesis is required primarily for the following: (1) to store excess of energy ingested as carbohydrates by generating TG; (2) to synthesize fat from other substrates (carbohydrate or protein) in fat-deficient diets; or (3) to produce FA in special tissues or situations such as the synthesis of medium chain fatty acids in lactation. Taking into account these functions, the role of FASN in a well-nourished population is not of great significance, as dietary lipids cover the requirements to maintain homeostasis.¹⁴ In normal cells, FASN expression remains at low levels and its regulation is complex and highly dependent on nutritional status and on the hormonal profile.¹¹ To summarize, FASN is activated by nutritional status and its expression is mediated by different signaling pathways, such as the phosphoinositide-3 kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/

ERK1/2) pathways that modulate the expression and maturation status of the transcriptional factor sterol response element binding proteins (SREBP-1) to produce SREBP-1c, which modulates FASN gene maturation and expression¹⁵ (Fig. 1A).

The first signal that FA in cancer cells were due to *de novo* synthesis was sent out in the 1950s, when Medes and colleagues¹⁶ determined that most of the FA esterified in tumors were FASN products (approximately 93% of FA originated from TG). In general, cancer cells are characterized by an exacerbated anaerobic glycolysis accompanied by an activation of the glycolytic enzymes² and also by an increased level of synthesis of FA that correlates with an overexpression and hyperactivity of lipogenic enzymes such as FASN.¹⁷ This phenotype seems to give to malignant cells an advantage for survival and growth in the microenvironment of biological and metabolic tumors.¹⁸ FASN overexpression and hyperactivation have been described in many cancers and commonly correlate with a higher rate of recurrence and a lower chance of survival.¹⁹ Using immunohistochemistry analysis, high levels of FASN have been observed in many preneoplastic lesions, including breast, pancreas, prostate, colon, and lung cancer. The pathways responsible for FASN overexpression in cancer cells are not yet well understood. Four different mechanisms have been proposed: enhanced transcription, increased translation, greater stability of proteins, and gene amplification.⁷ These mechanisms may be active at the same time and may prevent FASN from its physiological regulation, thus resulting in a constitutive activation of the lipogenic pathway in tumors. FASN regulation at the transcriptional level is one of the most studied mechanisms. It involves mainly growth factors/growth factor receptors (GF/GFR) and steroid hormones/steroid hormone receptors (SH/SHR), although new players such as hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1 α) and p53 family members have recently been implied in the regulation of FASN expression. It is important to notice that at the transcriptional level, the expression of FASN in both normal and cancer cells occurs in most cases through the same signaling pathways (PI3K/AKT/mTOR and MAPK/ERK1/2) by promoting the binding of SREBP-1c to its responding elements in the FASN promoter. The main difference between normal and cancer cells is the stimuli that activate the signaling cascades (Fig. 1B).

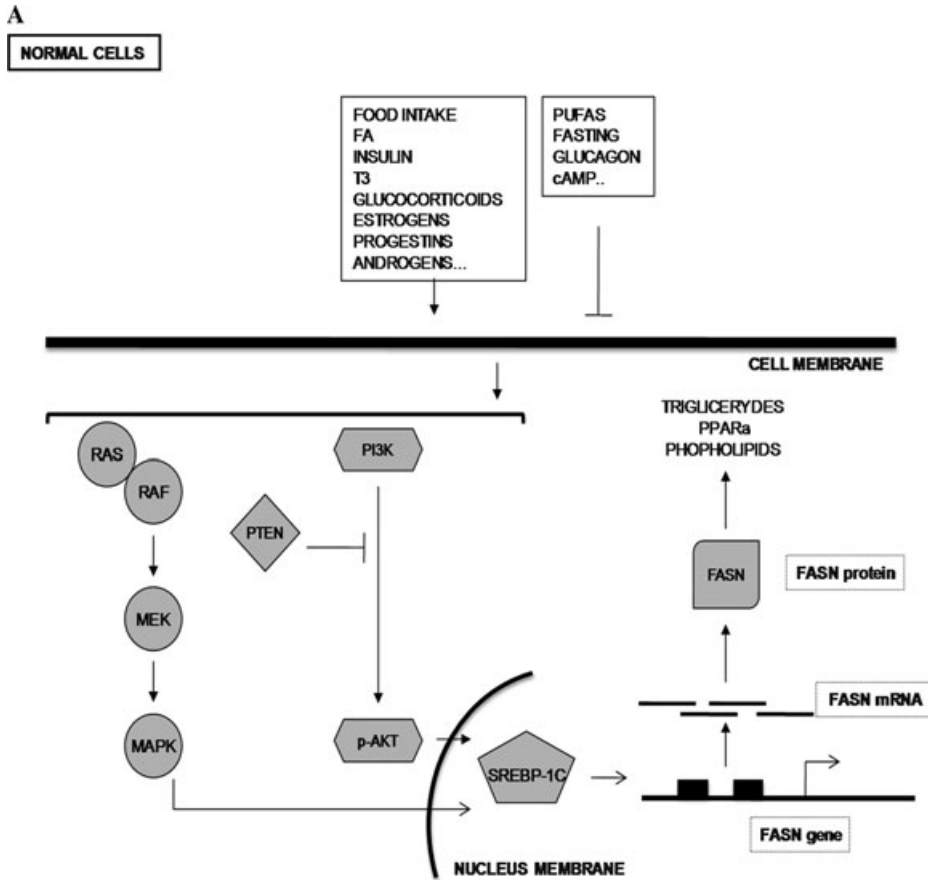


Figure 1. FASN regulation in normal and cancer cells. (A) FASN expression in normal cells is dependent on nutritional and hormonal status. FASN transcription is upregulated by food intake, fatty acids (FA), or hormones and downregulated by polyunsaturated fatty acids (PUFAS), cAMP, or fasting (glucagon). These stimuli activate different cascades, such as the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) or mitogen-activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase (MAPK/ERK1/2) pathways, which finally modulate the expression and maturation status of the sterol regulatory element-binding protein 1C (SREBP-1C). The active form of SREBP1C is translocated into the nucleus where it can bind to the FASN promoter responding elements. (B) In cancer cells, the growth factors (GF) or steroid hormones (SH)—sterols, androgens or progesterone—lead, through their receptors (GFR/SHR), to downstream PI3K/AKT, MAPK/ERK1/2, or mTOR signaling pathways by, finally, promoting the binding of SREBP-1C to its responding elements in the FASN promoter region. FASN expression in cancer cells is also activated by the tumor microenvironment (hypoxia and acidosis) through the upregulation of the hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), which induces the AKT activation. Other proteins, such as p53 or SPOT14, are able to increase FASN transcription. FASN expression can also be achieved at the posttranslational level through interaction with USP2a, a preproteasomal ubiquitin-specific protease that, by removing ubiquitin from FASN, strongly stabilizes FASN protein. All these pathways can occur simultaneously in cancer cells. (Figure taken from Relat & Puig.⁴¹)

In cancer cells, FASN is insensitive to nutritional signals and SREBP-1c expression and activation is driven by aberrant GF/GFR and SH/SHR levels or impaired signaling pathways.^{5,18}

FASN: a biomarker and a druggable target

FASN expression and activity have been shown to be a common phenotype in most human tumor

cells, and it has been demonstrated that FASN plays an essential role in tumor growth and survival.²⁰ In prostate and breast cancer, several studies have demonstrated an association between FASN expression and the prognosis of the disease. In stage I breast cancer, patients with high levels of FASN show a fourfold increased risk of death from this pathology than patients with lower FASN protein levels.²¹ In

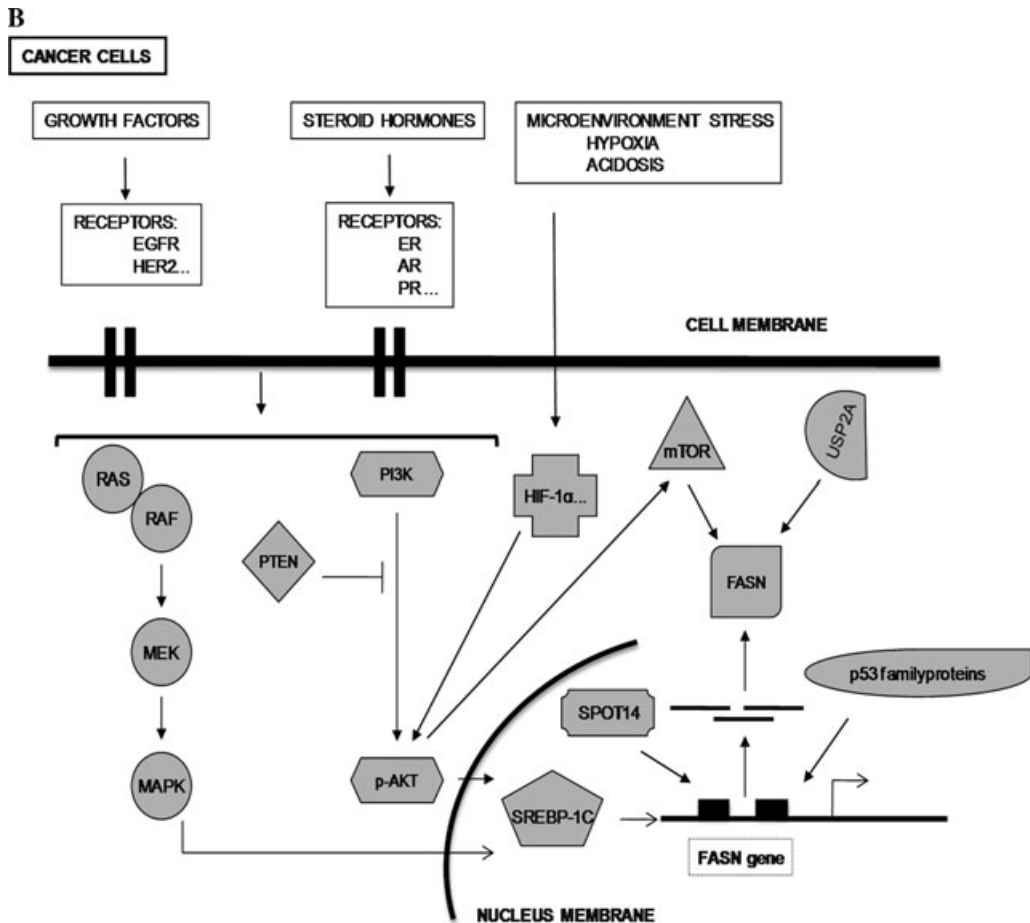


Figure 1. Continued.

prostate cancer, FASN expression correlates with a fourfold risk of recurrence and an increased Gleason grade and risk of death from the disease. It has been shown that this risk raises up to 12-fold when PTEN is deleted.²² FASN expression has also been associated with HER2 expression in poor prognosis tumors.²³ Recently, an ELISA assay has been developed to show the positive correlation between circulating levels of FASN and the disease's degree.²⁴ However, further studies will be necessary to deepen in the role of FASN expression in the cancer prognosis and the usefulness of determining FASN in serum or in tumor samples as pathologic markers for diagnoses or for predicting the progression of the disease.

Recent studies have sought to describe the effect of FASN activity inhibition on the cell cycle status. The fact is that the disruption of *de novo* FA synthesis

impairs their DNA synthesis and cell cycle progression. Many efforts have been made into developing pharmacological anti-FASN activity compounds. At a molecular level, different pathways have been modified by FASN inhibition and it has been shown that cancer cell death can also be increased if FASN inhibitors are combined with inhibitors of FASN-related signaling cascades (e.g., PI3K/AKT, HER2, and mTOR).^{22,25} In addition to cell arrest, FASN inhibition causes cancer cell death.²⁶ The inhibition of FA synthesis using siRNA against FASN or ACC reduces the incorporation of phospholipids into membranes, causing morphological changes in cells and ultimately leading to apoptosis of breast and prostate cancer cells without affecting nonmalignant cells.⁸ It has been observed that FASN inhibition (using siRNAs or small molecules) causes ER stress and activation of an unfolded protein

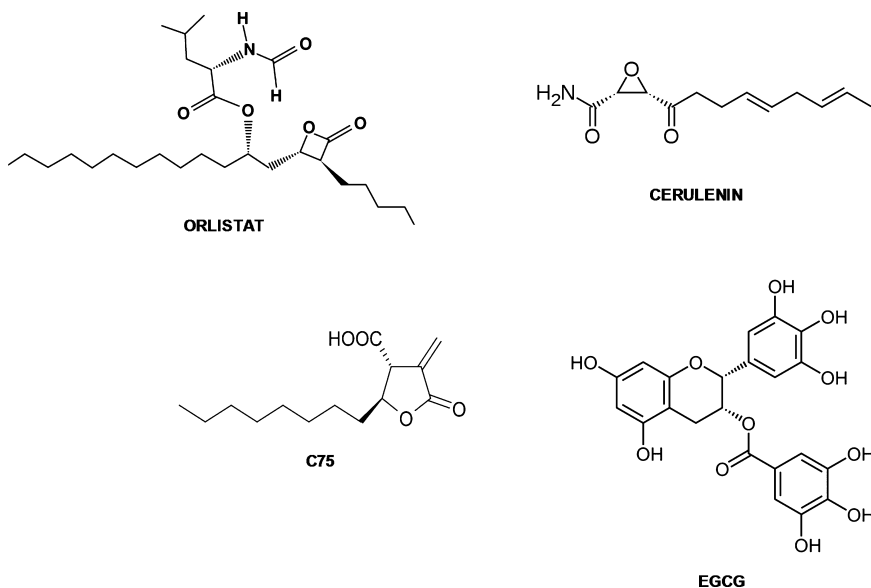


Figure 2. Chemical structure of the FASN inhibitors.

response (UPR), inducing cell death.²⁷ FASN inhibition also causes an increase of malonyl-CoA levels that could result in an accumulation of malonyl-CoA or toxic lipid intermediates that finally induce cell death.⁸ Finally, FASN overexpression is associated with the palmitoylation of signaling proteins, so that the interference of this pathway may also induce apoptosis.²⁸

In summary, many reasons point to FASN as a novel druggable target against cancer. Thus, many efforts have been put toward developing inhibitors of FASN activity as novel anticancer compounds, alone or combined with other anticancer drugs.

Preclinical development of FASN inhibitors

The most studied FASN inhibitors are cerulenin and its synthetic derivative C75 (Fig. 2). Cerulenin [2S,3R]-2,3-epoxy-4-oxo-7,10-dodecadien oxylamide] is a mycotoxin metabolite derived from *Cephalosporium caerulens*,¹⁴ which covalently blocks the β -ketoacyl synthase activity (KS) of FASN, thus avoiding condensation between the acyl intermediate and malonyl-CoA. It has been reported that cerulenin is able to delay the progression of breast, ovarian, and prostate human cancer xenografts.²⁹ Because of the cerulenin chemical instability caused by a reactive epoxide group and the poor systemic availability of cerulenin, two

structurally related synthetic molecules were developed: C75 and C93.^{26,29} C75 is a cerulenin-derived compound that lacks the reactive epoxide group (Fig. 2).²⁹ C75 was initially synthesized as an inhibitor of mammalian FASN and structurally related to malonyl-CoA. Although initially it provides the first evidence of *in vivo* growth tumor reduction after FASN inhibition,²⁹ its clinical development as an antitumor agent has been discarded owing to the side effects produced. The use of C75 *in vivo* is limited by anorexia and body weight loss, which we and others have associated with the stimulation of carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1), the enzyme responsible for the regulation of mitochondrial fatty acid oxidation.³⁰ C93 is a C75 analogue that blocks the KS domain of FASN without stimulating FA oxidation or causing body weight loss.³¹ This improvement makes it possible to treat animals more frequently than with C75 and also increases the effectiveness of the treatment. Another advantage of C93 is that it can be administered orally.³² Orlistat is a β -lactone that was first approved as an anti-obesity drug. Orlistat targets gastrointestinal lipases and inhibits FASN by blocking its TE activity domain, which is responsible for releasing palmitate.³³ Although it has been demonstrated that Orlistat inhibits the growth of a prostate tumor xenograft,³⁴ its poor solubility and bioavailability seem to limit the

Table 1. Structure and biological activity of novel polyphenolic compound

Compound	EGCG		G28UCM	
	Cancer cell cytotoxicity (IC ₅₀ (μM)) [FASN/HER2 expression levels]			
	AU565 [++++]	MCF-7 [+]	MDA-MB-231 [±]	Inhibition of FASN activity (% of control)
EGCG	190 ± 20	205 ± 7	197 ± 15	20
G28UCM	30 ± 5	46 ± 18	79 ± 4	90

use of orlistat as an antitumor drug. It has also been observed that Orlistat suppresses endothelial cell proliferation and angiogenesis by inhibiting FASN.³⁵

Polyphenols constitute a wide group of different molecular structures: catechins, flavones, anthocyanidins, anthraquinones, lignans, coumarins, and tannins. Some tea polyphenols (black tea and green tea) are able to control body weight, inhibit cancer cell growth, diminish fat accumulation in the liver and blood, and act as antioxidants. These polyphenols function through many different mechanisms, including the following: inducing apoptosis, stimulating lipid metabolism, inhibiting lipases, regulating thermogenesis, controlling food intake, and blocking FASN activity.³⁵

Polyphenolic catechins are the main components of green tea and include epicatechin (EC), epicatechin 3-gallate (ECG), epigallo-catechin (EGC), and epigallocatechin-3-gallate (EGCG), which is considered the main player in relation to the therapeutic properties of green tea and is also the most abundant variety (Fig. 2). Recent studies have reported that EGCG, the main polyphenolic catechin of green tea, and other naturally occurring flavonoids (such as luteolin, quercetin, and kaempferol) inhibit FASN, induce apoptosis of several tumor cell lines *in vitro*, and reduce the size of mammary tumors in animal models.³⁶ We have recently reported a simultaneous comparison of the cellular, molecular, and functional effects on the key fatty acid metabolism enzymes FASN and CPT-1 of C75 versus EGCG in breast cancer cells.^{9,37,38} We showed that EGCG achieves all cellular, functional, and molecular antitumor effects of known FASN inhibitors but, unlike C75, it did not increase CPT-1 activity. However, the *in vivo* effect of EGCG might be limited by its IC₅₀ value, as well as its relative instability under the slightly neutral or alkaline physiological

conditions,¹³ which may be illustrated by the limited activity of green tea in prostate cancer clinical trials. Based on the chemical structure of EGCG, we have recently reported the synthesis and biological evaluation of a new series of polyphenolic derivatives, which has resulted in the identification of two potent FASN inhibitors with high antitumor activity *in vitro*.³⁹ Novel compounds were selected based on their FASN activity inhibition and their selective cancer cell cytotoxicity in a panel of human breast cancer cells composed by AU565, MCF-7, and MDA-MB-231, as *in vitro* models of high (++++), moderate (+), and low (±) levels of FASN expression, respectively. We observed that two of the novel polyphenolic compounds were quite superior to EGCG in terms of cancer cytotoxicity and FASN activity inhibition.⁴⁰ Among them, G28UCM was selected because of its high FASN activity inhibition, its potent and selective cancer cell cytotoxicity (Table 1), its ability to induce apoptosis in a FASN/HER2+ breast cancer model, and finally its marked inhibition of HER2-related signaling pathways compared to EGCG.⁴⁰ We have preformed preliminary experiments to evaluate the pharmacological interaction between G28UCM and different anti-HER agents against FASN⁺ and HER2⁺ breast cancer cells (AU565 cells), and the potential effectiveness of G28UCM in an *in vivo* animal study of breast cancer FASN⁺/HER2⁺ xenograft. Preliminary results indicate that intraperitoneal G28UCM treatment (40 mg/kg/day) of animals exhibited marked tumor volume reduction compared with the vehicle treated control animals without any changes in FASN protein expression analyzed by immunohistochemistry. Importantly, no significant weight loss or anorexia was identified after 45 days of daily G28UCM-treatment in the experimental group. Hematoxylin-eosin and picosirius red stains of the myocardium showed no significant structural alterations between

the control and G28UCM-treated animals (work in progress). Our preliminary findings provide a rationale for the preclinical development of G28UCM, alone or in combination, as a suitable new agent for treating HER2-overexpressing breast cancer.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Clemens, M.J. 2004. Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. *Oncogene* **23**: 3180–3188.
- Warburg, O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science* **123**: 309–314.
- Kuhajda, F.P. 2000. Fatty-acid Synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* **16**: 202–208.
- Kuhajda, F.P. 2006. Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res.* **66**: 5977–5980.
- Milgram, F.P., L.A. Witters, G.R. Pasternack & F.P. Kuhajda. 1997. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in situ breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **3**: 2115–2120.
- Swinnen, J.V., K. Brusselmans & G. Verhoeven. 2006. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **9**: 358–365.
- Thupari, J.N., M.L. Pinn & F.P. Kuhajda. 2001. Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**: 217–223.
- Brusselmans, K., E. De Schrijver, G. Verhoeven & J.V. Swinnen. 2005. RNA interference mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase- α gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res.* **65**: 6719–6725.
- Smith, S. 1994. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J.* **8**: 1248–1259.
- Little, J.L. & S.J. Kridel. 2008. Fatty acid synthase activity in tumor cells. *Subcell. Biochem.* **49**: 169–194.
- Kusakabe, T., M. Maeda, N. Hoshi, *et al.* 2000. Fatty acid synthase is expressed mainly in adult hormone-sensitive cells or cells with high lipid metabolism and in proliferating fetal cells. *Histochem. Cytochem.* **48**: 613–622.
- López, M., C.J. Lelliott & A. Vidal-Puig. 2007. Hypothalamic fatty acid metabolism: a housekeeping pathway that regulates food intake. *Bioessays* **29**: 248–261.
- Weiss, L., G.E. Hoffmann, R. Schreiber, *et al.* 1986. Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance: purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **367**: 905–912.
- Porstmann, T., B. Griffiths, Y.L. Chung, *et al.* 2005. PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene* **24**: 6465–6481.
- Medes, G., A. Thomas & S. Weinhouse. 1953. Metabolism of neoplastic tissue IV: a study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Res.* **13**: 27–29.
- Szutowicz, A., J. Kwiatkowski & S. Angielski. 1979. Lipogenic and glycolytic enzyme activities in carcinoma and non-malignant diseases of the human breast. *Br. J. Cancer* **39**: 681–687.
- Menendez, J.A. & R. Lupu. 2007. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **7**: 763–777.
- Visca, P., V. Sebastiani, C. Botti, *et al.* 2004. Fatty acid synthase (FASN) is a marker of increased risk of recurrence in lung carcinoma. *Anticancer Res.* **24**: 4169–4173.
- Puig, T., R. Porta & R. Colomer. 2009. Fatty acid synthase: a new anti-tumor target. *Med. Clin.* **132**: 359–363.
- Wang, Y., F.P. Kuhajda, J.N. Li, *et al.* 2001. Fatty acid synthase (FASN) expression in human breast cancer cell culture supernatants and in breast cancer patients. *Cancer Lett.* **167**: 99–104.
- Bandyopadhyay, S., S.K. Pai, M. Watabe, *et al.* 2005. FASN expression inversely correlates with PTEN level in prostate cancer and a PI 3-kinase inhibitor synergizes with FASN siRNA to induce apoptosis. *Oncogene* **24**: 5389–5395.
- Zhang, D., L.K. Tai, L.L. Wong, *et al.* 2005. Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER2/neu-positive breast cancer. *Mol. Cell Proteomics* **4**: 1686–1696.
- Wang, Y., F.P. Kuhajda, L.J. Sokoll & D.W. Chan. 2001. Two-site ELISA for the quantitative determination of fatty acid synthase. *Clin. Chim. Acta.* **304**: 107–115.
- Liu, X., Y. Shi, V.L. Giranda & Y. Luo. 2006. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway sensitizes MDA MB468 human breast cancer cells to cerulenin-induced apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* **5**: 494–501.
- Pizer, E.S., C. Jackisch, F.D. Wood, *et al.* 1996. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **56**: 2745–2747.
- Little, J.L., F.B. Wheeler, D.R. Fels, *et al.* 2007. Inhibition of fatty acid synthase induces endoplasmic reticulum stress in tumor cells. *Cancer Res.* **67**: 1262–1269.
- Fiorentino, M., G. Zadra, E. Palescandolo, *et al.* 2008. Overexpression of fatty acid synthase is associated with palmitoylation of Wnt1 and cytoplasmic stabilization of beta-catenin in prostate cancer. *Lab. Invest.* **88**: 1340–1348.
- Kuhajda, F.P., E.S. Pizer, J.N. Li, *et al.* 2000. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 3450–3454.
- Wortman, M.D., D.J. Clegg, D. D'Alessio, *et al.* 2003. C75 inhibits food intake by increasing CNS glucose metabolism. *Nat. Med.* **9**: 483–485.
- Orita, H., J. Coulter, C. Lemmon, *et al.* 2007. Selective inhibition of fatty acid synthase for lung cancer treatment. *Clin. Cancer Res.* **13**: 7139–7145.
- Orita, H., J. Coulter, E. Tully, *et al.* 2008. Inhibiting fatty acid synthase for chemoprevention of chemically induced lung tumors. *Clin. Cancer Res.* **14**: 2458–2464.
- Kridel, S.J., F. Axelrod, N. Rozenkrantz & J.W. Smith. 2004. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with anti-tumor activity. *Cancer Res.* **64**: 2070–2075.
- Menendez, J.A., L. Vellon & R. Lupu. 2005. Orlistat: from antiobesity drug to anticancer agent in Her-2/neu

- (erbB-2)-overexpressing gastrointestinal tumors? *Exp. Biol. Med.* **230**: 151–154.
34. Browne, C.D., E.J. Hindmarsh & J.W. Smith. 2006. Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by orlistat, a fatty acid synthase inhibitor. *FASEB J.* **20**: 2027–2035.
35. Lin, J.K. & S.Y. Lin-Shiau. 2006. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. *Mol. Nutr. Food Res.* **50**: 211–217.
36. Jatoi, A., N. Ellison, P.A. Burch, *et al.* 2003. A phase II trial of green tea in the treatment of patients with androgen independent metastatic prostate carcinoma. *Cancer* **97**: 1442–1446.
37. Puig, T., A. Vázquez-Martín, J. Relat, *et al.* 2008. Fatty acid metabolism in breast cancer cells: differential inhibitory effects of epigallocatechin gallate (EGCG) and C75. *Breast Cancer Res. Treat.* **109**: 471–479.
38. Puig, T., J. Relat, P.F. Marrero, *et al.* 2008. Green tea catechin inhibits fatty acid synthase without stimulating carnitine palmitoyltransferase-1 or inducing weight loss in experimental animals. *Anticancer Res.* **28**: 3671–3676.
39. Colomer, R., T. Puig, J. Brunet, *et al.* 2007. Novel polyhydroxylated compounds as fatty acid synthase (FASN) inhibitors. European Patent EP07110956.5.
40. Puig, T., C. Turrado, B. Benhamú, *et al.* 2009. Novel Inhibitors of Fatty Acid Synthase with Anticancer Activity. *Clin Cancer Res.* **15**: 7608–7615.
41. Relat, J. & T. Puig. 2010. *Frontiers in Drug Design and Discovery.* **5**: 211–235.

Article 2

"A novel inhibitor of fatty acid synthase shows activity against HER2+ breast cancer xenografts and is active in anti-HER2 drug-resistant cell lines"

En aquest treball es van analitzar *in vitro* les interaccions cel·lulars i moleculars del compost G28UCM (prèviament seleccionat d'un conjunt de compostos sintetitzats; article 1) i els fàrmacs anti-HER existents (trastuzumab, lapatinib, erlotinib, gefitinib i cetuximab) en un model cel·lular de càncer de mama que presenta un fenotip FASN/HER2 positiu (AU565).

Entre un 25 i un 30% dels tumors de mama són HER2+ i gran part d'aquests desenvolupen resistència al trastuzumab durant el primer any de tractament. La resistència terapèutica dels tumors de càncer de mama HER2+ representa un problema de salut important donada la falta de tractaments curatius per a aquest grup de pacients. Basant-nos en aquesta realitat clínica vam desenvolupar en al laboratori uns models cel·lulars, partint de les cèl·lules AU565, resistents a trastuzumab (AU565**TR**) i a lapatinib (AU565**LR**) com a eina d'estudi de l'eficàcia antitumoral del G28UCM en aquestes cèl·lules resistents als fàrmacs anti-HER.

In vivo, utilitzant un model animal de ratolins atímics, vam realitzar xenoempelts amb les cèl·lules humanes de càncer de mama BT474 (FASN/HER2 positives) per tal d'avaluar l'eficàcia i el perfil de toxicitat del G28UCM.

Resum

Introducció. La inhibició de la sintasa d'àcids grassos (FASN) provoca apoptosi a les cèl·lules de càncer de mama. Aquesta inhibició de FASN està relacionada amb la via de senyalització del receptor del factor de creixement epidèrmic 2 (HER2), tal i com s'ha observat en models d'expressió simultània de FASN i HER2 .

Mètodes. En un model de xenotrasplantament de cèl·lules de carcinoma de mama FASN+ i HER2+, vam caracteritzar l'activitat anticancerígena i el perfil de

toxicitat de G28UCM, compost seleccionat d'una família d'inhibidors sintètics de FASN. *In vitro*, es van analitzar les interaccions cel·lulars i moleculars de la combinació de G28UCM amb fàrmacs anti-HER (trastuzumab, lapatinib, erlotinib, gefitinib i cetuximab). A més, vam determinar la capacitat citotòxica de G28UCM en cèl·lules de càncer de mama resistents a trastuzumab (AU565**TR**) o lapatinib (AU565**LR**), desenvolupades al nostre laboratori.

Resultats. *In vivo*, G28UCM va reduir la mida de 5 dels 14 tumors establerts. Als tumors que van respondre, es va observar inhibició de l'activitat de FASN, apoptosi (fragmentació de PARP) i una disminució de la p-HER2, p-AKT i p-ERK1/2. Els ratolins tractats amb G28UCM, no van presentar cap efecte tòxic significatiu (toxicitat hepàtica, cardíaca, etc.) ni es va observar pèrdua de pes. *In vitro* el G28UCM va mostrar interaccions sinèrgiques amb trastuzumab, lapatinib, erlotinib o gefitinib (però no amb cetuximab). Això es correlacionava amb l'augment de l'apoptosi i amb la disminució de l'activació d'HER2, ERK 1/2 i AKT. En les cèl·lules de càncer de mama resistents a trastuzumab (AU565**TR**) i lapatinib (AU565**LR**), en les quals ni el trastuzumab ni el lapatinib hi tenien activitat, G28UCM mantenia l'activitat citotòxica observada en les cèl·lules AU565 no resistents.

Conclusions. G28UCM inhibeix el creixement dels tumors de mama sense produir pèrdua de pes. G28UCM és citotòxic en cèl·lules que han adquirit resistència a fàrmacs anti-HER2, per tant G28UCM es converteix en un candidat ideal, sol o en combinació, per seguir amb el seu desenvolupament preclínic com agent antitumoral en tumors HER2 positius i tumors que han progressat a la malaltia.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

A novel inhibitor of fatty acid synthase shows activity against HER2+ breast cancer xenografts and is active in anti-HER2 drug-resistant cell lines

Teresa Puig^{1,2*}, Helena Aguilar³, Sílvia Cufí¹, Glòria Oliveras¹, Carlos Turrado⁴, Sílvia Ortega-Gutiérrez⁴, Bellinda Benhamú⁴, María Luz López-Rodríguez⁴, Ander Urruticoechea³ and Ramon Colomer⁵

Abstract

Introduction: Inhibiting the enzyme Fatty Acid Synthase (FASN) leads to apoptosis of breast carcinoma cells, and this is linked to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) signaling pathways in models of simultaneous expression of FASN and HER2.

Methods: In a xenograft model of breast carcinoma cells that are FASN+ and HER2+, we have characterised the anticancer activity and the toxicity profile of G28UCM, the lead compound of a novel family of synthetic FASN inhibitors. *In vitro*, we analysed the cellular and molecular interactions of combining G28UCM with anti-HER drugs. Finally, we tested the cytotoxic ability of G28UCM on breast cancer cells resistant to trastuzumab or lapatinib, that we developed in our laboratory.

Results: *In vivo*, G28UCM reduced the size of 5 out of 14 established xenografts. In the responding tumours, we observed inhibition of FASN activity, cleavage of poly-ADP-ribose polymerase (PARP) and a decrease of p-HER2, p-protein kinase B (AKT) and p-ERK1/2, which were not observed in the nonresponding tumours. In the G28UCM-treated animals, no significant toxicities occurred, and weight loss was not observed. *In vitro*, G28UCM showed marked synergistic interactions with trastuzumab, lapatinib, erlotinib or gefitinib (but not with cetuximab), which correlated with increases in apoptosis and with decreases in the activation of HER2, extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 and AKT. In trastuzumab-resistant and in lapatinib-resistant breast cancer cells, in which trastuzumab and lapatinib were not effective, G28UCM retained the anticancer activity observed in the parental cells.

Conclusions: G28UCM inhibits fatty acid synthase (FASN) activity and the growth of breast carcinoma xenografts *in vivo*, and is active in cells with acquired resistance to anti-HER2 drugs, which make it a candidate for further pre-clinical development.

Introduction

Fatty acid synthase (FASN) is a multifunctional enzyme that is essential for the endogenous synthesis of long-chain fatty acids from its precursors acetyl-CoA and malonyl-CoA [1]. Blocking FASN activity causes cytotoxicity in human cancer cells overexpressing FASN [2-13]. The proposed oncogenic properties of FASN seem to be the result of an increased activation of HER2 and its downstream related phosphoinositide-3 kinase/

protein kinase B (PI3K/AKT) and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK1/2) signalling cascades or to the mammalian target of rapamycin protein (mTOR) signaling pathway [4,5,8,13-20]. FASN can also inhibit the intrinsic pathway of apoptosis [21] and has been recently proposed as a direct target of p53 family members, including p63 and p73 [22]. FASN inhibition may also disrupt the membrane lipid rafts that anchor HER2 [23]. In the past, FASN inhibitors with antitumour activity have been limited by either cross-activation of β -oxidation,

* Correspondence: teresa.puig@udg.edu

¹Institut d'Investigació Biomèdica de Girona, E-17071 Girona, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

which produces *in vivo* anorexia and body weight loss [9,24-28], or low potency [29,30].

The molecular mechanisms of resistance to anti-HER2 therapies in breast carcinomas have been reviewed recently [31,32]. These include loss of PTEN [33], predominance of the p95^{HER2} expression [34], mTOR/PI3K/AKT hyperactivation [35], IGF-IR overexpression [36], and *in vivo* conversion of HER2+ to HER2- carcinoma after neoadjuvant trastuzumab [37]. The limited experimental evidence available shows that, in cancer cells, a cross-regulation between FASN and HER2 exists [3,5], and also that pharmacological blockade of FASN with C75 can overcome acquired resistance to trastuzumab [38].

We have recently described a novel family of anti-FASN compounds that exhibit *in vitro* anticancer activity, which do not exhibit cross-activation of β -oxidation, and do not induce weight loss in animals [13]. In the current study, we have characterised molecularly the *in vivo* anticancer activity of G28UCM in a model of FASN+/HER2+ breast carcinoma. In addition, we have evaluated the pharmacological interaction of G28UCM with anti-HER drugs, such as trastuzumab, lapatinib, erlotinib, gefitinib or cetuximab, at the cellular and molecular levels. Finally, we report the effect of G28UCM on breast cancer cells resistant to trastuzumab or lapatinib. Our data support the study of G28UCM as a potential therapeutic agent, either alone or in combination, against *in vivo* HER2+ tumours that have progressed on trastuzumab and lapatinib.

Materials and methods

Chemicals, reagents and antibodies

Erlotinib (Tarceva[®]), gefitinib (Iressa[®]) and lapatinib (Tyverb[®]) were provided by Roche (Roche, London, UK), AstraZeneca (AstraZeneca, London, UK) and GlaxoSmithKline (GlaxoSmithKline, Middlesex, UK), respectively, and were restored in dimethyl sulfoxide (DMSO), diluted in culture medium at 1:10,000 and stored at -20°C. Trastuzumab (Herceptin[®], Hoffmann-La Roche Pharma, Basel, Switzerland) and cetuximab (Erbix[®], Merk-Serono, Darmstadt, Germany), provided by the Division of Pharmacy of the Catalan Institute of Oncology (Girona, Spain), were directly diluted in cell culture medium at 1:1,000 or 1:10,000 and were stored at 4°C. EGCG, EDTA, dithiothreitol, acetyl-CoA, malonyl-CoA, NADPH and 3,4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The primary antibody for FASN immunoblotting was a mouse IgG₁ FASN monoclonal antibody from BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA). Monoclonal anti- β -actin mouse antibody (clone AC-15) was from Sigma. Rabbit monoclonal antibodies against mTOR and phospho-mTOR^{Ser2448} were

from Cell Signaling Technology (Beverly, MD, USA). Rabbit polyclonal antibodies against PARP, ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase), phospho-ERK1/2^{Thr202/Tyr204}, AKT, phospho-AKT^{Ser473}, and mouse monoclonal p185^{HER-2/neu} were from Cell Signaling Technology. Peroxidase conjugated secondary antibody was from Calbiochem (San Diego, CA, USA). 1,3-bis((3,4,5-thihydroxybenzoyl)oxy)naphthalene (G28UCM) was synthesized as previously described [13].

Cell culture and cell lines

BT474 and AU565 breast carcinoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). BT474 cells were cultured in DMEM-F12 (Gibco, Berlin, Germany) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, HyClone Laboratories, Logan, Utah, USA), 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate, 50 U/mL penicillin, and 50 μ g/mL streptomycin (Gibco). AU565 cells were routinely grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco) supplemented as above. Trastuzumab-resistant cells (AU565TR) were developed [39,40] by exposing AU565 cells continuously to trastuzumab (0.4 μ M for pool 0.4 and 2 μ M for pool 2) for six months. Cells per plate were then pooled together and sensitivity to trastuzumab was determined by treating AU565 parental (AU565WT) and resistant (AU565TR) cells with 2 μ M trastuzumab and performing trypan blue exclusion assay periodically during 10 days. Thus, cell pools which were resistant to trastuzumab were maintained in 2 μ M trastuzumab, a concentration at which parental cells were not viable. To develop lapatinib-resistant cells (AU565LR), AU565 cells were treated for one month with an initial dose of 3.5 μ M of lapatinib (IC₄₀ of lapatinib in AU565WT cells), at which time the dose of lapatinib was increased up to 7 μ M for five months. AU565LR cells were maintained in 7 μ M lapatinib, a concentration at which AU565 parental cells were not viable.

Growth inhibition and dose-response studies

Dose-response studies were done using standard colorimetric MTT reduction assay. Parental AU565 and trastuzumab- and lapatinib-resistant AU565 cells were plated out at a density of 7×10^3 cells/100 μ L/well in 96-well microtitre plates. Following overnight cell adherence, the medium was removed and fresh medium along with the corresponding concentrations of FASN inhibitors (EGCG and G28UCM) or anti-HER agents (trastuzumab, cetuximab, erlotinib, gefitinib and lapatinib) were added to the cultures. For the drug-combination experiments a dose concentration of G28UCM (5 to 40 μ M) and EGCG (20 to 150 μ M) plus different fixed concentrations of trastuzumab, cetuximab, erlotinib,

gefitinib and lapatinib, were added to the microtitre culture plates. The concentrations of the anti-HER2 agents were determined from dose-response experiments in AU565 cells (data not shown). Agents were not renewed during the entire period of cell exposure (48 h for erlotinib, gefitinib or lapatinib and 72 h for trastuzumab or cetuximab), and control cells without agents were cultured under the same conditions with comparable media changes. Following treatment, the media was replaced by drug-free medium (100 μ L/well) containing MTT solution (10 μ L, 5 mg/ml in PBS), and incubation was prolonged for 3 h at 37°C. After carefully removing the supernatants, the formazan crystals formed by metabolically viable cells were dissolved in DMSO (100 μ L/well) and the absorbance was determined at 570 nm in a multi-well plate reader (Model Rosyf Anthos 2010, Anthos Labtec B.V., Heerhugowaard, Nederland). Using control optical density (OD) values (C), test OD values (T), and time zero OD values (T_0), the compound concentration that caused 50% growth inhibition (IC_{50} value) was calculated from the equation, $100 \times ((T - T_0)/(C - T_0)) = 50$. The data presented are from three separate wells per assay and the assay was performed at least three times.

Isobologram analysis of drug interactions

The interactions of G28UCM and EGCG with anti-HER2 drugs (trastuzumab, lapatinib, gefitinib, erlotinib and cetuximab) were evaluated by the isobologram method as we have previously published [41,42]. Briefly, the concentration of one agent producing a 30% inhibitory effect is plotted on the horizontal axis, and the concentration of another agent producing the same degree of effect is plotted on the vertical axis; a straight line joining these two points represents zero interaction (addition) between two agents. The experimental isoeffect points were the concentrations (expressed relative to the IC_{30} concentrations) of the two agents that when combined kill 30% of the cells. When the experimental isoeffect points fell below that line, the combination effect of the two drugs was considered to be supra-additive or synergistic, whereas antagonism occurs if the experimental isoeffect points lie above it. Within the designed assay range, a set of isoeffect points was generated because there were multiple FASN inhibitors and anti-target agent concentrations that achieved the same isoeffect. A quantitative index of these interactions was provided by the equation $I_x = (A/a) + (B/b)$, where, for this study, a and b represent the respective concentrations of FASN inhibitors (EGCG or G28UCM) and anti-HER2 agents (trastuzumab, cetuximab, erlotinib, gefitinib and lapatinib) required to produce a fixed level of inhibition (IC_{30}) when administered alone, and A and B represent the concentrations required for the same

effect when the drugs were administered in combination, and I_x represents an index of drug interaction (interaction index). I_x values of < 1 indicate synergy, a value of 1 represents addition, and values of > 1 indicate antagonism. For all estimations of I_x , we used only isobologs where intercept data for both axes were available.

Western blot analysis of tumour and cell lysates

Cells and animal tumour tissues were collected and lysed in ice-cold lysis buffer containing 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 100 μ g/mL PMSEF, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma). A sample was taken for measurement of protein content by Lowry-based BioRad assay (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) and either used immediately or stored at -80°C. Total protein extracts were immunoblotted using 3% to 8% SDS-PAGE (FASN, p185^{HER2/neu}, phospho-p185^{HER2/neu}, mTOR and phospho-mTOR) or 4% to 12% SDS-PAGE (AKT, phospho-AKT, ERK1/2 and phospho-ERK1/2 and PARP), transferred to nitrocellulose membranes and blocked for 1 h in blocking buffer at room temperature (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 (3 \times 5 minutes), blots were incubated for 1 h with the corresponding secondary antibody and revealed, employing a commercial kit (West Pico chemiluminescent substrate). Blots were re-probed with an antibody for β -actin to control for protein loading and transfer.

In vivo studies: human breast tumour xenograft experiments

Experiments were conducted in accordance with guidelines on animal care and use established by Biomedical Research Institute of Bellvitge (IDIBELL) Institutional Animal Care and Scientific Committee. The BT474 cell line was selected for the *in vivo* studies due to its high constitutive FASN and HER2 expression and its *in vivo* behavior, as we have previously reported [13]. A dose of G28UCM of 40 mg/Kg was chosen for efficacy experiments. Ten female mice were included in the control group and 14 in the G28UCM-treated group. Tumour xenografts were established by subcutaneous injection of 10×10^6 BT474 cells mixed in Matrigel (BD Bioscience, Bedford, MA, USA) into the flank. Tumours were allowed to increase up to a size of 150 to 250 mm³. Mice were treated by intraperitoneal injection daily with 40 mg/Kg of G28UCM or vehicle for 45 days. Mice were weighed once per week, tumours were measured daily with electronic calipers, and tumour volumes were calculated by the formula: $(\pi/6 \times (v1 \times v2 \times v2))$, where

v1 represents the largest tumour diameter, and v2 the smallest one. At the end of the experiment, animals were weighed and all mice were euthanized, and tumours, brain, lung, heart, liver, spleen, intestine and kidney tissues and serum were stored at -80°C .

In vivo studies: animal toxicity experiments

Experiments were conducted in accordance with guidelines on animal care and use established by Biomedical Research Institute of Bellvitge (IDIBELL) Institutional Animal Care and Cientific Committee (AAALAC unit 1155). The study protocol has received ethical approval. Female athymic nude BALB/c mice (four to five weeks old, 23 to 25 g) were purchased from Harlan Laboratories (France), fed *ad libitum* with a standard rodent chow and housed in a light/dark 12 h/12 h cycle at 22°C in a pathogen-free facility for one week. Animals were randomized into four groups of six animals each: control, 5, 40 and 75 mg/Kg G28UCM-treated animals. Each group received daily a single intraperitoneal (i.p.) injection (0.5 mL) of G28UCM (5, 40 and 75 mg/Kg) or vehicle alone (DMSO), dissolved in RPMI 1640 medium. The body weight was registered daily for 45 days. On day 45 animals were sacrificed and renal (urea and creatinin) hepatic (aspartate transaminase, alanine trasaminase and alkaline phosphatase) function markers, and hematological parameters (% neutrophils, % lymphocytes, % monocytes, % platelets, hemoglobine and % hematocrit) were determined in serum of control and G28UCM-treated animals.

Ex vivo immunohistochemistry of FASN

Immunohistochemical staining for FASN was performed using a rabbit monoclonal antibody anti-FASN (Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA). Briefly, paraffin-embedded tissue sections of control and G28UCM-treated xenografts were deparaffinized, rehydrated, and blocked with 2% hydrogen peroxide for endogenous peroxidase. Slides were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and blocked with 20% horse serum (JRH Bioscience, Lexena, KS, USA). Slides were then incubated with anti-FASN antibody overnight at 4°C . After additional PBS washes, sections were sequentially incubated at room temperature for 45 minutes with biotin-labeled antirabbit IgG (Envision + R System Labelled Polymer-HRP anti-rabbit, Dako, Aachen, Germany). Slides were washed with PBS and incubated with diaminobenzidine (DAB, Sigma Chemical, St. Louis, MO). Finally, slides were counterstained with Hematoxylin-eosin, dehydrated, cleared and cover-slipped. FASN expression was categorized as negative (no or weak expression) or positive (strong expression). Appropriate positive and negative controls were included in each run of immunohistochemistry. All immunohistochemically

stained slides were interpreted by a pathologist blinded to other data.

Fluorescent *in situ* hibridation (FISH)

Cytospin slides of AU565 parental and resistant cells to trastuzumab or lapatinib were prepared. The HER2 FISH pharmDX™ Kit (Dako, Aachen, Germany) was used as directed by the manufacturer. Slides were heated in Pre-Treatment Solution for 10 minutes, and digested with ready-to-use pepsin at room temperature for 5 to 10 minutes. A ready-to-use FISH probe mix was hybridised onto slides. This probe mix consists of a mixture of Texas Red-labelled DNA probes covering a 218 kb region including the HER2 gene on chromosome 17 (CEN17), and a mixture of fluorescein-labelled peptide nucleic acid (PNA) probes targeted at the centromeric region of CEN17. The specific hybridisation to the two targets results in formation of a distinct red fluorescent signal at each HER2 gene locus and a distinct green fluorescent signal at each chromosome 17 centromere. After a stringent wash with the buffer the slides were mounted with fluorescent mounting medium containing DAPI and coverslipped. Twenty nuclei were assessed for HER2 and CEN17. The ratio of average HER2 to average CEN17 copy number was calculated. Gene amplification was defined when the FISH ratio HER2 signal/CEN17 signal was > 2 .

Statistical analysis

Results were analysed by Student's *t*-test or by one-way ANOVA using a Tukey test as a post-test. Statistical significant levels were $P < 0.05$ (denoted as *) and $P < 0.005$ (denoted as**). All data are means \pm standard deviation (SD) or \pm standard error (SE). All observations were confirmed by at least three independent experiments.

Results

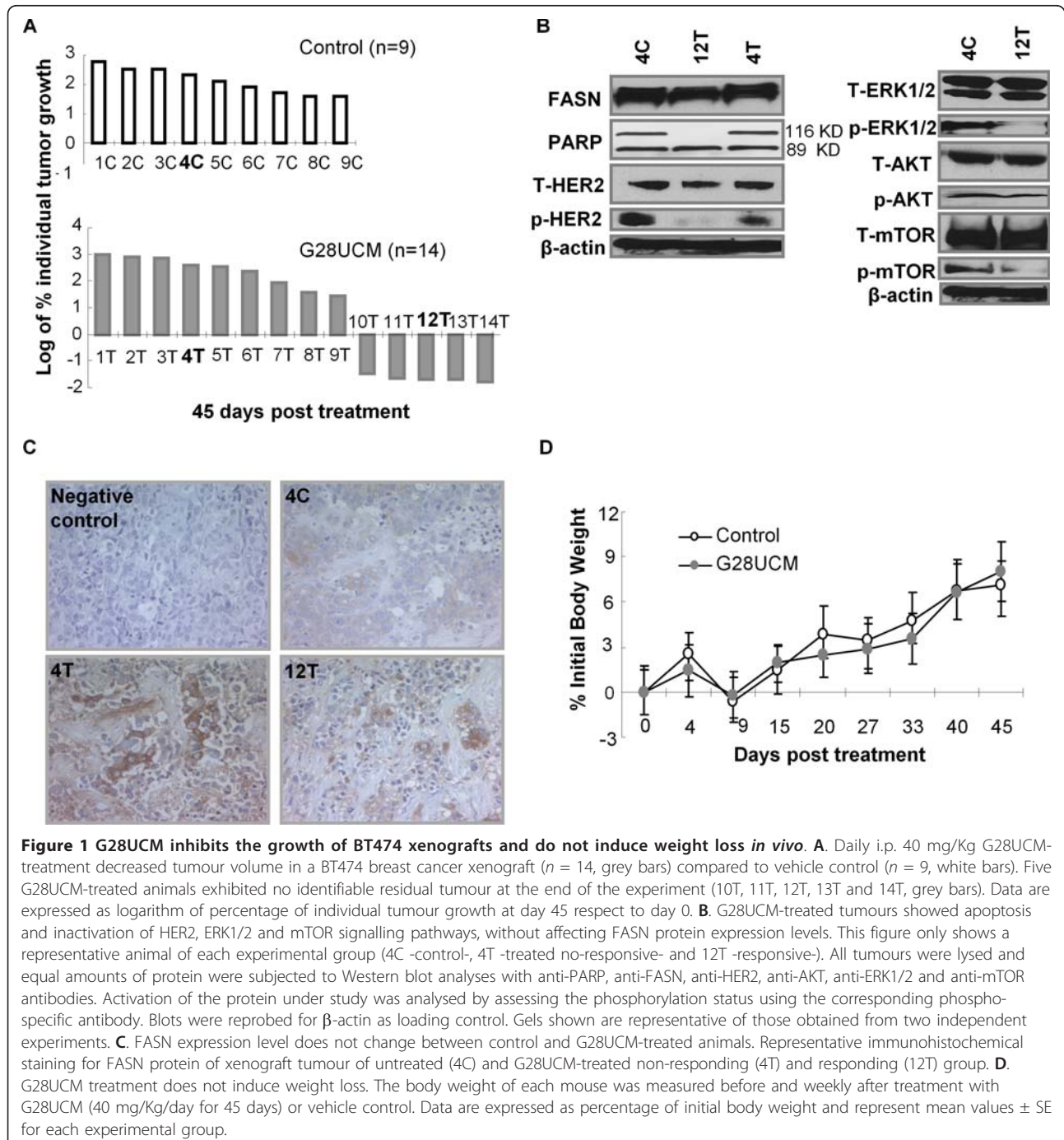
Efficacy of G28UCM against breast carcinoma xenografts

Blocking FASN activity causes cytotoxicity in human cancer cells overexpressing FASN [2-13]. The proposed oncogenic properties of FASN seem to be the result of an increased activation of HER2 and its downstream related signaling pathway proteins [4,5,8,13-20]. Because the *in vitro* studies were carried out for short-term periods, we further evaluated *in vivo* the long-term effect of G28UCM, a novel pharmacological inhibitor of FASN. BT474 human FASN+ and HER2+ breast carcinoma xenografts served as the tumour target for the *in vivo* studies. In all control animals, BT474 xenografts grew in size, reaching volumes at day 45 which were from 50% to 600% of the volumes at day 0 (first day of G28UCM treatment). The median size of the tumours when the experiments started was $127.4 \pm 25.1 \text{ mm}^3$. In the

experimental animals, we observed two clear groups: in five cases, the xenografts experimented tumour volume reductions ranging from -20% to -90% (10T, 11T, 12T, 13T and 14T, Figure 1A), while in nine cases tumour growth was observed.

To analyse the activation of HER2 and its downstream related phosphoinositide-3 kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and mitogen-activated protein kinase/

extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK1/2) signalling cascades or to the mammalian target of rapamycin protein (mTOR) signalling pathway, we performed Western blotting and immunohistochemical analysis of each individual animal tumour. Apoptosis and induction of caspase activity were checked with cleavage of poly-ADP-ribose polymerase (PARP) in Western blotting analysis. Apoptosis was not detected in



the tumours of control (C) and treated (T) animals with non-responding tumours. In contrast, in the tumours of G28UCM- responding animals, there was an increase in the levels of 89 kDa PARP product. Figure 1B shows the results of some representative tumours of each experimental group. We next examined the effects of G28UCM on HER2 and its related downstream proteins AKT, ERK1/2 and mTOR. Tumours that showed a response to G28UCM had a marked decrease in phosphorylated HER2, ERK1/2 and mTOR proteins and, to a lesser extent in phosphorylated AKT, without detectable changes in the total levels of the corresponding proteins. Figure 1B shows a representative result of each experimental group.

We also analysed FASN protein expression levels of each individual animal tumour. Results in Figure 1B depict FASN levels from one representative animal of the control group (4C, Figure 1A) and two G28UCM-treated animals (4T and 12T, Figure 1A). No significant changes in FASN protein levels were observed in any of the samples, as assessed both by Western blotting (Figure 1B) and either by immunohistochemical staining (Figure 1C). With respect to *ex vivo* FASN enzymatic activity (see Additional file 1), however, the experimental tumours that had a response to G28UCM (11T and 12T, Figure 1A) showed a decrease of $30.5 \pm 15\%$ compared with the control 4C tumour (see Additional file 2).

Toxicity studies

Previous first-generations of FASN inhibitors have been limited by inducing severe body weight loss, which is thought to be related to a parallel stimulation of fatty acid oxidation by these inhibitors [4,6,24-28]. To address this problem, G28UCM were designed to inhibit FASN activity without parallel stimulation of *in vitro* fatty acid oxidation [13]. In this study, animals treated for 45 days with G28UCM were weighed daily to evaluate *in vivo* body weight effect of the novel FASN inhibitor. With respect to control animals, we identified no significant changes on food and fluid intake or body weight after daily treatment with 40 mg/Kg of G28UCM for 45 days. The average weight of the animals at the beginning of

the study was 19.8 ± 1.7 g. At the conclusion of the study, control animals increased their weight by $7.15 \pm 0.8\%$ of pre-treatment weight, compared with $8.04 \pm 1.6\%$ for the G28UCM-treated animals (Figure 1D) which was not statistically significant.

Hepatic and renal function serum markers (aspartate transaminase, alanine transaminase, alkaline phosphatase, creatinin and urea) showed no significant alteration between control and experimental animals treated with G28UCM at daily doses of 5, 25 or 40 mg/Kg. Animals treated at doses of 75 mg/Kg, however, showed differences compared with control in their blood counts, in particular, increased neutrophils and platelet cells and decreased monocytes and lymphocytes (see Additional file 3 for hepatic, renal and hematological function serum markers of G28UCM-treated animals). Histological studies (Hematoxylin-Eosin, Masson's Trichrome, Sudan Black B and Picrosirius Red stains) of liver, heart, kidney, lung and brain showed no tissue structural abnormalities in G28UCM-treated animals when compared with control animals (data not shown).

In vitro cell growth interactions between G28UCM and anti-HER drugs

To determine how best to use G28UCM either as a single agent or in combination with anti-HER drugs, we conducted a series of *in vitro* studies to evaluate the inhibitory effects of G28UCM in combination with trastuzumab, cetuximab, erlotinib, gefitinib and lapatinib in a pre-clinical model of HER2-overexpressing breast cancer cells. The combined effect was analysed by the isobole method, using a series of isobologram transformations of multiple dose-response curves at an effect level of 30% (IC₃₀), a type of analysis that we have used previously [41,42]. Results in Table 1 show the median interaction index (I_x) of combinations between G28UCM with trastuzumab, cetuximab, erlotinib, gefitinib and lapatinib. Simultaneous treatment of AU565 cells with G28UCM and either trastuzumab, lapatinib, gefitinib or erlotinib resulted in a strong synergistic interaction (I_x = 0.519 ± 0.178 , I_x = 0.796 ± 0.144 , 0.882, I_x = 0.832 ± 0.161 and I_x = 0.735 ± 0.092 ,

Table 1 Synergy analysis of the interaction between G28UCM and anti-HER drugs in AU565 cells

plus	Anti-HER2			Anti-HER1	
	trastuzumab	lapatinib	gefitinib	erlotinib	cetuximab
G28UCM	synergism $0.5 \pm 0.2^{**}$	synergism $0.8 \pm 0.1^{**}$	synergism $0.8 \pm 0.2^*$	synergism $0.7 \pm 0.1^{**}$	antagonism $1.9 \pm 0.2^{**}$
EGCG	additivism 1.1 ± 0.5	antagonism $1.9 \pm 0.7^*$	antagonism $1.8 \pm 0.7^*$	antagonism $1.4 \pm 0.2^*$	antagonism $2.2 \pm 0.2^{**}$

The interaction index (I_x) for the two-drug effect in AU565 cells was calculated using isobologram analysis. The I_x parameter indicate whether the doses of the two drugs required to produce a given degree of cytotoxicity are greater than (I_x > 1 or antagonism) equal to (I_x = 1 or additivism) or less than (I_x < 1 or synergism) the doses that would be required if the effect of two agents were strictly additive. I_x values for the two drug treatment were obtained from triplicate studies. * (P < 0.05) and ** (P < 0.005) indicate the level of statistical significance of the I_x compared with an I_x of 1.0.

respectively). The combination of G28UCM plus cetuximab indicated a marked antagonistic interaction ($I_x = 1.913 \pm 0.243$). Under the same schedule, EGCG showed an additive interaction with trastuzumab ($I_x = 1.123 \pm 0.458$) and antagonistic interactions with lapatinib, gefitinib and erlotinib and cetuximab ($I_x = 1.875 \pm 0.691$, $I_x = 1.829 \pm 0.672$, $I_x = 1.393 \pm 0.229$, $I_x = 2.156 \pm 0.215$, respectively). Together, these data show that co-exposure of the FASN inhibitor G28UCM with drugs that exhibit anti-HER2 activity (but not with the specific anti-HER1 compound, cetuximab) is more active than either of the drugs used alone.

Molecular interactions between G28UCM and anti-HER drugs

To determine whether the molecular causes of the synergistic interactions between G28UCM and trastuzumab, lapatinib, cetuximab and erlotinib were triggered by changes in the phosphorylated forms of HER2 and its downstream signaling proteins, we analysed changes in apoptosis and HER2, AKT and ERK1/2 protein phosphorylated forms. First, we studied the cell death mechanism. Apoptosis and induction of caspase activity were checked by Western blotting analysis showing cleavage of PARP. The experiments were done at a concentration equal to the cytotoxicity IC_{50} value of G28UCM and anti-HER drugs (trastuzumab, lapatinib, cetuximab and erlotinib) in AU565 cells. Co-treatment of AU565 cells with G28UCM (30 μ M) plus trastuzumab (1 μ M)

during 24 h induced a marked increase in the levels of the PARP cleavage product (89 kDa band) compared to 24 h single agent (G28UCM or trastuzumab) treatment (Figure 2). The apoptotic effect of the combined regimes was validated by flow cytometry using the Annexin V-Alexa Fluor 488 staining (data not shown). Similar results in PARP cleavage were obtained when AU565 cells were co-treated with G28UCM (30 μ M) plus lapatinib (5 μ M) during 12 hours or plus erlotinib (8 μ M) during 24 hours (Figure 2). Therefore, we sought to compare the effects of combined treatments versus single drug treatments on HER2, AKT, and ERK1/2 activation. The phosphorylated form of HER2 (p-HER2) was noticeably decreased after 24 h exposure to G28UCM plus trastuzumab, and p-AKT protein decreased after 48 h of co-treatment with G28UCM and trastuzumab (Figure 3). Co-incubation of cells with G28UCM and lapatinib was significantly correlated with a decreased level of the phosphorylated form of HER2 (pHER2) and p-ERK1/2, which occurred as soon as 12 h after treatment compared to 12 h cell treatment with either G28UCM or lapatinib alone (Figure 3). Co-exposure of G28UCM plus erlotinib induced a decrease of p-HER2 and p-AKT after 24 hours (Figure 3). During all time-course co-treatment experiments no significant change either in the total level of the corresponding proteins (HER2, ERK1/2 and AKT) or in FASN levels was detected (Figure 3).

As we expected, under the same culture conditions, co-treatment of AU565 cells with G28UCM plus

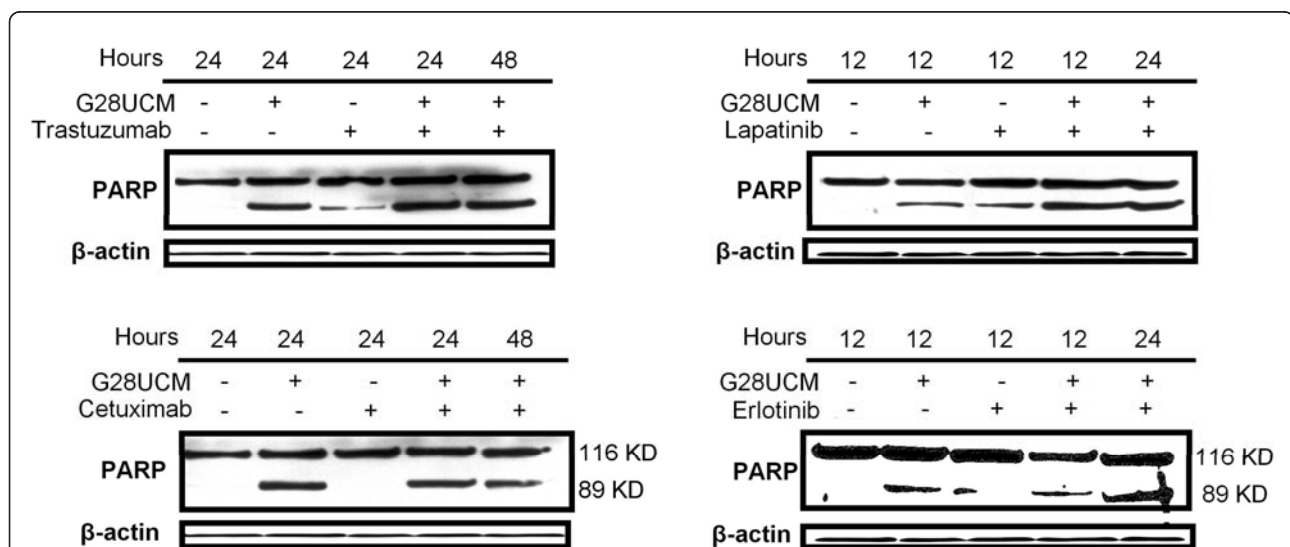


Figure 2 G28UCM plus trastuzumab, lapatinib and erlotinib induced apoptosis in AU565 breast cancer cells. Induction of caspase activity was confirmed by PARP cleavage. AU565 cells were treated with G28UCM (30 μ M) plus trastuzumab (1 μ M), lapatinib (5 μ M), erlotinib (8 μ M) or cetuximab (15 μ g/ml) for 12 and 24 h (G28UCM plus lapatinib or erlotinib), and 24 and 48 h (G28UCM plus trastuzumab or cetuximab), and equal amounts of lysates were immunoblotted with anti-PARP antibody which identified the 116 kDa (intact PARP) and the 89 kDa (cleavage product) bands. Blots were reprobbed for β -actin as loading control. Gels shown are representative of those obtained from two or three independent experiments.

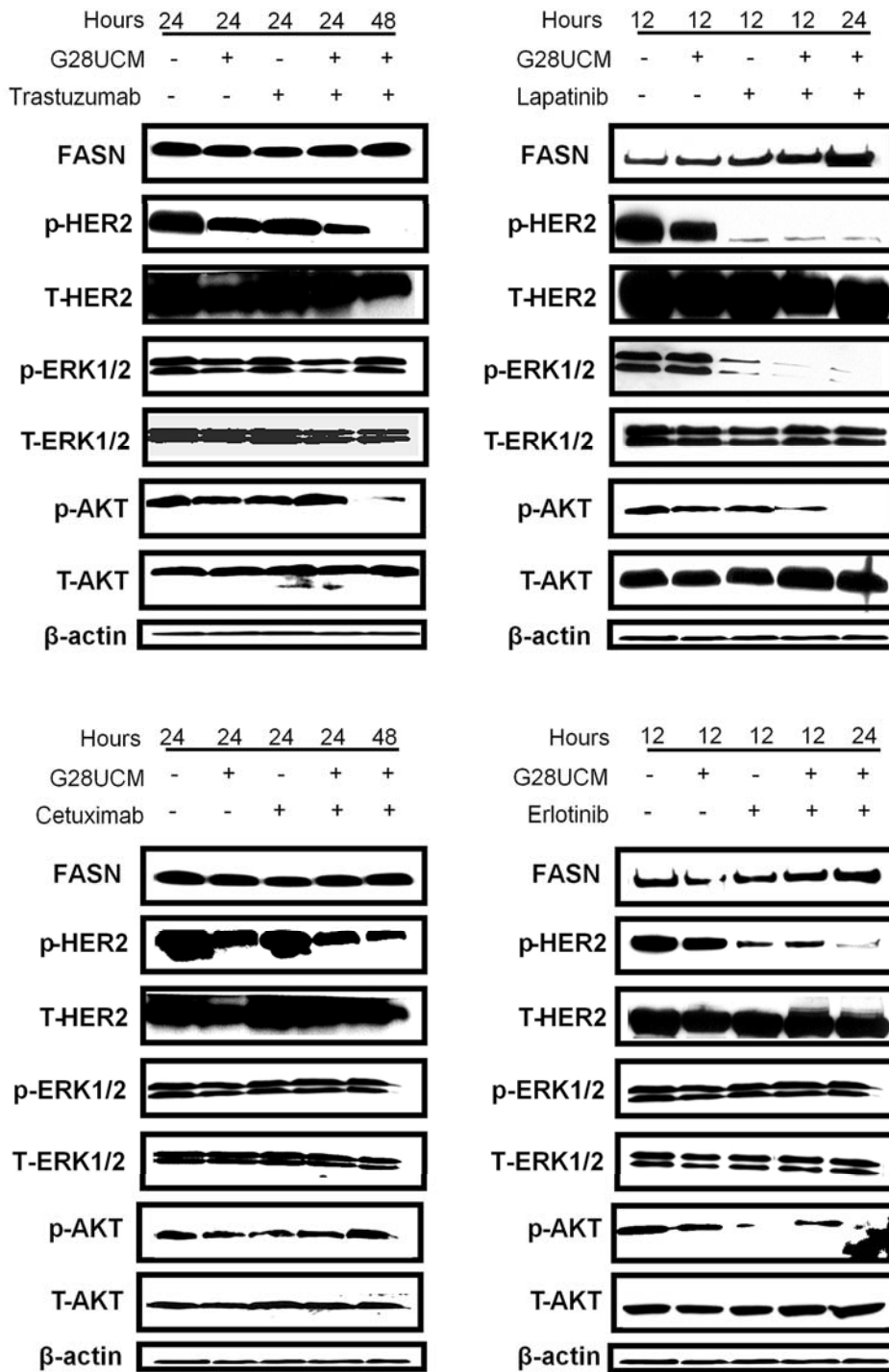


Figure 3 G28UCM plus trastuzumab, lapatinib and erlotinib blocked the activation of HER2, AKT or ERK1/2 proteins. AU565 cells were treated with G28UCM (30 μM) plus trastuzumab (1 μM), lapatinib (5 μM), erlotinib (8 μM) or cetuximab (15 μg/ml) for 12, 24, and 48 h, and equal amounts of lysates were immunoblotted with anti-FASN, anti-HER2, anti- AKT, and anti-ERK1/2 antibodies. Activation of the protein under study was analysed by assessing the phosphorylation status using the corresponding phospho-specific antibody. Blots were reprobed for β-actin as loading control. Gels shown are representative of those obtained from two or three independent experiments.

cetuximab (15 µg/mL) did not induce apoptosis (Figure 2) and did not block HER2 phosphorylation or its downstream related signal transduction pathways ERK1/2 and PI3K/AKT (Figure 3).

Effect of G28UCM on cells resistant to trastuzumab or lapatinib

The vast majority of HER2 positive advanced breast cancer patients develop resistance to trastuzumab based therapies within the first year of treatment. Consequently, identification of novel agents that inhibit the growth of trastuzumab-resistant cells/tumours is critical to improving the survival of metastatic HER2+ breast cancer. For this purpose, we extended our study to examine the anti-cancer effect of G28UCM on HER2+ breast cancer cells (AU565) that were continuously exposed in culture medium supplemented with trastuzumab (AU565TR) or lapatinib (AU565LR) over a period of at least six months. Trastuzumab resistant (AU565TR) or lapatinib resistant (AU565LR) cells were developed in our laboratory as described in the Materials and methods section. Sensitivity to trastuzumab was determined by treating AU565 parental and resistant cells to 2 µM trastuzumab and performing trypan blue exclusion assay periodically during 10 days (Figure 4A, left). A dose of 2 µM trastuzumab caused a significant cell death in AU565 cells ($70.2 \pm 5\%$), but the majority of AU565TR cells remained viable ($94.6 \pm 7\%$). Lapatinib resistance was confirmed by an MTT colorimetric assay (Figure 4A, right).

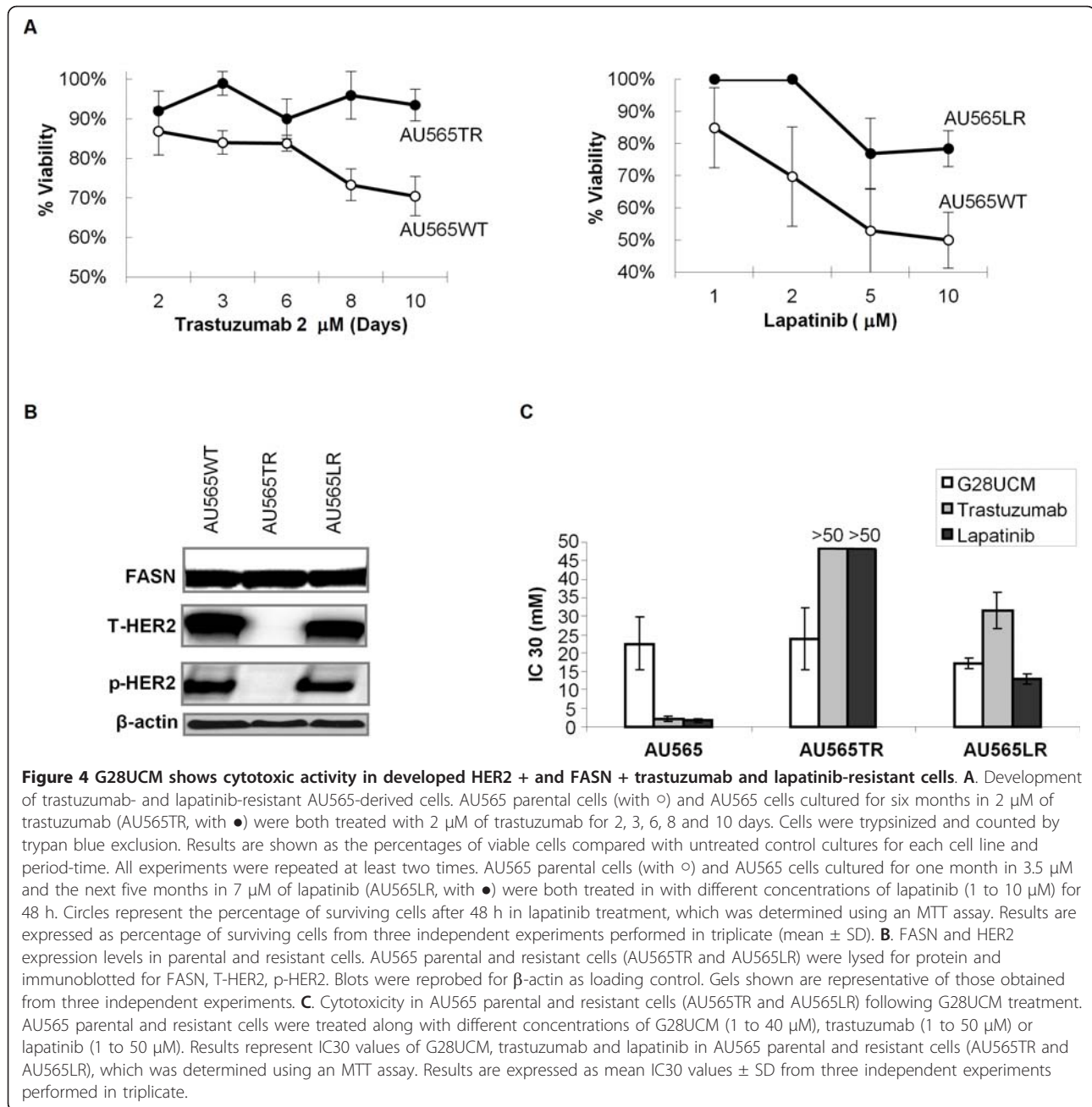
To eliminate the possibility that we have selected a population of resistant cells that do not possess HER2 gene amplification, we examined HER2 gene amplification by fluorescence *in situ* hybridisation using a method that determines oncogene copy number corrected to the number of copies of chromosome 17 (CEP17). The ratio of the average HER2 gene copy number to the average CEP17 gene copy number in AU565TR was 3.9, 4.9 in AU565WT, and 4.4 in AU565LR respectively, demonstrating that both trastuzumab and lapatinib resistant cells possess HER2 amplification similar as parental cells (Table 2).

Additionally, we performed immunoblotting experiments to determine HER2, phospho-HER2 (pHER2) and FASN protein levels in AU565TR and AU565LR cells. HER2 and pHER2 were down-regulated in AU565TR cells (Figure 4B). In AU565LR cells, protein levels of HER2 and pHER2 did not change compared with AU565WT cells and FASN levels were similar in the three cell lines (Figure 4B). To analyse the sensitivity of the resistant cells to G28UCM, we determined the growth inhibition effect of this compound by an MTT colorimetric assay, using trastuzumab and lapatinib as reference compounds. As expected, trastuzumab and

lapatinib had either no effect or a weak effect on growth inhibition of trastuzumab- and lapatinib-resistant cells, respectively (Figure 4C). For instance, while the IC₃₀ value of trastuzumab in AU565WT was 2 µM, AU565TR cells were insensitive to trastuzumab at the concentrations analysed (up to 50 µM of trastuzumab). The IC₃₀ value of lapatinib was increased from 1.6 µM in AU565WT to 14 µM in AU565LR (Figure 4C). Trastuzumab concentration necessary to achieve IC₃₀ value had to be increased about 16-fold in AU565LR (IC₃₀ = 31.5 ± 4.9 µM) compared to AU565WT (IC₃₀ = 2 ± 0.7 µM), and lapatinib had no cytotoxic activity in AU565TR cells using doses up to 50 µM (Figure 4C). Interestingly, G28UCM showed similar cytotoxic activity in parental (IC₃₀ = 22 ± 7 µM), trastuzumab- (IC₃₀ = 24 ± 8 µM) and lapatinib-resistant cells (IC₃₀ = 17 ± 2 µM). Taken together, these data suggest that inhibiting FASN activity may be a new therapeutic strategy in breast carcinomas with acquired resistance to anti-HER2 therapies.

Discussion

Treatment with G28UCM was associated with xenograft volume reductions from 20% to 90%, in 5 of 14 animals. The responding tumour tissues showed changes in apoptosis and in HER2-related signalling pathways. They showed an increase in the levels of 89 kDa PARP product, and the phosphorylated forms of HER2 (pHER2), ERK1/2 (pERK1/2) and mTOR (pmTOR) were almost abolished. These samples showed a decline in FASN enzymatic activity, but not total FASN levels. It is not clear why a substantial number of xenografts did not respond to G28UCM. The degree of interindividual variability in the response to G28UCM might be related to bioavailability, clonal variation or experimental design. Concerning bioavailability, G28UCM reached the target tissue in the responding xenografts, since the *in vivo* FASN inhibition was of 30% (see SD), which is similar to the reported intra-tumour 40% inhibition of FASN activity 12 hours after intraperitoneal injection of other FASN inhibitors [43]. Non-responding tumours, in contrast, had no detectable changes in apoptosis or pHER2, pERK or pmTOR expression after treatment with G28UCM. The observed inhibition was able to elicit clear molecular responses in at least one-third of the treated animals. Clonal variability of BT474 cells cannot be excluded. In fact, Sheridan *et al.* described that 80% of BT474 cells in culture expressed CD24, while 20% did not [44]. The relevance of CD24, a cell adhesion molecule, in our system is not clear. Furthermore, for the sake of therapeutic significance, our experimental design consisted of administration of G28UCM after the xenografts had reached a size of 100 to 150 mm³. It is possible that treating smaller tumours or administering



G28UCM at the same time as the human cells might translate into a less variable result. Future experiments will need to explore in detail the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the compound in this model, develop alternative animal and xenograft models, as well

as alternative routes of administration of the compound. These *in vivo* data seem to confirm that the oncogenic properties of FASN could be associated with an increased phosphorylation of HER2, and its related PI3K/AKT, MAPK/ERK1/2, and mTOR signaling

Table 2 FISH* analysis of HER2 gene copy number in AU565WT, AU565TR and AU565LR cells

CELL LINES	AU565WT	AU565TR	AU565LR
Ratio of average HER2 to average CEN17 gene copy number [†]	4.9	3.9	4.4

AU565WT, AU565 Wild Type; AU565TR, AU565 cells resistant to trastuzumab; AU565LR, AU565 cells resistant to lapatinib;

* FISH, fluorescence *in situ* hybridisation; [†] HER2/CEN17 > 2 indicates HER2 gene amplification.

cascades [4,5,8,13-20]. In this report we did not address the issue of the extent to which the effects of G28UCM are mediated by inhibition of FASN alone or by off-target effects, since we have reported previously on this relationship [13]. Future experiments, however, will address the specificity of G28UCM against FASN. This is particularly important since the parent molecule of G28UCM has been reported to have an array of biological activities, including the inhibition of gelatinase-B (MMP-2), NO synthase or aromatase enzymatic activities [45-47].

An important part of our *in vivo* results concerns the toxicity of G28UCM. We performed a long-term weight evaluation, and no significant effect on food and fluid intake or body weight was identified after daily treatment with 40 mg/Kg of G28UCM for 45 days. In addition, hepatic and renal function serum markers and histological studies of liver, heart, kidney, lung and brain showed no significant alterations between control and animals treated during 45 days with daily G28UCM. We suggest that the chemical structure of G28UCM may be more specific of the lipogenic pathway than cerulenin or its derivatives, which stimulate CPT-1 and accelerate fatty acid β -oxidation, which has been related to the severe decrease of food intake and induction of weight loss in rodents [24-28].

We found that the simultaneous treatment of FASN +/-HER2+ breast cancer cells with G28UCM plus trastuzumab or lapatinib (which involve predominantly HER2), resulted in a strong synergistic interaction, and that this was also observed with gefitinib or erlotinib (inhibitors of HER1 but also HER2 tyrosine kinase activities) [48,49]. In contrast, the combination of G28UCM with the monoclonal antibody cetuximab (which is HER1-specific) resulted in an antagonistic effect. Taken together, these results support that the interactions between FASN and HER proteins are restricted to HER2 and do not involve the HER1 receptor. On the other hand, EGCG showed only an additive interaction with trastuzumab and an antagonistic interaction with lapatinib, gefitinib, erlotinib and cetuximab, which may be in part related to the lower cytotoxic activity of EGCG by itself. We also addressed the molecular interactions of G28UCM, analysing FASN protein levels, apoptosis, and the phosphorylated forms of HER2, AKT and ERK1/2 proteins after G28UCM combined with trastuzumab, erlotinib, gefitinib or lapatinib treatment. Trastuzumab and HER tyrosine kinase inhibitors (lapatinib, gefitinib and erlotinib) displayed molecular synergistic interaction with G28UCM. This synergistic effect was accompanied by increased apoptosis and seemed to be mediated by abrogation of the activation of HER2, AKT and ERK1/2 when the drugs are combined. It is important that the synergistic molecular effects observed with

G28UCM in combination with trastuzumab, erlotinib, gefitinib or lapatinib followed the same pattern than the cellular effects. These *in vitro* cellular and molecular synergistic results support the *in vivo* evaluation of these agents in a combination regimen.

Finally, we used stable cell lines derived from the AU565 cells that were resistant to either trastuzumab (AU565TR) or lapatinib (AU565LR) to test the anticancer properties of G28UCM. In these cells, in which the cytotoxicity of trastuzumab and lapatinib were almost lost, we observed that the cytotoxic activity of G28UCM in the resistant cells and in the parental cells was similar. The activity of G28UCM in this model of resistance to anti-HER2 treatments is consistent with a previous report that observed that trastuzumab-resistant breast cancer cells were sensitive to EGCG [50]. Furthermore, our results also show that, even after long-term exposure to trastuzumab and lapatinib, resistant cells continued to overexpress FASN.

Conclusions

In summary, our findings provide a rationale for the pre-clinical development of G28UCM either alone or in combination with anti-HER agents (trastuzumab, lapatinib, erlotinib, gefitinib or cetuximab) in HER2-overexpressing breast cancer. In addition, we report the effect of G28UCM on breast cancer cells resistant to trastuzumab or lapatinib. Our data support the study of G28UCM as a potential therapeutic agent, either alone or in combination, against *in vivo* HER2+ tumours that have progressed on trastuzumab and lapatinib. Future studies will focus on testing the *in vivo* activity of G28UCM in mice bearing trastuzumab and lapatinib resistant xenografts.

Additional material

Additional file 1: Additional Material and methods on ex vivo FASN enzymatic activity assay.

Additional file 2: Figure. FASN activity decrease in G28UCM-treated responsive animal. Twelve hours after the last i.p. G28UCM injection, tumour tissues from a representative animal of control (4C) and G28UCM-treated responding group (12T) were minced and homogenized in ice-cold lysis buffer and FASN activity was assayed in particle-free supernatants by recording spectrophotometrically at 37°C the decrease of A340 nm due to oxidation of NADPH after the addition of malonyl-CoA as described in the Materials and methods section. Data are mean \pm SD from two separate experiments.

Additional file 3: Table. Hepatic, renal and hematological function serum markers of G28UCM-treated animals.

Abbreviations

AKT: protein kinase B; ANOVA: analysis of variance; CPT-1: carnitine palmitoyltransferase-1; EGCG: (-)-epigallocatechin-3-gallate; EGF: epidermal growth factor; FASN: fatty acid synthase; FISH: fluorescent *in situ* hybridation; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; MAPK/ERK1/2: mitogen-

activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase; i.p.: intraperitoneal; mTOR: mammalian target of rapamycin protein; MTT: 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; PARP: poly-ADP-ribose polymerase; PBS: phosphate-buffered saline; PI3K: phosphatidylinositol-3-OH-kinase; SREBP-1c: sterol regulatory element-binding.

Acknowledgements

Financial support was provided by the Spanish Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (FIS PI082031, RC, TP, AU), the Susan G. Komen Breast Cancer Foundation (PDF-0504073, RC), the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICCIN, CIT-090000-2008-10 TP and SAF-2007-67008-C02-01, MLLR), Comunidad Autónoma de Madrid (S-SAL-249-2006, MLLR), and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM08, IJ and TP). This work was also supported by the *Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer* of the ISCIII (RTICC; RD06-0020-0028), Spanish Ministry of Science and Innovation & European Regional Development Fund (ERDF) "Una manera de hacer Europa". SO-G has been supported by the Ramón y Cajal program of MICINN (RyC-07-039-04-02). HA has been supported by ISICIII (CD07/00257). MICINN awarded CT with an FPU predoctoral grant. The Catalan Agency for Grants in Research and Universities (AGAUR) and the European Social Funds (FSE) awarded SC with an FPI predoctoral grant. TP and AU received additional support from a Clàudia Elias award of the *Fundació Institut Català d'Oncologia* in 2008.

We would like to thank Dr. Francesc Soler, Division of Pharmacy of Catalan Institute of Oncology (Girona, Spain), for kindly supplying trastuzumab and cetuximab, and Prof. R. de Llorens (Universitat de Girona) for supplying gefitinib. We are also grateful to Dr. J. Bernadó and Dr. E. López (Pathology Department, Hospital Josep Trueta, Girona) for their support with FISH analysis. This manuscript version has been kindly reviewed by Professor Lilith Lee from the Medical Education Unit of the University of Girona.

Author details

¹Institut d'Investigació Biomèdica de Girona, E-17071 Girona, Spain. ²Facultat de Medicina, Universitat de Girona, E-17001 Girona, Spain. ³Institut Català d'Oncologia - Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, E-08907 Barcelona, Spain. ⁴Química Orgànica I, Facultat de Ciències Químiques, Universidad Complutense, E-28040 Madrid, Spain. ⁵Centro Oncológico MD Anderson España, E-28033 Madrid, Spain.

Authors' contributions

TP conceived of the study, helped in the molecular and cell biology studies, participated in the study design and coordination, and drafted the manuscript. HA and SC carried out the *in vivo* efficacy and toxicity studies. GO carried out the development of the resistant cells, FISH experiments, and *in vitro* and *ex vivo* FASN enzymatic activity assays. CT carried out the synthesis of G28UCM. SO-G, BB and MLL-R participated in the design and development of G28UCM and reviewed the manuscript. AU and RC conceived of the study and participated in the study design and coordination, and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

None of the authors have any conflict of interest that can affect the impartiality of the research reported.

Received: 12 March 2011 Revised: 24 October 2011

Accepted: 16 December 2011 Published: 16 December 2011

References

- Menendez JA, Lupu R, Colomer R: **Targeting fatty acid synthase: potential for therapeutic intervention in HER-2/neu overexpressing breast cancer.** *Drug News Perspect* 2005, **18**:375-385.
- Vergote D, Cren-Olivé C, Chopin V, Toillon RA, Rolando C, Hondermarck L, Bourhis X: **(-)-Epigallocatechin (EGC) of green tea induces apoptosis of human breast cancer cells but not of their normal counterparts.** *Breast Cancer Treat* 2002, **76**:195-201.
- Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, Oza BP, Ropero S, Colomer R, Lupu R: **Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:10715-10720.
- Puig T, Vazquez-Martin A, Relat J, Pétriz J, Menéndez JA, Porta R, Casals G, Marrero PF, Haro D, Brunet J, Colomer R: **Fatty acid metabolism in breast cancer cells: differential inhibitory effects of epigallocatechin gallate (EGCG) and C75.** *Breast Cancer Res Treat* 2008, **109**:471-479.
- Grunt TW, Wagner R, Grusch M, Berger W, Singer CF, Marian B, Zielinski CC, Lupu R: **Interaction between fatty acid synthase- and ErbB-systems in ovarian cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **385**:454-459.
- Puig T, Relat J, Marrero PF, Haro D, Brunet J, Colomer R: **Green tea catechin inhibits fatty acid synthase without stimulating carnitine palmitoyltransferase-1 or inducing weight loss in experimental animals.** *Anticancer Res* 2008, **28**:3671-3676.
- Gabrielson EW, Pinn ML, Testa JR, Kuhajda FP: **Increased fatty acid synthase is a therapeutic target in mesothelioma.** *Clin Cancer Res* 2001, **7**:153-157.
- Brusselmans K, De Schrijver E, Verhoeven G, Swinnen JV: **RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase-alpha gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells.** *Cancer Res* 2005, **65**:6719-6725.
- Shimizu M, Deguchi A, Lim JT, Moriwaki H, Kopelovich L, Weinstein IB: **(-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:2735-2746.
- Landis-Piwowar KR, Huo C, Chen D, Milacic V, Shi G, Chan TH, Dou QP: **A novel prodrug of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate as a potential anticancer agent.** *Cancer Res* 2007, **67**:4303-4310.
- Alli PM, Pinn ML, Jaffee EM, McFadden JM, Kuhajda FP: **Fatty acid synthase inhibitors are chemopreventive for mammary cancer in neu-N transgenic mice.** *Oncogene* 2005, **24**:39-46.
- Wang HQ, Altomare DA, Skele KL, Poulidakos PI, Kuhajda FP, Di Cristofano A, Testa JR: **Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells.** *Oncogene* 2005, **24**:3574-3582.
- Puig T, Turrado C, Benhamú B, Aguilar H, Relat J, Ortega-Gutiérrez S, Casals G, Marrero PF, Urruticoechea A, Haro D, López-Rodríguez ML, Colomer R: **Novel Inhibitors of Fatty Acid Synthase with Anticancer Activity.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**:7608-7615.
- Van de Sande T, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV: **Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in the overexpression of fatty acid synthase in LNCaP prostate cancer cells.** *Cancer Res* 2002, **62**:642-646.
- Menendez JA, Mehmi I, Atlas E, Colomer R, Lupu R: **Novel signaling molecules implicated in tumour-associated fatty acid synthase-dependent breast cancer cell proliferation and survival: Role of exogenous dietary fatty acids, p53- p21WAF1/CIP1, ERK1/2 MAPK, p27KIP1, BRCA1, and NF-kappaB.** *Int J Oncol* 2004, **24**:591-608.
- Yoon S, Lee MY, Park SW, Moon JS, Koh YK, Ahn YH, Park BW, Kim KS: **Up-regulation of acetyl-CoA carboxylase alpha and fatty acid synthase by human epidermal growth factor receptor 2 at the translational level in breast cancer cells.** *J Biol Chem* 2007, **282**:26122-26131.
- Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Lupu R, Menendez JA: **Overexpression of fatty acid synthase gene activates HER1/HER2 tyrosine kinase receptors in human breast epithelial cells.** *Cell Prolif* 2008, **41**:59-85.
- Grunt TW, Wagner R, Grusch M, Berger W, Singer CF, Marian B, Zielinski CC, Lupu R: **Interaction between fatty acid synthase- and ErbB-systems in ovarian cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **385**:454-459.
- Shaw RJ, Cantley LC: **Ras, PI (3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth.** *Nature* 2006, **441**:424-430.
- Kim KJ, Kim HY, Cho HK, Kim KH, Cheong J: **The SDF-1alpha/CXCR4 axis induces the expression of fatty acid synthase via sterol regulatory element binding protein-1 activation in cancer cells.** *Carcinogenesis* 2010, **31**:679-686.
- Migita T, Ruiz S, Fornari A, Fiorentino M, Priolo C, Zadra G, Inazuka F, Grisanzio C, Palescandolo E, Shin E, Fiore C, Xie W, Kung AL, Febbo PG, Subramanian A, Mucci L, Ma J, Signoretti S, Stampfer M, Hahn WC, Finn S, Loda M: **Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2009, **101**:519-532.
- Sabbisetti V, Di Napoli A, Seeley A, Amato AM, O'Regan E, Ghebremichael M, Loda M, Signoretti S: **p63 promotes cell survival through fatty acid synthase.** *PLoS One* 2009, **4**:e5877.

23. Siddiqui RA, Harvey KA, Zaloga GP, Stillwell W: **Modulation of lipid rafts by omega-3 fatty acids in inflammation and cancer: implications for use of lipids during nutrition support.** *Nutr Clin Pract* 2007, **22**:74-88.
24. Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, Kuhajda FP: **Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors.** *Science* 2000, **288**:2379-2381.
25. Hu Z, Cha SH, Chohan S, Lane MD: **Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:12624-12629.
26. Thupari JN, Landree LE, Ronnett GV, Kuhajda FP: **C75 increases peripheral energy utilization and fatty acid oxidation in diet-induced obesity.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:9498-9502.
27. Nicot C, Napal L, Relat J, González S, Llebaria A, Woldegiorgis G, Marrero PF, Haro D: **C75 activates malonyl-CoA sensitive and insensitive components of the CPT system.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **325**:660-664.
28. Aja S, Landree LE, Kleman AM, Medghalchi SM, Vadlamudi A, McFadde JM, Aplasca A, Hyun J, Plummer E, Daniels K, Kemm M, Townsend CA, Thupari JN, Kuhajda FP, Moran TH, Ronnett GV: **Pharmacological stimulation of brain carnitine palmitoyl-transferase-1 decreases food intake and body weight.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008, **294**:352-361.
29. Jatoi A, Ellison N, Burch PA, Sloan JA, Dakhil SR, Novotny P, Tan W, Fitch TR, Rowland KM, Young CY, Flynn PJ: **A phase II trial of green tea in the treatment of patients with androgen independent metastatic prostate carcinoma.** *Cancer* 2003, **97**:1442-1446.
30. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C: **Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies.** *Am J Clin Nutr* 2005, **81**:230S-242S.
31. Pohlmann PR, Mayer IA, Mernaugh R: **Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**:7479-7491.
32. Esteva FJ, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN: **Molecular predictors of response to trastuzumab and lapatinib in breast cancer.** *Nat Rev Clin Oncol* 2010, **7**:98-107.
33. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT, Hortobagyi GN, Hung MC, Yu D: **PTEN activation contributes to tumour inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients.** *Cancer Cell* 2004, **6**:117-127.
34. Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, Guzman M, Cortes J, Di Cosimo S, Matias-Guiu X, Ramon y Cajal S, Arribas J, Baselga J: **Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2007, **99**:628-638.
35. Eichhorn PJ, Gili M, Scaltriti M, Serra V, Guzman M, Nijkamp W, Beijersbergen RL, Valero V, Seoane J, Bernardis R, Baselga J: **Phosphatidylinositol 3 kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BEZ235.** *Cancer Res* 2008, **68**:9221-9230.
36. Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M: **Insulin like growth factor I receptor signaling and resistance to trastuzumab (herceptin).** *J Natl Cancer Inst* 2001, **93**:1852-1857.
37. Mittendorf EA, Wu Y, Scaltriti M, Meric-Bernstam F, Hunt KK, Dawood S, Esteva FJ, Buzdar AU, Chen H, Eksambi S, Hortobagyi GN, Baselga J, Gonzalez-Angulo AM: **Loss of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**:7381-7388.
38. Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Menendez JA: **Pharmacological blockade of fatty acid synthase (FASN) reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin by transcriptionally inhibiting 'HER2 super-expression' occurring in high-dose trastuzumab-conditioned SKBR3/Tzb100 breast cancer cells.** *Int J Oncol* 2007, **31**:769-776.
39. Nahta R, Takahashi T, Ueno NT, Hung MC, Esteva FJ: **P27(kip1) downregulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells.** *Cancer Res* 2004, **64**:3981-3986.
40. Nahta R, Yuan LX, Du Y, Esteva FJ: **Lapatinib induces apoptosis in trastuzumab-resistant breast cancer cells: effects on insulin-like growth factor I signaling.** *Mol Cancer Ther* 2007, **6**:667-674.
41. Ropero S, Menéndez JA, Vázquez-Martín A, Montero S, Cortés-Funes H, Colomer R: **Trastuzumab plus tamoxifen: anti-proliferative and molecular interactions in breast carcinoma.** *Breast Cancer Res Treat* 2004, **86**:125-137.
42. Menendez JA, Lupu R, Colomer R: **Inhibition of tumour-associated fatty acid synthase hyperactivity induces synergistic chemosensitization of HER-2/neu - overexpressing human breast cancer cells to docetaxel (taxotere).** *Breast Cancer Res Treat* 2004, **84**:183-195.
43. Orita H, Coulter J, Tully E, Kuhajda FP, Gabrielson E: **Inhibiting fatty acid synthase for chemoprevention of chemically induced lung tumours.** *Clin Cancer Res* 2008, **15**:2458-2464.
44. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, Goulet R Jr, Badve S, Nakshatri H: **CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis.** *Breast Cancer Res* 2006, **8**:R59.
45. Sen T, Dutta A, Chatterjee A: **Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) downregulates gelatinase-B (MMP-9) by involvement of FAK/ERK/NFkappaB and AP-1 in the human breast cancer cell line MDA-MB-231.** *Anticancer Drugs* 2010, **21**:632-644.
46. Punathil T, Tollefsbol TO, Katiyar SK: **EGCG inhibits mammary cancer cell migration through inhibition of nitric oxide synthase and guanylate cyclase.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **10**:162-167.
47. Satoh K, Sakamoto Y, Ogata A, Nagai F, Mikuriya H, Numazawa M, Yamada K, Aoki N: **Inhibition of aromatase activity by green tea extracts catechins and their endocrinological effects of oral administration in rats.** *Food Chem Toxicol* 2002, **40**:925-933.
48. Fabian MA, Biggs WH, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, Carter TA, Ciceri P, Edeen PT, Floyd M, Ford JM, Galvin M, Gerlach JL, Grotzfeld RM, Herrgard S, Insko DE, Insko MA, Lai AG, Lélías JM, Mehta SA, Milanov ZV, Velasco AM, Wodicka LM, Patel HK, Zarrinkar PP, Lockhart DJ: **A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors.** *Nat Biotechnol* 2005, **23**:329-336.
49. Schaefer G, Shao L, Totpal K, Akita RW: **Erlotinib directly inhibits HER2 kinase activation and downstream signaling events in intact cells lacking epidermal growth factor receptor expression.** *Cancer Res* 2007, **67**:1228-1238.
50. Eddy SF, Kane SE, Sonenshein GE: **Trastuzumab-resistant HER2-driven breast cancer cells are sensitive to epigallocatechin-3 gallate.** *Cancer Res* 2007, **67**:9018-9023.

doi:10.1186/bcr3077

Cite this article as: Puig et al.: A novel inhibitor of fatty acid synthase shows activity against HER2+ breast cancer xenografts and is active in anti-HER2 drug-resistant cell lines. *Breast Cancer Research* 2011 **13**:R131.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Discussió

FASN és l'enzim que participa en la síntesi *de novo* d'àcids grassos. Els nivells d'expressió de FASN en cèl·lules normals són relativament baixos, en canvi aquest enzim es veu sobreexpressat en cèl·lules de càncer de mama i en altres tipus de carcinomes com el de pròstata [12, 140]. Existeix una correlació entre els nivells de FASN i la progressió del tumor així com amb la seva agressivitat i capacitat de metàstasi [141]. FASN és un complex multi-enzimàtic encarregat de la síntesi *de novo* d'àcids grassos de cadena llarga (principalment palmitat) a partir de la condensació d'acetil i malonil-CoA depenent de NADPH [21]. Quan s'activa FASN sintetitza principalment palmitat però els nivells de palmitat són molt diferents en cèl·lules tumorals que en teixits sans lipogènics (teixit adipós i hepàtic). En condicions normals la síntesi d'àcids grassos té lloc en els teixits lipogènics amb la finalitat d'emmagatzemar energia en forma de triacilglicèrids. En dejú, s'inhibeix l'expressió i activació de FASN, disminueixen els nivells de malonil-CoA i s'activa l'oxidació dels àcids grassos. Durant el procés de lipogènesi normal, el malonil-CoA actua inhibint el complex de la CPT1, enzim transportador d'àcids grassos de cadena llarga del citoplasma a la matriu mitocondrial, on té lloc la β -oxidació. Tot el procés de síntesi d'àcids grassos en cèl·lules normals està regulat bàsicament per factors dietètics. En les cèl·lules tumorals això canvia, els àcids grassos sintetitzats de manera endògena no s'emmagatzemen en forma de triacilglicèrids sinó de fosfolípids, i la regulació és a nivell transcripcional (hormones, factors de creixement) o a través d'oncoproteïnes associades a vies de senyalització depenent de cinases, com la d'HER2.

HER2 és un receptor transmembrana de la família dels receptors del factor de creixement epidèrmic amb activitat tirosina cinasa. Aquesta família de receptors transmembrana són mediadors potents del creixement i desenvolupament cel·lular. HER2 no té un lligand específic i per activar-se li cal la dimerització amb un altre

receptor de la família. Però no tots els dímers d'HER tenen la mateixa capacitat i potència de senyalització; els homodímers presenten una perpetuació del senyal més feble en comparació amb els heterodímers. HER1, HER2 i HER3 són els implicats en el desenvolupament i progressió del càncer i d'HER4 encara no se'n coneix ben bé el seu paper en l'oncogènesi. L'heterodímer HER2:HER3 és considerat el dímer més potent a l'hora de generar accions com ara la resistència a la interacció i la fosforilació de la tirosina induïda pels lligands [85]. La supervivència de les cèl·lules tumorals, sobretot les que sobreexpressen HER2, és depenent del metabolisme lipídic. Per això la sobreexpressió d'HER2 augmenta la traducció de FASN, i la sobreexpressió de FASN fa que hi hagi un augment de les vies de transducció de senyals relacionades amb HER2 com les vies de PI3K-AKT i la d'ERK1/2, tot junt comporta una millora en el creixement de les cèl·lules tumorals [63, 142]. El mecanisme molecular de la interacció entre FASN i HER2 encara no està ben descrit, existeixen diverses teories. HER2 regularia la inducció del promotor de FASN mitjançant la via de senyalització de PI3K [143]. La sobreexpressió d'HER2 podria fer augmentar la transcripció de FASN, la síntesi i l'estabilitat proteica així com la possible fosforilació i activació de les proteïnes relacionades amb les vies de transducció de senyals [144]. Altres estudis ens diuen que la sobreexpressió d'HER2 activaria la via de senyalització de la PI3K/AKT i a conseqüència estimularia la via de mTOR i tot plegat provocaria l'augment de la traducció de FASN (Figura 5). Per tant, inhibint les vies de senyalització d'HER2/PI3K/mTOR disminuiria l'expressió de FASN [33, 145]. I, al revés, inhibint FASN es bloquejaria l'expressió i l'activitat d'HER2 [46]. Així, bloquejant FASN i HER2 hi hauria un efecte sinèrgic de la disminució del creixement cel·lular en càncer de mama [146]. En un estudi recent s'ha investigat la relació entre la fosforilació de FASN (regulada per HER2) amb l'activitat de FASN i en paral·lel la funció de FASN en

provocar invasió cel·lular en cèl·lules de càncer de mama que sobreexpressen HER2. Els resultats mostren que la fosforilació de FASN es produeix quan hi ha una sobreexpressió d'HER2 i això provoca un augment de l'activitat de FASN. Bloquejant l'activitat de FASN s'inhibeix la fosforilació d'HER2 i de FASN, i també es suprimeix l'activitat de la metal·lopeptidasa 9 inductora de la invasió en les cèl·lules de càncer de mama [147]. Basant-nos en totes aquestes premisses nosaltres i altres investigadors vam proposar FASN com a potencial diana terapèutica, sola o en combinació amb altres dianes pel tractament del càncer [11, 39].

Diferents estudis han demostrat que l'EGCG, una catequina polifenòlica molt abundant en el te verd inhibia FASN i induïa a l'apoptosi en diferents línies tumorals. Com el treball de Brusselmans i col·laboradors que van tractar amb EGCG cèl·lules tumorals de pròstata i van observar inhibició de l'activitat enzimàtica de FASN, inhibició del creixement cel·lular i inducció a l'apoptosi [58]. En un altre estudi realitzat amb cèl·lules tumorals de càncer de mama van observar aquesta inhibició del creixement cel·lular i inducció a l'apoptosi al tractar les cèl·lules amb EGCG [62]. En estudis previs del nostre grup d'investigació, també vam demostrar que l'EGCG, mostrava efectes citotòxics en cèl·lules tumorals de càncer de mama i que inhibia l'activitat de FASN. Però tot i aquesta bona especificitat, l'EGCG presenta una important limitació en quan al seu ús terapèutic que és l'elevada dosi de compost que cal administrar per obtenir activitat antitumoral i la baixa estabilitat química en condicions fisiològiques. A més l'efecte *in vivo* de l'EGCG també es veu limitat pel seu valor de IC_{50} , així com la seva inestabilitat en condicions fisiològiques [148]. Aquesta limitada i baixa activitat de l'EGCG també es veu reflectida en diferents assaigs clínics en càncer de pròstata [149, 150].

En col·laboració amb el grup de química mèdica de la Professora María Luz López-Rodríguez de la UCM es va dissenyar i sintetitzar una quimioteca de compostos derivats de l'EGCG per valorar-ne la seva capacitat antitumoral. Els objectius del primer treball d'aquesta tesi foren caracteritzar *in vitro* els efectes dels nous compostos polifenòlics derivats de l'EGCG per avaluar la seva citotoxicitat en diferents models de càncer de mama. Per això es van mirar els nivells de citotoxicitat dels nous compostos sintetitzats i també es va ampliar el ventall de línies cel·lulars de càncer de mama on es testava la citotoxicitat. L'objectiu final era seleccionar el compost més potent i específic en termes d'inhibició de l'activitat de FASN i citotoxicitat. Després d'avaluar-ne més de cinquanta (Taula A1) el compost G28UCM és el que presenta els resultats més favorables (Taula 3), per això vam profunditzar amb la caracterització biològica i molecular d'aquest compost. El nou compost G28UCM va ser el compost seleccionat en base a diferents resultats:

i) La seva alta capacitat d'inhibició de l'activitat de FASN en cèl·lules de càncer de mama; un 90% d'inhibició en comparació amb l'EGCG que mostrava una inhibició del 20% [70]. El grup de Kuhajda havia observat que el C75, l'inhibidor de FASN més potent descrit a la literatura fins el moment inhibia l'activitat enzimàtica de FASN en un 83% [10].

ii) La potent i selectiva citotoxicitat cel·lular (IC_{50}) en cèl·lules tumorals de càncer de mama, amb un nivells de FASN elevats, com són les cèl·lules AU565, on el G28UCM presentava un $IC_{50}=30 \mu M$ o les SKBr3 on la $IC_{50}=21 \mu M$ en comparació amb l'EGCG que era de $190 \mu M$. Els inhibidors de FASN cerulenina i el seu derivat sintètic C75 presentaven una IC_{50} de $22 \mu M$ [151] i de $20 \mu M$ respectivament en cèl·lules de càncer de mama [141].

Per tant el nostre compost el G28UCM presentava una capacitat d'inhibir FASN i una IC_{50} de l'ordre dels altres inhibidors de FASN. No obstant, un dels problemes associats als inhibidors de FASN cerulenina i C75 era que estimulaven l'activitat de la CPT1, l'enzim responsable de la regulació de la oxidació mitocondrial dels àcids grassos, accelerant la β -oxidació fet que *in vivo* provocava anorèxia i pèrdua de pes [52, 152]. Es va comprovar que el G28UCM no afectava l'activitat de la CPT1 per tant no produïa ni pèrdua de pes ni anorèxia [70]. Prèviament el nostre grup de recerca ja havia descrit que l'EGCG no modulava l'activitat de la CPT1 per tant no provocava anorèxia ni pèrdua de pes [65]. Això ens indica que l'estructura química de l'EGCG i per tant la del derivat polifenòlic, G28UCM, és més específic de la via lipogènica que la cerulenina i el C75.

iii) La inducció a l'apoptosi en cèl·lules tumorals. En les cèl·lules de càncer de mama tractades amb el G28UCM a 30 μ M i en diferents temps (12, 24, 48 hores), es va observar l'aparició de la banda de PARP de 89 kDa, a les 12 hores, indicació que aquestes cèl·lules entraven en apoptosi [70]. La relació de FASN i HER2 no està del tot ben establerta, però està descrit que inhibint FASN es bloqueja l'activitat d'HER2 [46]. També s'ha vist que la inhibició de FASN en cèl·lules de càncer de mama i ovari disminueix l'expressió proteica d'HER2 [146]. Les cèl·lules de càncer de mama tractades amb G28UCM també mostraven una disminució proteica de les formes actives d'HER2, AKT i MAPK; en el cas de p-HER2 a les 6 hores d'exposició al compost s'observava una total desaparició. En canvi amb l'EGCG concentracions semblants i una exposició prolongada (24, 48 i 72 hores), no s'observava cap efecte sobre l'apoptosi o la inhibició de p-HER2, p-ERK1/2 i p-AKT [65]. Calien concentracions almenys 5 vegades superiors de l'EGCG que del G28UCM per detectar apoptosi o inhibició de p-

HER2, p-ERK1/2 i p-AKT, això ens indicava que el nou compost era molt més actiu que la molècula original.

La relació de FASN/HER2 i les rutes de senyalització PI3K/AKT i MAPK segueix en estudi. Miller i col·laboradors, varen descriure que la via de senyalització PI3K/AKT/mTOR promotora de la supervivència, la proliferació i el creixement cel·lular estava activada en càncer i sobretot en càncer de mama, a més l'activació d'aquesta via conferia resistència als tractaments anti-HER [153]. Per això els inhibidors d'aquestes vies de senyalització adquireixen tanta importància en la pràctica clínica [154]. Un altre grup d'investigació havia dit que la inhibició de les vies PI3K/AKT/mTOR augmentava els efectes antiangiogènics de l'EGCG [155]. Aquests estudis ens indiquen que el nostre compost el G28UCM podria ser un bon candidat pel tractament simultani amb els inhibidors de les vies PI3K/AKT/mTOR i millorar els efectes d'ambdós. Actualment, en el laboratori treballem amb inhibidors de la ruta mTOR (temsirolimus) en combinació amb el G28UCM, en resultats preliminars hem observat un clar efecte sinèrgic d'aquesta combinació amb cèl·lules de càncer de mama.

Veient els resultats del G28UCM *in vitro* es va realitzar l'experimentació *in vivo* amb aquest compost. Vam utilitzar un model murí de ratolins femelles nude BALB/c atímiques (aquests ratolins no tenen timus per tant presenten una deficiència de cèl·lules T, degut a la manca de la seva funció immune s'usen com a recipients de tumors o cèl·lules tumorals) per avaluar el perfil de toxicitat del G28UCM *in vivo*. L'administració diàriament de G28UCM durant 45 dies, no produïa cap canvi en els hàbits alimentaris ni pèrdua de pes ens els ratolins tractats. Tampoc es va observar cap alteració en els marcadors renals i hepàtics estudiats, entre els animals tractats i els control. Els estudis histològics de fetge, cor, ronyó, pulmó i cervell tampoc van mostrar alteracions significatives entre els animals tractats i els control (no tractats).

Aquests resultats reforcen que l'estructura química del G28UCM és més específica de la via lipogènica que la cerulenina o els seus derivats ja que no estimula la CPT1, ni accelera la β -oxidació, fet que es tradueix en la reducció de la ingesta d'aliments amb una conseqüent pèrdua de pes i anorèxia en els ratolins [52, 152].

El següent pas fou realitzar un xenoempelt de cèl·lules tumorals de càncer de mama BT474 (FASN+ i HER2+) injectades subcutàniament als ratolins. Aquestes cèl·lules van desenvolupar tumors, quan van assolir un volum mig d'aproximadament 130 mm³ van ser tractats diàriament amb 40 mg/Kg de G28UCM on vam observar un reducció del volum tumoral d'un 20 a un 90% en 5 dels 14 ratolins tractats amb el G28UCM. Als ratolins que van respondre al tractament es va observar clarament un perfil apoptòtic i també vam veure que als tumors tractats l'expressió de p-HER2, p-ERK1/2 i de p-mTOR (formes actives de les proteïnes) disminuïa considerablement, a diferència de la proteïna total que es mantenia intacte (Figura 1B de l'Article 2). Aquests resultats *in vivo* ens corroboren el que ja havíem observat *in vitro* al tractar les cèl·lules de càncer de mama amb el G28UCM i veure clarament que al cap de 12 hores ja es produïa apoptosi. Igualment amb p-HER2 i p-AKT que vam observar una clara disminució de la forma activa de la proteïna a partir de les 24 hores després del tractament amb G28UCM. L'activitat enzimàtica de FASN en aquests tumors si que es veia disminuïda un 30% en comparació amb els tumors no tractats, però l'expressió proteica de FASN no presenta cap alteració. Això ens indicaria que realment el tractament amb G28UCM inhibeix l'activitat de FASN però no els nivells totals de proteïna. *In vitro* ja havíem observat que amb cèl·lules de càncer de mama tractades amb el G28UCM i havia una inhibició de l'activitat enzimàtica de FASN però no dels nivells totals de la proteïna. Aquests resultats obtinguts són molt interessants per seguir endavant amb el G28UCM en models de càncer de mama i amb altres models

tumorals amb sobreexpressió de FASN com ara el de pulmó, on *in vitro* també hem observat que l'EGCG inhibia l'activitat de FASN però no els nivells proteics i *in vivo* la reducció del volum tumoral (manuscrit en revisió). El fet que la caracterització molecular *in vitro* del compost es verifiqui en el model animal significa un gran pas en el desenvolupament preclínic del compost.

En relació als tumors tractats que no varen respondre al tractament podria ser degut a diferents factors com la biodisponibilitat del G28UCM, la variació clonal de les BT474 o el disseny experimental, entre d'altres. Referent a la biodisponibilitat del compost veiem que el G28UCM sí que arriba al teixit diana ja que hi ha una inhibició del 30 % de l'activitat de FASN resultat similar al que s'observa amb altres inhibidors de FASN administrats intraperitonealment, com per exemple amb l'inhibidor orlistat en un model animal de melanoma [156]. I també l'efecte inhibidor de l'orlistat en un model animal de carcinoma colorectal on es va observar una inhibició significativa de la síntesi d'àcids grassos [157].

Referent a la farmacocinètica del G28UCM s'estan realitzant estudis en col·laboració amb el grup de química mèdica de la UCM, dels quals tenim resultats preliminars. Hem observat que el compost G28UCM té una vida mitja de dues hores en sèrum humà i de mitja hora en sèrum de ratolí, aproximadament. Però tot i que la vida mitja del compost en sèrum és curta, existeixen dos metabòlits que mantenen la integritat estructural dels dominis actius de la molècula i que poden ser candidats a compostos actius. Els anàlisis posteriors d'aquests metabòlits amb la línia de càncer de mama SKBr3 ens presenten una inhibició de l'activitat de FASN (30 i 35% aprox.) i una citotoxicitat (IC_{50} de 20 i 30 μ M) similar a la del compost parental, G28UCM. Tot això ens ajudaria a entendre el fet de que responguessin un terç dels tumors tractats. Cal mencionar que en els tumors que no van respondre al tractament no es van observar

canvis en apoptosi (PARP), p-HER2, p-MAPK o p-mTOR (Figura 1B de l' Article 2). Les cèl·lules usades en el nostre model animal, BT474, presenten variabilitat clonal. Sheridan i col·laboradors ja van descriure que en cultiu cel·lular les cèl·lules BT474 expressaven la molècula d'adhesió CD24 en un 80% mentre que un 20% no l'expressava [158]. El CD24 s'ha descrit com a marcador d'agressivitat en càncer de mama [159].

En el nostre disseny experimental *in vivo* es va apostar per l'administració del compost G28UCM quan els tumors tinguessin un volum entre 100-150 mm³, podria ser que tractant els tumors més petits o bé inoculant les cèl·lules BT474 juntament amb el compost variessin els resultats de l'estudi d'eficàcia. Per això estem realitzant estudis per trobar el millor model cel·lular per realitzar el xenoempelt; utilitzant diferents línies tumorals per veure com es desenvolupen els tumors. També tenim pendent provar altres vies d'administració del compost coma ara l'oral, la subcutània o la intravenosa.

Des de la incorporació de fàrmacs anti-HER, com el trastuzumab i el lapatinib, el pronòstic de les pacients amb càncer de mama HER2+ ha millorat significativament. El tractament adjuvant amb l'anticòs monoclonal trastuzumab ha estat avaluat en molts assajos de càncer de mama i s'ha establert el trastuzumab, en combinació o sol, després d'haver rebut quimioteràpia com a tractament estàndard adjuvant pels tumors HER2+ [160]. En els cas dels fàrmacs inhibidors de la tirosina cinasa, com el lapatinib i el gefitinib també s'ha avaluat el fet de combinar-los amb altres teràpies (agents quimioterapèutics o teràpies biològiques) per tal d'augmentar els seus efectes [161]. Basant-nos en tots aquests estudis clínics vàrem voler estudiar, en el nostre model cel·lular de càncer de mama (AU565 FASN/HER2+), les interaccions del G28UCM amb les teràpies anti-HER més usades (trastuzumab, lapatinib, gefitinib, erlotinib i cetuximab), comparant-lo amb l'EGCG per així veure les diferències del G28UCM amb

la molècula parental. La combinació de G28UCM amb trastuzumab, lapatinib, gefitinib i erlotinib mostrava un clar efecte de sinergisme farmacològic (Índex d'interacció, $I_x < 1$), comprovat utilitzant el mètode estadístic d'anàlisi de l'isoblograma [162]. En canvi, l'EGCG combinat amb lapatinib, gefitinib i erlotinib mostrava un efecte antagònic ($I_x > 1$) només combinat amb el trastuzumab presentava un efecte additiu ($I_x = 1$) això ja era d'esperar tenint en compte els baixos efectes de l'EGCG en monoteràpia. La combinació de l'anticòs monoclonal cetuximab (inhibidor d'HER1) tant amb l'EGCG com el G28UCM presentava un efecte antagònic ($I_x > 1$). Aquests resultats recolzen el fet que les interaccions de FASN amb HER es limiten a HER2 i no impliquen HER1.

També vam estudiar les interaccions moleculars del G28UCM, analitzant els nivells proteics de: FASN, PARP (apoptosi), les formes fosforilades i totals d'HER2, MAPK i AKT després d'utilitzar el G28UCM combinat amb trastuzumab, lapatinib, cetuximab i erlotinib (Figures 2 i 3 de l'Article 2). Amb els fàrmacs que havíem observat sinergisme, el trastuzumab, el lapatinib i l'erlotinib, vam veure un increment de l'apoptosi al combinar aquests fàrmacs amb el G28UCM, aquest fet es pot relacionar amb una disminució de les formes fosforilades de les proteïnes HER2, AKT i ERK1/2, sense que les formes totals tinguin cap canvi considerable. Això ens indicaria una inhibició de l'activació de les vies de senyalització en que estan implicades aquestes proteïnes. En el cas de la combinació de G28UCM amb el cetuximab no s'observa aquest perfil molecular. Per tant les proves moleculars ens corroboren els efectes sinèrgics observats en els experiments d'inhibició del creixement cel·lular. Aquests resultats ens mostren que la teràpia combinada de l'inhibidor de FASN G28UCM amb les teràpies anti-HER és més activa que qualsevol dels fàrmacs utilitzats individualment. Això està molt relacionat amb la realitat de la pràctica clínica, on la majoria d'aquest fàrmacs es donen en combinació amb altres teràpies. Com és el cas

del trastuzumab que s'ha vist amb molts estudis que amb el tractament adjuvant combinat amb quimioteràpia (taxans, antraciclins) s'aconsegueix un augment de la supervivència lliure de malaltia i supervivència global, al comparar-lo amb el tractament quimioterapèutic sol [163, 164]. Amb l'ITK, el lapatinib, també hi ha estudis de combinació amb altres fàrmacs. Com és el cas del lapatinib més la capacetabina en pacients amb càncer de mama avançat HER2+ que han progressat després del tractament amb règims que inclouen antraciclins, taxans i trastuzumab [165]. El lapatinib també es dona en combinació amb un inhibidor de l'aromatasa, en dones postmenopàusiques amb càncer de mama metastàtic amb receptors hormonals positius per a les quals la quimioteràpia no és adequada. En aquests casos s'observa un major efecte del lapatinib combinat amb l'inhibidor de l'aromatasa que sol [166].

Així la combinació de l'inhibidor de FASN, G28UCM, amb les teràpies anti-HER existents seria una bona eina per augmentar l'efecte antitumoral de tots aquests fàrmacs.

Les taxes de resposta a trastuzumab amb monoteràpia són baixes, entre 12 i 34% per una mitjana de 9 mesos de tractament [167]. Fins i tot en combinació amb quimioteràpia la durada de la resposta a trastuzumab és menys d'1 any [168]. Gran part d'aquestes pacients amb càncer de mama avançat HER2+ acaben desenvolupant resistències al trastuzumab [169]. Per això l'estudi i la recerca de fàrmacs que inhibeixen la proliferació cel·lular en aquests tumors resistents té un elevat interès clínic. En l'article de revisió de Higgins i Baselga es descriu la problemàtica dels tumors HER2+ amb resistències als fàrmacs més usats i la necessitat de trobar noves teràpies o combinar amb èxit les existents [170]. Això també queda reflectit en molt altres estudis, com el que valora el potencial del tractament amb lapatinib en cèl·lules de càncer de mama resistents a trastuzumab [171]. O més recentment el treball de Ozbay

i col·laboradors que avalua el SF1126, un inhibidor PI3 TK, que mostra eficàcia amb cèl·lules resistents a trastuzumab [172].

Considerant aquesta realitat, vam dissenyar i desenvolupar en el nostre laboratori cèl·lules resistents a trastuzumab i a lapatinib [173], per poder comprovar l'efecte antitumoral del nostre compost, en aquestes línies cel·lulars resistents. Vam utilitzar el nostre model cel·lular de càncer de mama, les AU565, i les vam mantenir en cultiu amb la presència del fàrmac (trastuzumab o lapatinib) durant més de sis mesos. El primer que vam observar és que les cèl·lules AU565**TR** i AU565**LR** seguien sobreexpressant FASN igual que les AU565 parentals, aquest fet el vam considerar rellevant perquè el G28UCM fos actiu en aquestes línies cel·lulars. L'amplificació del gen d'HER2 valorat mitjançant FISH segueix present tant les cèl·lules AU565**TR** com les AU565**LR** igual com ho mostraven les cèl·lules AU565 parentals. En les AU565**LR** l'expressió proteica d'HER2 total i fosforilada pràcticament no variava comparada amb les AU565 parentals. En canvi en les AU565**TR** l'expressió proteica d'HER2 total i fosforilada si que es veia totalment afectada (Figura 4B de l'Article 2). En aquestes dues línies cel·lulars resistents, la citotoxicitat del trastuzumab o del lapatinib pràcticament era inexistent (Figura 4C de l'Article 2) a diferència de l'activitat del G28UCM que era molt similar a la de les cèl·lules parentals (AU565), aquesta dada és molt interessant ja que ens indica que tot i que les cèl·lules hagin estat exposades durant un període llarg al trastuzumab i al lapatinib, desenvolupant resistències en aquests fàrmacs, el G28UCM pràcticament no ha variat els seus efectes antitumorals, per això podem dir que aquest inhibidor de FASN és efectiu quan les cèl·lules són resistents. Aquesta dada corrobora el treball d'Eddy i col·laboradors on deien que l'EGCG era efectiu en cèl·lules resistents a trastuzumab, per tant és molt lògic que el G28UCM derivat de l'EGCG també mostri efectes antiproliferatius amb aquestes

cèl·lules resistents [174]. Per tant podem dir que en aquests models cel·lulars resistents (AU565**TR** i AU565**LR**) es manté FASN com a diana per això G28UCM hi segueix mostrant efectes citotòxics.

Actualment en el laboratori treballem amb les línies resistents a trastuzumab i a lapatinib. També hem creat una línia cel·lular amb doble resistència a trastuzumab i lapatinib. Volem avaluar les interaccions dels inhibidors de FASN sols o en combinació amb altres teràpies existents en aquests models cel·lulars resistents. També estem realitzant la caracterització d'aquestes línies, per conèixer el patró molecular i el mecanisme que segueixen aquestes cèl·lules tumorals de càncer de mama per adquirir la resistència i així poder abordar clínicament els tumors que han adquirit aquestes resistències (manuscrit en preparació).

Conclusions

1. Els nivells proteics de la sintasa d'àcids grassos (FASN) es troben incrementats en els models cel·lulars de càncer de mama AU565 i SKBr3, mentre que les cèl·lules no malignes com els fibroblasts o els adipòcits pràcticament no n'expressen, aquests fets juntament amb la bibliografia, recolzen el paper de FASN com una diana terapèutica pel tractament del càncer de mama.
2. Les línees cel·lulars de càncer de mama AU565 i SKBr3 que sobreexpressen FASN paral·lelament sobreexpressen l'oncoproteïna receptor 2 epidèrmic humà (HER2), per això podem dir que en aquests models cel·lulars hi ha una relació positiva entre la sobreexpressió de FASN i la d'HER2.
3. Els nous derivats polifenòlics preseleccionats, relacionats estructuralment amb el (-)-3-galat d'epigallocatequina (EGCG), mostren activitat citotòxica en les cèl·lules tumorals de càncer de mama AU565 (FASN+++), MCF-7 (FASN+) i MDA-MB-231 (FASN+/-), amb una relació directe entre els nivells de FASN i la citotoxicitat a diferència de les cèl·lules no malignes (fibroblasts i adipòcits) on els compostos gairebé no mostren efecte citotòxic.
4. El nou compost polifenòlic G28UCM és el compost seleccionat perquè presenta una IC_{50} de 30 μ M i un 90% d'inhibició de l'activitat de FASN en cèl·lules de càncer de mama AU565, en comparació amb l'EGCG que presenta una IC_{50} de 190 μ M i una inhibició de l'activitat de FASN del 20%.
5. L'estudi cel·lular (AU565) de les interaccions del G28UCM amb els tractaments anti-HER existents (trastuzumab, lapatinib, gefitinib, erlotinib i cetuximab) mostra un clar efecte de sinergisme farmacològic (Índex d'interacció, $I_x < 1$), comprovat utilitzant el mètode estadístic d'anàlisi de l'isoblograma. L'EGCG, per contrari, combinat amb lapatinib, gefitinib i erlotinib té un efecte antagònic ($I_x > 1$) i combinat amb el trastuzumab té un efecte additiu ($I_x = 1$). La combinació de l'anticòs

monoclonal cetuximab (inhibidor d'HER1) tant amb l'EGCG com el G28UCM presenta un efecte antagònic ($I_x > 1$).

6. L'estudi de les interaccions moleculars del G28UCM combinat amb trastuzumab, lapatinib, cetuximab i erlotinib estudiades mitjançant immunoblotting ens mostren un increment de l'apoptosi (fragmentació de PARP) i una disminució de les proteïnes de senyalització cel·lular p-HER2, p-AKT i p-ERK1/2 sense que les formes totals d'aquestes proteïnes i de FASN es vegin afectades; indicant una inhibició de les vies de senyalització en què estan implicades aquestes proteïnes. En la combinació del G28UCM amb el cetuximab no observem ni apoptosi ni disminució de p-HER2, p-AKT i p-ERK1/2.
7. Els ratolins femelles nude BALB/c atímiques usades en l'experimentació *in vivo* és un model òptim pel creixement de tumors humans de càncer de mama ja que aquests animals no tenen timus per tant presenten una deficiència de cèl·lules T. Els xenoempelts amb les cèl·lules humanes de càncer de mama BT474 (FASN/HER2 positives) injectades subcutàniament als ratolins femelles nude BALB/c atímiques desenvolupen tumors.
8. L'estudi del perfil de toxicitat del G28UCM en el model murí de ratolins femelles nude BALB/c atímiques mostra que l'administració diària de G28UCM en dosis de 5, 40 i 75 mg/Kg no produeix cap canvi en els hàbits alimentaris ni provoca pèrdua de pes ens els ratolins. Tampoc s'observa cap alteració en els marcadors renals (urea i creatinina) i hepàtics (aspartat transaminasa, alanina transaminasa i fosfatasa alcalina) valorats, ni alteracions en els teixits hepàtic, cardíac, renal, pulmonar i neuronal dels ratolins tractats.
9. En l'estudi d'eficàcia, el tractament diari de 40 mg/Kg de G28UCM durant 45 dies als ratolins amb tumors palpables d'un volum aproximat d'entre 150-250 mm³

produeix una reducció del volum tumoral d'un 20 a un 90% en 5 dels 14 ratolins tractats amb el G28UCM. Els ratolins que responen al tractament amb G28UCM presenten un clar perfil apoptòtic i una inhibició de l'expressió proteica de p-HER2, p-ERK1/2 i de p-mTOR en comparació amb la proteïna total i FASN que es manté intacte (en paral·lel amb els resultats moleculars *in vitro*).

10. Els models cel·lulars de càncer de mama resistents al trastuzumab (AU565**TR**) i al lapatinib (AU565**LR**) dissenyats i desenvolupats al laboratori són un bon model de resistència adquirida. L'exposició continuada als fàrmacs durant 6 mesos fa que aquestes cèl·lules pràcticament no mostrin efectes d'inhibició del creixement cel·lular al tractar-les amb el trastuzumab i el lapatinib. Les cèl·lules AU565**TR** continuen expressant FASN però els nivells d'HER2 i p-HER2 han desaparegut, en canvi, les AU565**LR** continuen expressant FASN, HER2 i p-HER2. Tant les cèl·lules AU565**TR** com les AU565**LR** continuen presentant amplificació del gen d'HER2 (valorat mitjançant FISH).
11. El G28UCM és citotòxic en les cèl·lules AU565**TR** amb una IC_{30} de 24 μ M i en les cèl·lules AU565**LR** amb una IC_{30} de 17 μ M similar a la IC_{30} del G28UCM a les cèl·lules parentals AU565 ($IC_{30}=22 \mu$ M); mostrant que el nostre compost G28UCM segueix essent efectiu en les cèl·lules tumorals resistents al trastuzumab (AU565**TR**) i al lapatinib (AU565**LR**).
12. Els nostres resultats proporcionen el fonament pel desenvolupament preclínic del G28UCM, sol o en combinació amb les teràpies anti-HER existents, en els tumors de mama que sobreexpressen HER2 i els que han progressat al tractament amb trastuzumab i lapatinib.

Bibliografia

1. Maier, T., S. Jenni, and N. Ban, *Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution*. *Science*, 2006. 311(5765): p. 1258-1262.
2. Eaton, S., K. Bartlett, and M. Pourfarzam, *Mammalian mitochondrial beta-oxidation*. *Biochemical Journal*, 1996. 320(2): p. 345-357.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. 144(5): p. 646-674.
4. Clemens, M.J., *Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation*. *Oncogene*, 2004. 23(18): p. 3180-3188.
5. Rahman, L., et al., *Thymidylate synthase as an oncogene: a novel role for an essential DNA synthesis enzyme*. *Cancer Cells*, 2004. 5(4): p. 341-351.
6. Voeller, D., L. Rahman, and M. Zajac-Kaye, *Elevated levels of thymidylate synthase linked to neoplastic transformation of mammalian cells*. *Cell Cycle*, 2004. 3(8): p. 1005-1007.
7. Averous, J. and C.G. Proud, *When translation meets transformation: the mTOR story*. *Oncogene*, 2006. 25(48): p. 6423-6435.
8. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. *Science*, 1956. 123(3191): p. 309-314.
9. Menendez, J.A. and R. Lupu, *Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis*. *Nature reviews. Cancer*, 2007. 7(10): p. 763-777.
10. Kuhajda, F.P., *Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology*. *Nutrition*, 2000. 16(3): p. 202-208.
11. Kuhajda, F.P., *Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway*. *Cancer Research*, 2006. 66(12): p. 5977-5980.
12. Milgraum, L.Z., et al., *Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in situ breast carcinoma*. *Clinical Cancer Research*, 1997. 3(11): p. 2115-2120.
13. Zhao, W., et al., *Fatty acid synthase: a novel target for antiglioma therapy*. *British Journal of Cancer*, 2006. 95(7): p. 869-878.
14. Witkowski, A., A.K. Joshi, and S. Smith, *Coupling of the de novo fatty acid biosynthesis and lipoylation pathways in mammalian mitochondria*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. 282(19): p. 14178-14185.
15. Liu, H., et al., *Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker*. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2010. 1(1): p. 69-89.
16. Rashid, A., et al., *Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia*. *American Journal of Pathology*, 1997. 150(1): p. 201-208.
17. Gelebart, P., et al., *Interleukin 22 signaling promotes cell growth in mantle cell lymphoma*. *Translational Oncology*, 2011. 4(1): p. 9-19.
18. Smith, S., *The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes*. *FASEB Journal*, 1994. 8(15): p. 1248-1259.
19. Maier, T., M. Leibundgut, and N. Ban, *The crystal structure of a mammalian fatty acid synthase*. *Science*, 2008. 321(5894): p. 1315-1322.
20. Wakil, S.J., *Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme*. *Biochemistry*, 1989. 28(11): p. 4523-4530.
21. Little, J.L. and S.J. Kridel, *Fatty acid synthase activity in tumor cells*. *Sub-Cellular Biochemistry*, 2008. 49: p. 169-194. Review.
22. Weiss, L., et al., *Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase*. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 1986. 36(9): p. 905-912.
23. Schweizer, M., et al., *Transcription factors acting on the promoter of the rat fatty acid synthase gene*. *Biochemical Society Transactions*, 2002. 30(6): p. 1070-1072.
24. Teran-Garcia, M., et al., *Polyunsaturated fatty acid suppression of fatty acid synthase (FASN): evidence for dietary modulation of NF-Y binding to the Fasn promoter by SREBP-1c*. *Biochemical Journal*, 2007. 402(3): p. 591-600.
25. Hsu, M.H., S.S. Chirala, and S.J. Wakil, *Human fatty-acid synthase gene. Evidence for the presence of two promoters and their functional interaction*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. 27(23): p. 13584-13592.

26. Relat, J. and T. Puig, *Design of Anti-Fasn Molecules as a New Anti-Tumour Modality*, in *Frontiers in Drug Design and Discovery* 2010, Benthan Science Publishers Ltd. p. 168-211.
27. Costello, L.C. and R.B. Franklin, 'Why do tumour cells glycolyse?': from glycolysis through citrate to lipogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2005. 280(1-2): p. 1-8.
28. Kim, J.W. and C.V. Dang, *Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect*. *Cancer Research*, 2006. 66(18): p. 8927-8930.
29. Yang, Y.A., et al., *Regulation of fatty acid synthase expression in breast cancer by sterol regulatory element binding protein-1c*. *Experimental Cell Research*, 2003. 282(2): p. 132-137.
30. Furuta, E., et al., *Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1*. *Cancer Research*, 2008. 68(4): p. 1003-1011.
31. Jayakumar, A., et al., *Isolation and chromosomal mapping of genomic clones encoding the human fatty acid synthase gene*. *Genomics*, 1994. 23(2): p. 420-424.
32. Shah, U.S., et al., *Fatty acid synthase gene overexpression and copy number gain in prostate adenocarcinoma*. *Human Pathology*, 2006. 37(4): p. 401-409.
33. Yoon, S., et al., *Up-regulation of acetyl-CoA carboxylase alpha and fatty acid synthase by human epidermal growth factor receptor 2 at the translational level in breast cancer cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. 282(36): p. 26122-26131.
34. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. 100(1): p. 57-70.
35. Hochachka, P.W., et al., *Going malignant: the hypoxia-cancer connection in the prostate*. *Bioessays*, 2002. 24(8): p. 749-757.
36. Wang, Y., et al., *Fatty acid synthase (FAS) expression in human breast cancer cell culture supernatants and in breast cancer patients*. *Cancer Letters*, 2001. 167(1): p. 99-104.
37. Bandyopadhyay, S., et al., *FAS expression inversely correlates with PTEN level in prostate cancer and a PI 3-kinase inhibitor synergizes with FAS siRNA to induce apoptosis*. *Oncogene*, 2005. 24(34): p. 5389-5395.
38. Zhang, D., et al., *Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive breast cancer*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2005. 4(11): p. 1686-1696.
39. Puig, T., R. Porta, and R. Colomer, *Fatty acid synthase: a new anti-tumor target*. *Medicina Clinica*, 2009. 132(9): p. 359-363.
40. Rodriguez-Gonzalez, A., et al., *Inhibition of choline kinase renders a highly selective cytotoxic effect in tumour cells through a mitochondrial independent mechanism*. *International Journal of Oncology*, 2005. 26(4): p. 999-1008.
41. Nagy, P., et al., *Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2*. *Journal of Cell Science*, 2002. 115(22): p. 4251-4262.
42. Menendez, J.A., R. Lupu, and R. Colomer, *Targeting fatty acid synthase: potential for therapeutic intervention in her-2/neu-overexpressing breast cancer*. *Drug news and perspectives*, 2005. 18(6): p. 375-385.
43. Knowles, L.M., et al., *A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279(29): p. 30540-30545.
44. Menendez, J.A., et al., *Novel signaling molecules implicated in tumor-associated fatty acid synthase-dependent breast cancer cell proliferation and survival: Role of exogenous dietary fatty acids, p53-p21WAF1/CIP1, ERK1/2 MAPK, p27KIP1, BRCA1, and NF-kappaB*. *International Journal of Oncology*, 2004. 24(3): p. 591-608.
45. Li, J.N., et al., *Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53*. *Cancer Research*, 2001. 61(4): p. 1493-1499.
46. Menendez, J.A. and R. Lupu, *RNA interference-mediated silencing of the p53 tumor-suppressor protein drastically increases apoptosis after inhibition of endogenous fatty acid metabolism in breast cancer cells*. *International Journal of Molecular Medicine*, 2005. 15(1): p. 33-40.

47. Bandyopadhyay, S., et al., *Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells*. *Cancer Research*, 2006. 66(11): p. 5934-5940.
48. Menendez, J.A., et al., *Pharmacological and small interference RNA-mediated inhibition of breast cancer-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) synergistically enhances Taxol (paclitaxel)-induced cytotoxicity*. *International Journal of Cancer*, 2005. 115(1): p. 19-35.
49. Vance, D., et al., *Inhibition of fatty acid synthetases by the antibiotic cerulenin*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1972. 48(3): p. 649-656.
50. Omura, S., *The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis*. *Bacteriological Reviews*, 1976. 40(3): p. 681-697.
51. Pizer, E.S., et al., *Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines*. *Cancer Research*, 1998. 58(20): p. 4611-4615.
52. Loftus, T.M., et al., *Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors*. *Science*, 2000. 288(5475): p. 2379-23781.
53. Nicot, C., et al., *C75 activates malonyl-CoA sensitive and insensitive components of the CPT system*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004. 325(3): p. 660-664.
54. Puig, T., et al., *Green tea catechin inhibits fatty acid synthase without stimulating carnitine palmitoyltransferase-1 or inducing weight loss in experimental animals*. *Anticancer Research*, 2008. 28(6A): p. 3671-3676.
55. Orita, H., et al., *Selective inhibition of fatty acid synthase for lung cancer treatment*. *Clinical Cancer Research*, 2007. 13(23): p. 7139-7145.
56. Orita, H., et al., *Inhibiting fatty acid synthase for chemoprevention of chemically induced lung tumors*. *Clinical Cancer Research*, 2008. 14(8): p. 2458-2464.
57. Kao, Y.H., R.A. Hiipakka, and S. Liao, *Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate*. *Endocrinology*, 2000. 141(3): p. 980-987.
58. Brusselmans, K., et al., *Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells*. *International Journal of Cancer*, 2003. 106(6): p. 856-862.
59. Ikeda, I., et al., *Tea catechins with a galloyl moiety suppress postprandial hypertriglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats*. *Journal of Nutrition*, 2005. 135(2): p. 155-159.
60. Wolfram, S., et al., *TEAVIGO (epigallocatechin gallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass*. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2005. 49(1): p. 54-63.
61. Tian, W.X., *Inhibition of fatty acid synthase by polyphenols*. *Current Medicinal Chemistry*, 2006. 13(8): p. 967-977.
62. Vergote, D., et al., *(-)-Epigallocatechin (EGC) of green tea induces apoptosis of human breast cancer cells but not of their normal counterparts*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2002. 76(3): p. 195-201.
63. Vazquez-Martin, A., et al., *Overexpression of fatty acid synthase gene activates HER1/HER2 tyrosine kinase receptors in human breast epithelial cells*. *Cell Proliferation*, 2008. 41(1): p. 59-85.
64. Kridel, S.J., W.T. Lowther, and C.W.t. Pemble, *Fatty acid synthase inhibitors: new directions for oncology*. *Expert Opinion On Investigation Drugs*, 2007. 6(11): p. 1817-1829.
65. Puig, T., et al., *Fatty acid metabolism in breast cancer cells: differential inhibitory effects of epigallocatechin gallate (EGCG) and C75*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2008. 109(3): p. 471-479.
66. Kridel, S.J., et al., *Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity*. *Cancer Research*, 2004. 64(6): p. 2070-2075.
67. Liu, B., et al., *Triclosan inhibits enoyl-reductase of type I fatty acid synthase in vitro and is cytotoxic to MCF-7 and SKBr-3 breast cancer cell*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2002. 49(3): p. 187-193.

68. Wang, X. and W.X. Tian, *Green tea epigallocatechin gallate: a natural inhibitor of fatty-acid synthase*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. 288(5): p. 1200-1206.
69. Colomer, R., et al., *Novel polyhydroxylated compounds as fatty acid synthase (FASN) inhibitors*, E. Patent, Editor 2007: Spain.
70. Puig, T., et al., *Novel Inhibitors of Fatty Acid Synthase with Anticancer Activity*. Clinical Cancer Research, 2009. 15(24): p. 7608-7615.
71. Pollan, M., et al., *Recent changes in breast cancer incidence in Spain, 1980-2004*. Journal of the National Cancer Institute, 2009. 101(22): p. 1584-1591.
72. Izquierdo, A., et al., *Analysis of cancer incidence, survival and mortality according to the main tumoral localizations, 1985-2019: Breast cancer*. Medicina Clinica, 2008. 131(1): p. 50-52.
73. Kumar, V., et al., *Patología estructural y funcional*, ed. R.y. Cotran.2010: Elsevier España, S. L.
74. Bocker, W., et al., *Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept*. Laboratory Investigation, 2002. 82(6): p. 737-746.
75. Tuttle, T.M., et al., *A review of technical aspects of sentinel lymph node identification for breast cancer*. Journal of the American College of Surgeons, 2002. 195(2): p. 261-268.
76. Clemons, M. and P. Goss, *Estrogen and the risk of breast cancer*. New England Journal of Medicine, 2001. 344(4): p. 276-285. Review.
77. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. 98(19): p. 10869-10874.
78. Sorlie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. 100(14): p. 8418-8423.
79. Rouzier, R., et al., *Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy*. Clinical Cancer Research, 2005. 11(16): p. 5678-5685.
80. Abad Esteve, A., et al., *Tratado de Oncología*, ed. R.C.B. Hernán Cortés-Funes. Vol. 1. 2009: PUBLICACIONES PERMANYER.
81. Cortés-Funes, H. and R. Colomer Bosc, *Tratado de oncología*2009: Permanyer.
82. Carey, L.A., et al., *Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study*. JAMA, 2006. 295(21): p. 2492-2502.
83. Carey, L.A., et al., *Gene expression subtype and p53 mutational status are correlated among neoadjuvantly treated breast cancers in UNC LCCC9819 and I-SPY1 (CALGB 150007/ ACRIN 6657)*. Journal of Clinical Oncology, 2006. 24 (18): p. Abstract num 10048.
84. Cho, H.S., et al., *Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab*. Nature, 2003. 421(6924): p. 756-760.
85. Baselga, J., *Treatment of HER2-overexpressing breast cancer*. Annals of Oncology, 2010. 21(Suppl 7:vii): p. 36-40. Review.
86. Shepard, H.M., C.M. Brdlik, and H. Schreiber, *Signal integration: a framework for understanding the efficacy of therapeutics targeting the human EGFR family*. Journal of Clinical Investigation, 2008. 118(11): p. 3574-3581.
87. Chu, E.C. and A.S. Tarnawski, *PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology*. Medical Science Monitor, 2004. 10(10): p. RA235-241.
88. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell*, ed. t. edition2002: Garland Science.
89. Roberts, P.J. and C.J. Der, *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer*. Oncogene, 2007. 26(22): p. 3291-3310.
90. Moreno-Aspitia, A., *Clinical overview of sorafenib in breast cancer*. Future Oncology, 2010. 6(5): p. 655-663.
91. Fornaro, L., et al., *Anti-HER agents in gastric cancer: from bench to bedside*. Nature reviews. Gastroenterology & Hepatology, 2011. 8(7): p. 369-383.
92. Carpenter, G. and S. Cohen, *Epidermal growth factor*. Annual Review of Biochemistry, 1979. 48: p. 193-216. Review.

93. Massagué, J., *Transforming growth factor-alpha. A model for membrane-anchored growth factors*. Journal of Biological Chemistry, 1990. 265(35): p. 21393-21396.
94. Massagué, J. and A. Pandiella, *Membrane-anchored growth factors*. Annual Review of Biochemistry, 1993. 62(1): p. 515-541. Review.
95. Boonstra, J., et al., *The epidermal growth factor*. Cell Biology International, 1995. 19(5): p. 413-430. Review.
96. Alroy, I. and Y. Yarden, *The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions*. FEBS Letters, 1997. 410(1): p. 83-86.
97. Carraway, K.L., et al., *Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases*. Nature, 1997. 387(6632): p. 512-516.
98. Riese, D.J.n. and D.F. Stern, *Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network*. Bioessays, 1998. 20(1): p. 41-48.
99. Goodman, L.S. and M.M. Wintrobe, *Nitrogen mustard therapy. Use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders*. JAMA, 1946. 132: p. 126-132.
100. Allemand, D., et al., *Cáncer De Mama: Avances en Diagnóstico, Tratamiento e Investigación*, ed. Á.R. José Díaz-Faes 2006: FEMA.
101. Osborne, C.K., *Tamoxifen in the treatment of breast cancer*. New England Journal of Medicine, 1998. 339(22): p. 1609-1618.
102. Fisher, B., et al., *Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study*. Journal of the National Cancer Institute, 2005. 97(22): p. 1652-1662.
103. Beverage, J.N., et al., *CYP2D6 polymorphisms and the impact on tamoxifen therapy*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. 96(9): p. 2224-2231.
104. Gibson, L., et al., *Aromatase inhibitors for treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women*. Cochrane Database Systems Reviews, 2009. 7(4): p. CD003370. Review.
105. Gutierrez, C. and R. Schiff, *HER2: biology, detection, and clinical implications*. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 2011. 135(1): p. 55-62. Review.
106. Wang, S.C. and M.C. Hung, *HER2 overexpression and cancer targeting*. Seminars in Oncology, 2001. 28(5 Suppl 16): p. 115-124.
107. Nelson, M.H. and C.R. Dolder, *Lapatinib: a novel dual tyrosine kinase inhibitor with activity in solid tumors*. Annals of Pharmacotherapy, 2006. 40(2): p. 261-269.
108. Rosell, R., et al., *Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial*. Lancet Oncology, 2012. 13(3): p. 239-246.
109. Dickler, M.N., et al., *A phase II trial of erlotinib in combination with bevacizumab in patients with metastatic breast cancer*. Clinical Research, 2008. 14(23): p. 7878-7883.
110. Arteaga, C.L. and D.H. Johnson, *Tyrosine kinase inhibitors-ZD1839 (Iressa)*. Current Opinion in Oncology, 2001. 13(6): p. 491-498.
111. Harari, D. and Y. Yarden, *Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer*. Oncogene, 2000. 19(53): p. 6102-6114.
112. Okubo, S., et al., *Additive antitumour effect of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib (Iressa, ZD1839) and the antioestrogen fulvestrant (Faslodex, ICI 182,780) in breast cancer cells*. British Journal of Cancer, 2004. 90(1): p. 236-244.
113. Baselga, J., et al., *Phase II and tumor pharmacodynamic study of gefitinib in patients with advanced breast cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2005. 23(23): p. 5323-5333.
114. Rojo, F., et al., *Nuclear PARP-1 protein overexpression is associated with poor overall survival in early breast cancer*. Annals of Oncology, 2011. 22(5): p. 1156-1164.
115. Köhler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. 256(5517): p. 495-497.

116. Reilly, R.M., et al., *Problems of delivery of monoclonal antibodies. Pharmaceutical and pharmacokinetic solutions*. Clinical Pharmacokinetics, 1995. 28(2): p. 126-142.
117. Merluzzi, S., et al., *Humanized antibodies as potential drugs for therapeutic use*. Advances in Clinical Pathology, 2000. 4(2): p. 77-85.
118. Kim, E.S., F.R. Khuri, and R.S. Herbst, *Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225)*. Current Opinion in Oncology, 2001. 13(6): p. 506-513.
119. Vincenzi, B., et al., *Cetuximab: from bench to bedside*. Current Cancer Drug Targets, 2010. 10(1): p. 80-95.
120. Mendelsohn, J., *The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy*. Endocrine Related Cancer, 2001. 8(1): p. 3-9.
121. Ranpura, V., S. Hapani, and S. Wu, *Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis*. JAMA, 2011. 305(5): p. 487-494.
122. Franklin, M.C., et al., *Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex*. Cancer Cells, 2004. 5(4): p. 317-328.
123. Adams, C.W., et al., *Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2006. 55(6): p. 717-27.
124. Bernard-Marty, C., et al., *Monoclonal antibody-based targeted therapy in breast cancer: current status and future directions*. Drugs, 2006. 66(12): p. 1577-1591.
125. McKeage, K. and C.M. Perry, *Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2*. Drugs, 2002. 62(1): p. 209-243.
126. Muñoz, M., et al., *El cáncer de mama*. 2007. Hospital Clínic de Barcelona.
127. Shojaei, S., M. Gardaneh, and A. Rahimi Shamabadi, *Target points in trastuzumab resistance*. International Journal of Breast Cancer, 2012. 2012: p. 761917.
128. Nagata, Y., et al., *PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients*. Cancer cell, 2004. 6(2): p. 117-127.
129. Saal, L.H., et al., *PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma*. Cancer Research, 2005. 65(7): p. 2554-2559.
130. Molina, M.A., et al., *NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer*. Clinical Cancer Research, 2002. 8(2): p. 347-53.
131. Neve, R.M., et al., *Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells*. Oncogene, 2000. 19(13): p. 1647-1656.
132. Le, X.F., F. Pruefer, and R.C. Bast, Jr., *HER2-targeting antibodies modulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 via multiple signaling pathways*. Cell Cycle, 2005. 4(1): p. 87-95.
133. Workman, H.C., C. Sweeney, and K.L. Carraway, 3rd, *The membrane mucin Muc4 inhibits apoptosis induced by multiple insults via ErbB2-dependent and ErbB2-independent mechanisms*. Cancer Research, 2009. 69(7): p. 2845-2852.
134. Price-Schiavi, S.A., et al., *Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance*. International Journal of Cancer, 2002. 99(6): p. 783-791.
135. Helle, S.I., *The insulin-like growth factor system in advanced breast cancer*. Best practice and Research. Clinical endocrinology & metabolism, 2004. 18(1): p. 67-79.
136. Nahta, R. and F.J. Esteva, *HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance*. Breast Cancer Research, 2006. 8(6): p. 215.
137. Mittendorf, E.A., et al., *A novel interaction between HER2/neu and cyclin E in breast cancer*. Oncogene, 2010. 29(27): p. 3896-3907.
138. Scaltriti, M., et al., *Cyclin E amplification/overexpression is a mechanism of trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer patients*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. 108(9): p. 3761-3766.
139. Stockmeyer, B., et al., *Polymorphonuclear granulocytes induce antibody-dependent apoptosis in human breast cancer cells*. Journal of Immunology, 2003. 171(10): p. 5124-5129.

140. Swinnen, J.V., et al., *Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer*. International Journal of Cancer, 2002. 98(1): p. 19-22.
141. Kuhajda, F.P., et al., *Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. 97(7): p. 3450-3454.
142. Kuhajda, F.P., et al., *Fatty acid synthase: a potential selective target for antineoplastic therapy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. 91(14): p. 6379-6383.
143. Kumar-Sinha, C., et al., *Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis*. Cancer research, 2003. 63(1): p. 132-139.
144. Menendez, J.A., *Fine-tuning the lipogenic/lipolytic balance to optimize the metabolic requirements of cancer cell growth: molecular mechanisms and therapeutic perspectives*. Biochimica et biophysica acta, 2010. 1801(3): p. 381-91.
145. Grunt, T.W., et al., *Interaction between fatty acid synthase- and ErbB-systems in ovarian cancer cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. 385(3): p. 454-459.
146. Menendez, J.A., et al., *Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. 101(29): p. 10715-10720.
147. Jin, Q., et al., *Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells*. Breast Cancer Research, 2010. 12(6): p. R96.
148. Landis-Piowar, K.R., et al., *A novel prodrug of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate as a potential anticancer agent*. Cancer Research, 2007. 67(9): p. 4303-4310.
149. Jatoi, A., et al., *A phase II trial of green tea in the treatment of patients with androgen independent metastatic prostate carcinoma*. Cancer, 2003. 97(6): p. 1442-1446.
150. Choan, E., et al., *A prospective clinical trial of green tea for hormone refractory prostate cancer: an evaluation of the complementary/alternative therapy approach*. Urologic Oncology, 2005. 23(2): p. 108-113.
151. Pizer, E.S., et al., *Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells*. Cancer Research, 1996. 56(12): p. 2745-2747.
152. Aja, S., et al., *Pharmacological stimulation of brain carnitine palmitoyl-transferase-1 decreases food intake and body weight*. American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2008. 294(2): p. R352-361.
153. Miller, T.W., et al., *Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer*. Breast Cancer Research, 2011. 13(6): p. 224.
154. Janku, F., et al., *PIK3CA mutations in patients with advanced cancers treated with PI3K/AKT/mTOR axis inhibitors*. Molecular cancer therapeutics, 2011. 10(3): p. 558-565.
155. Shankar, S., Q. Chen, and R.K. Srivastava, *Inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK pathways act synergistically to enhance antiangiogenic effects of EGCG through activation of FOXO transcription factor*. Journal of Molecular Signaling, 2008. 3: p. 7.
156. Carvalho, M.A., et al., *Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model*. International Journal of Cancer, 2008. 123(11): p. 2557-2565.
157. Chuang, H.Y., Y.F. Chang, and J.J. Hwang, *Antitumor effect of orlistat, a fatty acid synthase inhibitor, is via activation of caspase-3 on human colorectal carcinoma-bearing animal*. Biomed Pharmacother, 2011. 65(4): p. 286-292.
158. Sheridan, C., et al., *CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis*. Breast Cancer Research, 2006. 8(5): p. R59.
159. Kristiansen, G., et al., *CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer*. Clinical Cancer Research, 2003. 9(13): p. 4906-4913.
160. Guarneri, V., et al., *Anti-HER2 neoadjuvant and adjuvant therapies in HER2 positive breast cancer*. Cancer Treatment Reviews, 2010. 36(Suppl 3): p. S62-66.

161. Albanell, J. and P. Gascon, *Small molecules with EGFR-TK inhibitor activity*. Current drug targets, 2005. 6(3): p. 259-274.
162. Ropero, S., et al., *Trastuzumab plus tamoxifen: anti-proliferative and molecular interactions in breast carcinoma*. Breast Cancer Research and Treatment, 2004. 86(2): p. 125-137.
163. Perez, E.A., et al., *Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31*. Journal of Clinical Oncology, 2011. 29(25): p. 3366-3373.
164. Slamon, D., et al., *Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer*. New England Journal of Medicine, 2011. 365(14): p. 1273-1283.
165. Geyer, C.E., et al., *Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer*. New England Journal of Medicine, 2006. 355(25): p. 2733-2743.
166. Curran, M.P., *Lapatinib: in postmenopausal women with hormone receptor-positive, HER2-positive metastatic breast cancer*. Drugs, 2010. 70(11): p. 1411-1422.
167. Vogel, C.L., et al., *Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2002. 20(3): p. 719-726.
168. Esteva, F.J., et al., *Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2002. 20(7): p. 1800-1808.
169. Albanell, J. and J. Baselga, *Unraveling resistance to trastuzumab (Herceptin): insulin-like growth factor-I receptor, a new suspect*. Journal of the National Cancer Institute, 2001. 93(24): p. 1830-1832.
170. Higgins, M.J. and J. Baselga, *Targeted therapies for breast cancer*. Journal of Clinical Investigation, 2011. 121(10): p. 3797-3803.
171. Konecny, G.E., et al., *Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells*. Cancer Research, 2006. 66(3): p. 1630-1639.
172. Ozbay, T., et al., *In vitro evaluation of pan-PI3-kinase inhibitor SF1126 in trastuzumab-sensitive and trastuzumab-resistant HER2-over-expressing breast cancer cells*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2010. 65(4): p. 697-706.
173. Nahta, R., et al., *P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells*. Cancer Research, 2004. 64(11): p. 3981-3986.
174. Eddy, S.F., S.E. Kane, and G.E. Sonenshein, *Trastuzumab-resistant HER2-driven breast cancer cells are sensitive to epigallocatechin-3 gallate*. Cancer Research, 2007. 67(19): p. 9018-9023.

Annex

ANNEX

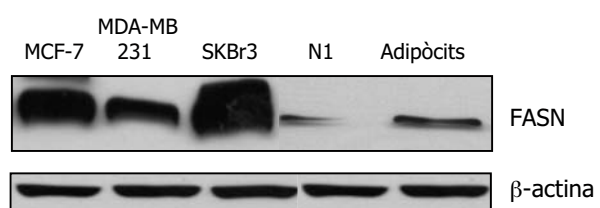
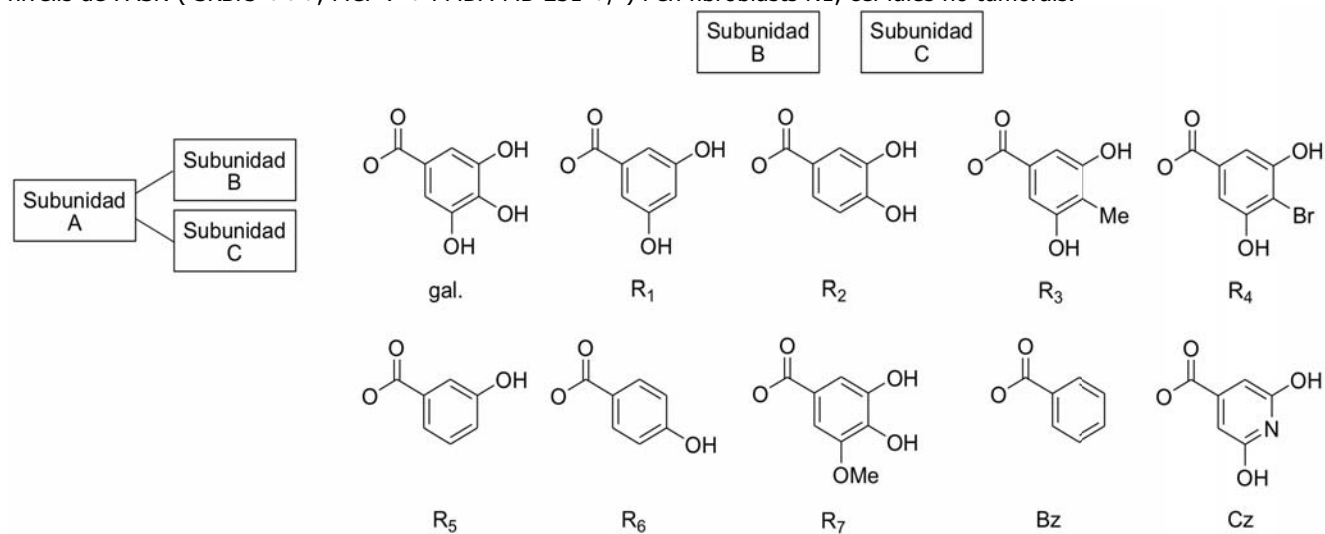
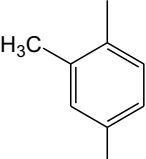
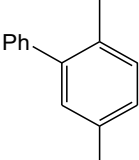
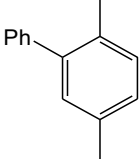
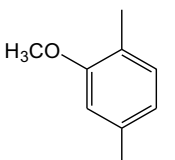
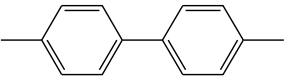
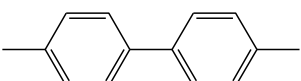


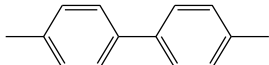
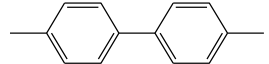
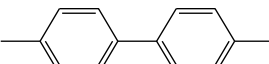
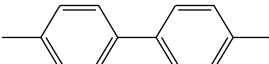
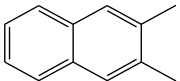
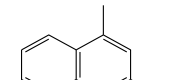
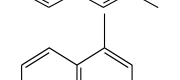
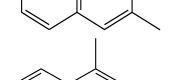
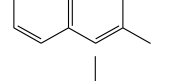
Figura A1. Nivells proteics de FASN en les diferents línies cel·lulars on s'ha comprovat la citotoxicitat dels compostos.

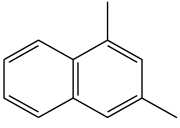
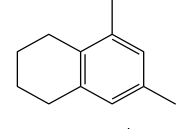
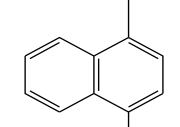
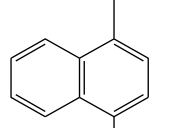
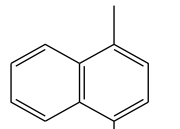
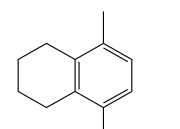
Taula A1. Esquema de síntesi de la quimioteca dels nous compostos. Quimioteca dels nous compostos derivats de l'EGCG i citotoxicitat en cèl·lules de càncer de mama amb diferents nivells de FASN (SKBr3 +++, MCF-7 + i MDA-MB-231 +/-) i en fibroblasts N1, cèl·lules no tumorals.

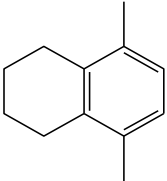
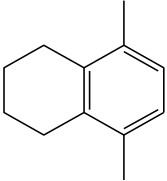
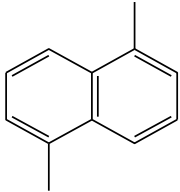
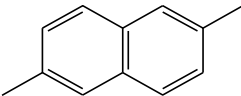
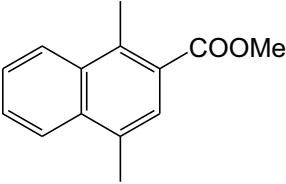


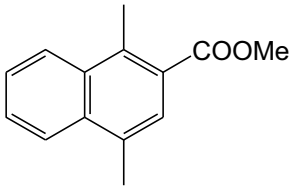
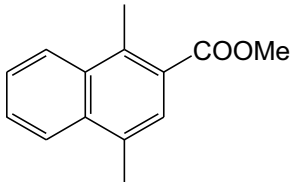
Codi laboratori	Codi patent	Sub. A	Sub. B	Sub. C	Línies cel·lulars (IC ₅₀ μM)				Inhibició de FASN (%)
					SKBr3	MCF-7	MDA-MB-231	N1	
CT66	n		gal.	gal.	> 100	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CT3	a		gal.	gal.	125 ± 5	165 ± 8	163 ± 3	N.D.	21%
CT33	b		gal.	gal.	42 ± 7,1	162 ± 18	173 ± 40	N.D.	N.I.

Codi laboratori	Codi patent	Sub. A	Sub. B	Sub. C	Línies cel·lulars (IC ₅₀ μM)				Inhibició de FASN (%)
					SKBr3	MCF-7	MDA-MB-231	N1	
CT61	c		gal.	gal.	23 ± 2	5 ± 15	55 ± 8	> 100	N.I.
CT68	o		gal.	gal.	17 ± 2	10 ± 3	40 ± 3	19 ± 7	N.I.
CT96	p		gal.	Bz	74 ± 5	N.D.	> 150	N.D.	N.D.
CT62	d		gal.	gal.	8 ± 1	30 ± 0,1	28 ± 1	>50	N.I.
CT56	q		gal.	gal.	4 ± 1	3 ± 0,1	5 ± 3	13 ± 4	60%
CT141	s		R ₁	R ₁	7,3 ± 2	N.D.	5,8 ± 2	33 ± 3	N.I.

Codi laboratori	Codi patent	Sub. A	Sub. B	Sub. C	Línies cel·lulars (IC ₅₀ µM)				Inhibició de FASN (%)
					SKBr3	MCF-7	MDA-MB-231	Fibroblasts	
CT192	t		R ₂	R ₂	90,0	N.D.	N.D.	17,0	N.D.
CT196	u		R ₂	R ₄	31,0	N.D.	N.D.	20,0	N.D.
CT194	v		R ₂	R ₇	<1	N.D.	N.D.	<1	
CT119	r		Cz	Cz	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
CT9	e		gal.	gal.	76 ± 9	89 ± 29	136 ± 27	N.D.	31%
CT28	f		gal.	gal.	21 ± 7	46 ± 18	79 ± 4	N.C.	90%
CT73	g		R ₁	R ₁	107 ± 30	N.D.	121 ± 7	N.D.	N.D.
CT80	h		R ₂	R ₂	20,7 ± 11	23,7 ± 12	19 ± 1	105*	75%
CT185	w		R ₄	R ₄	46,7 ± 12	N.D.	N.D.	79,5 ± 15	N.D.

Codi laboratori	Codi patent	Sub. A	Sub. B	Sub. C	Línies cel·lulars (IC ₅₀ µM)				Inhibició de FASN (%)
					SKBr3	MCF-7	MDA-MB-231	Fibroblasts	
CT193	x		R ₇	R ₇	3,0	N.D.	N.D.	2,0	N.I.
CT127	y		gal.	gal.	31 ± 3	81 ± 16	98 ± 11	>150	N.I.
CT37	i		gal.	gal.	29 ± 0,3	44 ± 16	63 ± 1	N.C.	69%
CT74	j		R ₁	R ₁	115 ± 7	N.D.	24 ± 0,9	N.D.	N.D.
CT81	k		R ₂	R ₂	37,5 ± 6	49,3 ± 10	27 ± 11	68*	40% (12h)
CT128	z		gal.	gal.	41 ± 3	43 ± 10	104,5 ± 10	127,5 ± 32	N.I.

Codi laboratori	Codi patent	Sub. A	Sub. B	Sub. C	Línies cel·lulars (IC ₅₀ μM)				Inhibició de FASN (%)
					SKBr3	MCF-7	MDA-MB-231	Fibroblasts	
CT154	aa		R ₃	R ₃	49,5 + 4,9	N.D.	N.D.	45,5 + 13,4	N.D.
CT162	bb		gal.	R ₃	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CT54 CT136	m		gal.	gal.	25,67 ± 3	69 ± 14	186,3 ± 10	>150	20%
CT55 CT135	l		gal.	gal.	5,5 ± 1	13 ± 1,8	15,33 ± 1	>200	25%
CT186	cc		gal.	R ₄	16,5 + 4,9	N.D.	N.D.	91,5 + 2,1	N.D.

Codi laboratori	Codi patent	Sub. A	Sub. B	Sub. C	Línies cel·lulars (IC ₅₀ μM)				Inhibició de FASN (%)
					SKBr3	MCF-7	MDA-MB-231	Fibroblasts	
CT173	dd		gal.	R ₅	15,5 + 3,5	N.D.	N.D.	39,5 + 6,4	N.I.
CT168	ee		gal.	R ₆	33,0 + 1,4	N.D.	N.D.	67,5 + 4,9	N.I.

N.D. No Determinat

N.C. No Citotòxic (a les concentracions testades 2-100 μM)

N.I. No Inhibeix

N.S. No Soluble

