

**TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**IDENTIFICACIÓN DE BLANCOS  
SECUNDARIOS DE LOS INHIBIDORES  
DE IGF-1R COMO ALTERNATIVA  
TERAPÉUTICA**

María Poveda Deltell

Grado en Biotecnología (2014-2015)

Facultad de Ciencias Experimentales

---

**Tutores:**

Miguel Saceda Sánchez y María del Pilar García Morales

Área de Bioquímica y Biología Molecular

## ÍNDICE

RESUMEN .....	3
SUMMARY .....	3
INTRODUCCIÓN .....	4
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS .....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
CULTIVO CELULAR.....	10
TRATAMIENTOS .....	10
ENSAYO MTT.....	10
CICLO CELULAR .....	11
DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA MEDIANTE HIBRIDACIÓN WESTERN.....	12
Extracción de proteínas .....	12
Determinación de la concentración de proteína mediante el método Bradford.....	12
Electroforesis en geles de poliacrilamida .....	12
Transferencia a membranas de PVDF .....	13
Bloqueo.....	13
Incubación con el anticuerpo primario .....	13
Incubación con el anticuerpo secundario.....	13
Revelado .....	14
ELISA.....	14
ARRAY DE FOSFOPROTEÍNAS.....	15
ESTADÍSTICA .....	15
RESULTADOS.....	16
<b>OBJETIVO 1:</b> DEMOSTRAR LA INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR DE IGF-1R MEDIADA POR OSI-906 Y BMS-754807 .....	16
<b>OBJETIVO 2:</b> DEMOSTRAR LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LOS INHIBIDORES DE IGF-1R ESTUDIADOS .....	19
<b>OBJETIVO 3:</b> DETERMINAR EL MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR POR EL CUAL DETIENEN LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CÁNCER.....	21
<b>OBJETIVO 4:</b> DETERMINAR LAS DIFERENCIAS EN EL MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR DE AMBAS MOLÉCULAS POR EL CUAL TIENEN EFECTOS ANTIPROLIFERATIVOS.....	24
<b>OBJETIVO 5:</b> DETERMINAR LOS BLANCOS ALTERNATIVOS DEL INHIBIDOR DE IGF-1R BMS-754807 .....	28
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....	34
BIBLIOGRAFÍA .....	36

## RESUMEN

El cáncer es una enfermedad genética de carácter multifactorial que figura entre las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Por ello, es necesario buscar nuevas terapias alternativas para conseguir una mayor supervivencia de los pacientes. La vía de transducción de señales regulada por el IGF-1R ha sido relacionada en diferentes tipos de tumores con la proliferación y la supervivencia de las células tumorales, por tanto, constituye un interesante blanco terapéutico para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos.

Este estudio se centra en determinar el efecto que dos inhibidores de la vía de IGF-1R tienen sobre líneas celulares y cultivos primarios de distintos tipos de cáncer. Nuestros resultados muestran que el inhibidor de IGF-1R OSI-906 o Linsitinib bloquea las células en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular mientras que el inhibidor BMS-754807 bloquea en G<sub>2</sub>/M y causa posteriormente la muerte celular por apoptosis.

Tras realizar estudios combinando ambos inhibidores, se observa que BMS-754807 tiene un mayor efecto antiproliferativo que OSI-906 y, además, predomina el mecanismo de acción molecular por el que actúa. Nuestros resultados también muestran diferencias en cuanto a la sensibilidad/resistencia a ambos inhibidores en distintas líneas celulares, lo que sugiere que el inhibidor BMS-754807 tiene, probablemente, blancos secundarios distintos del IGF-1R que podrían convertirse en nuevas dianas terapéuticas antineoplásicas.

**PALABRAS CLAVE:** Cáncer, terapias alternativas, IGF-1R, inhibidores, OSI-906, BMS-754807, efecto antiproliferativo, apoptosis, blancos secundarios.

## SUMMARY

Cancer is a multifactorial genetic disease and is among the leading causes of morbidity and mortality worldwide. It is therefore necessary to look for new alternative therapies for greater survival of patients. The signal transduction pathway regulated by IGF-1R has been implicated in various tumor types with the proliferation and survival of tumor cells. This means, therefore, that it is an interesting therapeutic target for the development of new anticancer drugs.

This study focuses on determining the effect that two inhibitors of IGF-1R have on cell lines and primary cultures of various types of cancer. Our results show that the IGF-1R inhibitor OSI-906 or Linsitinib blocks cells in the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle while the inhibitor BMS-754807 blocks in G<sub>2</sub>/M and then causes cell death by apoptosis.

After performing studies in which both inhibitors are combined, we observe that BMS-754807 has greater antiproliferative effect than OSI-906 and also its molecular mechanism of action is dominant over OSI-906 effect. Equally, our results show differences in sensitivity/resistance to both inhibitors in different cell lines, suggesting that the inhibitor BMS-754807 has probably off-target that could become new anticancer therapeutic targets.

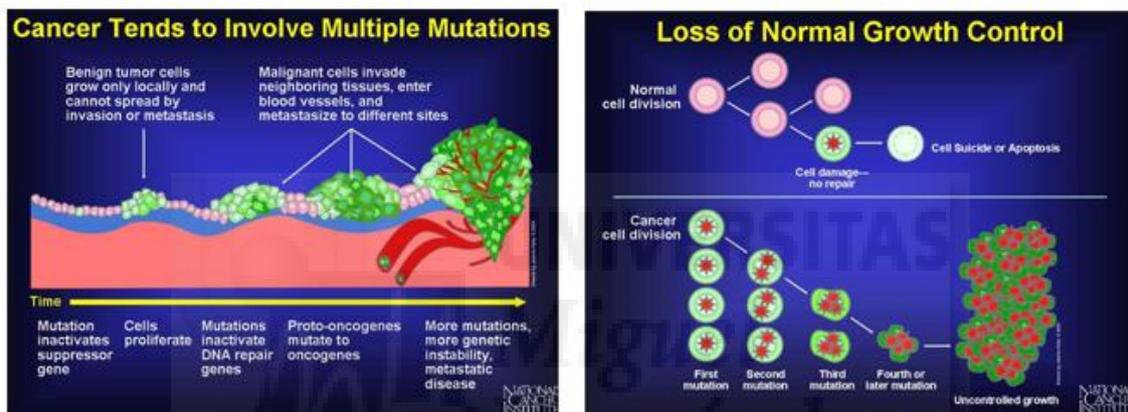
**KEY WORDS:** Cancer, alternative therapies, IGF-1R, inhibitors, OSI-906, BMS-754807, antiproliferative effect, apoptosis, off-target.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad genética caracterizada por una alteración en los genes que controlan diversas funciones celulares asociadas fundamentalmente a la proliferación y la diferenciación. Los genes cuya expresión y actividad se encuentra alterada en la carcinogénesis, se pueden clasificar básicamente en tres grupos: oncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del ADN [1].

El cáncer se desarrolla cuando las células escapan al control de la muerte celular programada y proliferan descontroladamente [1].

Las células cancerosas difieren de las células normales en muchos aspectos que les permiten crecer sin control e invadir los tejidos circundantes. Una diferencia importante es que están menos diferenciadas que las células normales, por lo que pueden continuar dividiéndose [1].



**FIGURA 1: El cáncer tiende a incluir varias mutaciones - Pérdida del control normal del crecimiento.**

Las células cancerosas pueden inducir a las células endoteliales cercanas a que formen vasos sanguíneos para que suministren oxígeno y nutrientes, necesarios para que crezcan los tumores y también retiran los productos de deshecho de los mismos [1]. Este proceso de creación de vasos sanguíneos que irrigan al tumor se llama angiogénesis tumoral.

Los tumores cancerosos son malignos, lo que significa que se pueden extender a los tejidos cercanos, invadiéndolos. Además, al crecer estos tumores, algunas células cancerosas pueden desprenderse y moverse a lugares distantes del cuerpo por medio del sistema circulatorio o del sistema linfático y formar nuevos tumores lejos del tumor original, a éste proceso se le denomina metástasis [1].

Las células cancerosas, con frecuencia, son también capaces de evadir el sistema inmunitario, aunque a veces utilizan dicho sistema inmune en su propio beneficio, para mantenerse vivas y proliferar [1].

El cáncer figura entre las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, con aproximadamente 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes en 2012. Se espera que el número de nuevos casos aumente el 70% en las próximas dos décadas. Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer, son debidas a diversos

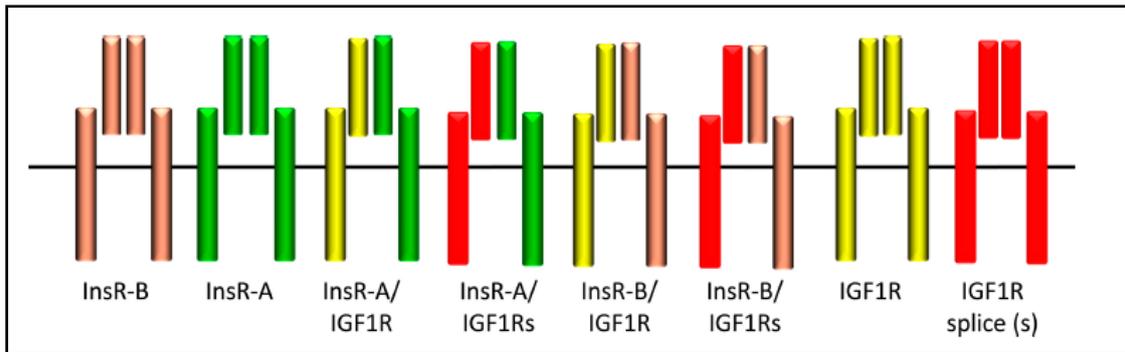
factores de riesgo asociados con hábitos y alimentación: alto índice de masa corporal, bajo consumo de frutas y verduras, baja actividad física, consumo de tabaco y de alcohol [2]. Los cánceres con mayor índice de mortalidad son: cáncer de pulmón, hígado, estómago, mama y esófago [2].

Es esencial un diagnóstico correcto de cáncer para un tratamiento adecuado y eficaz, ya que cada tipo de cáncer requiere un régimen específico de tratamiento. Los tratamientos convencionales abarcan la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. Sin embargo, en muchos casos se produce una resistencia a los fármacos quimioterápicos comúnmente utilizados, por lo que la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de los tumores quimiorresistentes, constituye uno de los objetivos prioritarios de la investigación oncológica. [2].

Datos clínicos y experimentales recogidos en los pasados 25 años sugieren que el gen IGF-1R exhibe un patrón de expresión en células malignas que reflejan su papel pro-supervivencia. Utilizando diversas técnicas, muchos estudios han mostrado consistentemente que el IGF-1R se expresa en niveles elevados en tumores primarios y células derivadas de cáncer. Estos tumores incluyen, entre otros, mama, próstata, ovario, colon, hematopoyético y cánceres renales. Este aumento en el nivel de IGF-1R refleja una reversión a estados más primitivos, menos diferenciados y oncogénicos que son caracterizados por altas concentraciones de ARNm del IGF-1R y de sitios de unión al IGF. Lo importante de este paradigma reside en el hecho de que niveles mayores de IGF-1R y de señalización de IGF-1 se consideran factores clave, indispensables para las células tumorales, constituyendo por tanto una vía oncogénica importante [3].

El IGF-1R es un receptor tirosin quinasa situado en la membrana celular que está involucrado en procesos de crecimiento, desarrollo y diferenciación. Además, muestra una muy fuerte actividad antiapoptótica. Los ligandos que unen el IGF-1R son los factores de crecimiento parecidos a la insulina 1 y 2 (IGF-1 e IGF-2), a los que se une con alta afinidad, y la insulina, con una afinidad significativamente reducida [3].

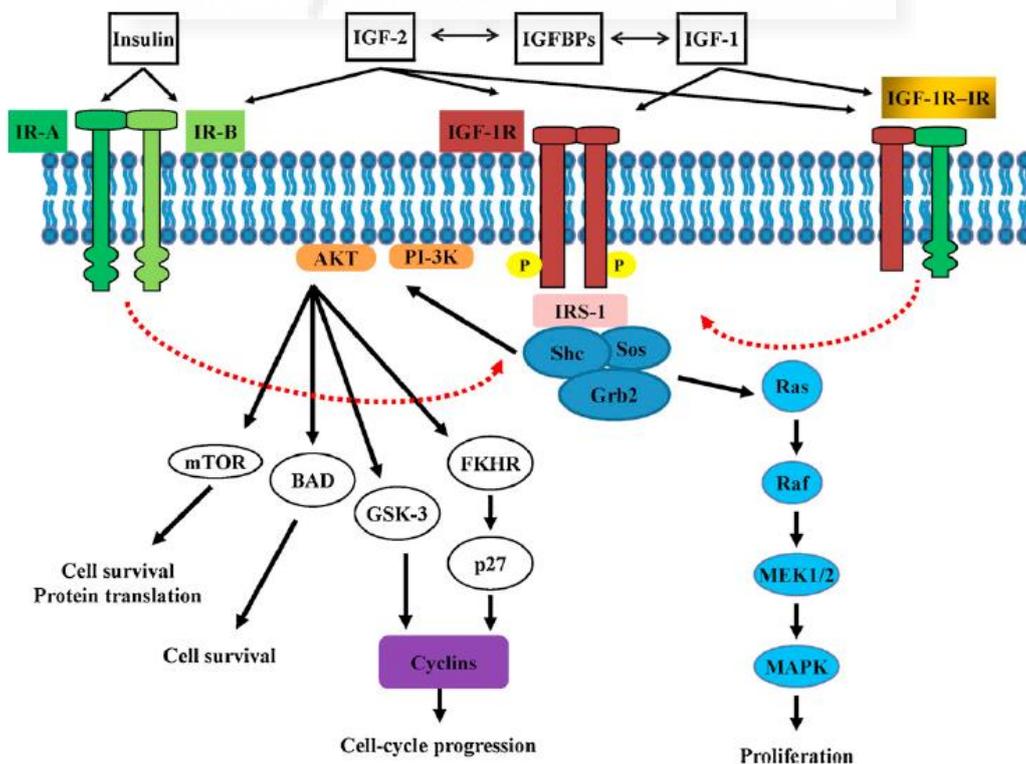
El transcrito primario del gen IGF1R se traduce a una sola cadena polipeptídica y entonces se procesa, dando lugar a un dominio extracelular (subunidad  $\alpha$ ) y un dominio transmembrana o citoplásmico (subunidad  $\beta$ ) que contiene actividad de la tirosina quinasa [4]. Estas dos subunidades se procesan y se unen covalentemente, siendo la estructura del receptor un heterotetrámero con la conformación  $\beta\alpha\alpha\beta$  [3]. El ensamblaje final del receptor también puede ocurrir con las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor de la insulina. Sin embargo, existen dos formas de proteínas del receptor de insulina y del IGF-1R debido a variantes de empalme. Por lo tanto, existen 8 tipos de heterotetrámeros del IGF-1R [4].



**FIGURA 2:** Se muestran las ocho formas de heterotetrámeros posibles en el IGF-1R formados por variantes del receptor de insulina (InsR-A e InsR-B) y por el IGF-1R normal y su variante de *splicing* (IGF-1Rs). Los cuatro hemireceptores pueden homo y heterotetramerizar para formar multiples subtipos del receptor [4].

La acción biológica del IGF-1R está modulada por la familia de proteínas de unión a IGF (IGFBPs: *IGF binding proteins*) que incluye al menos seis miembros (IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5, IGFBP6). Las IGFBPs regulan la biodisponibilidad de IGF-1 e IGF-2, que sirve para protegerlos de la degradación por proteasas. La afinidad de las IGFBPs por los IGFs es 1-2 órdenes de magnitud mayor que la afinidad mostrada por el receptor. Además, los IGFBPs también regulan la biodisponibilidad de los IGF en el microambiente celular compitiendo por la unión de ligando con el receptor [3,5].

La activación del IGF-1R conduce a la autofosforilación del dominio tirosin quinasa, con la consiguiente activación de las vías de señalización de las quinasas Ras-Raf-MAP y PI3K-PKB/AKT. La activación de estos mediadores es crítica para que el IGF-1R ejerza sus actividades mitogénicas y antiapoptóticas [3].



**FIGURA 3: Los componentes del Sistema IGF y las moléculas efectoras aguas abajo. BAD, *Bcl-associated dimer*; FKHR, *forkhead transcription factor*; Grb2, *growth factor receptor-binding protein 2*; GSK-3, *glycogen synthase kinase-3*; IGF, *insulin-like growth factor*; IGF-1R, *IGF-1 receptor*; IGFBPs, *IGF-binding proteins*; IR, *insulin receptor*; IRS-1, *insulin receptor substrate-1*; MAPK, *mitogen-activated protein kinase*; MEK, *MAPK/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase*; mTOR, *mammalian target of rapamycin*; P, *phosphate groups*; PI-3K, *phosphatidylinositol-3 kinase*; PTEN, *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*; Sos, *son of sevenless*. [5]**

La señalización del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) está altamente implicada en el cáncer. En esta señalización IGF-1R es crucial para la transformación tumoral y la supervivencia de las células malignas, pero está sólo parcialmente implicado en el crecimiento celular normal.

La vía de señalización del receptor (IGF-1R) del IGF-1 (insulin-like growth factor 1) está altamente activa en células de melanoma metastásico mediante la activación aguas abajo de las vías PI3K-AKT y MAPK y controlando la supervivencia y proliferación general de la célula [6]. Se ha demostrado que el IGF-1R activo puede estar expresado en todos los subtipos de cáncer de mama. La presencia de altos niveles de IGF-1R fosforilado en pacientes de cáncer de mama está relacionado con una supervivencia menor [7]. La sobreexpresión de IGF-1R se ha asociado con un mayor grado del tumor, efecto antiapoptótico, tasa de proliferación, y angiogénesis en pacientes de adenocarcinoma ductal pancreático [8]; y con una menor supervivencia desde el inicio de la quimioterapia de primera línea en pacientes de cáncer colorrectal [9]. Además, se sabe que el IGF-1R juega un papel fundamental en la transformación, el crecimiento y supervivencia de células de glioblastoma multiforme (GBM) [10].

Actualmente se están desarrollando estrategias anti-IGF-1R con el fin de explotar IGF1R como diana terapéutica clínicamente relevante [3]. Existen más de 10 inhibidores de IGF/IGF-1R en ensayos clínicos, estos pertenecen a tres clases principales: anticuerpos monoclonales contra IGF-1R, anticuerpos monoclonales contra los ligandos de IGF-1R (IGF-1 e IGF-2) e inhibidores de la tirosin quinasa del IGF-1R [11].

Ninguno de los anticuerpos monoclonales que se unen al IGF-1R se unen al receptor de insulina. Debido a que IGF-1R es una tirosin quinasa, se han desarrollado también moléculas pequeñas inhibitoras para interrumpir esta actividad bioquímica. A diferencia de los anticuerpos monoclonales, las moléculas pequeñas inhibitoras no son específicas de IGF-1R, sino que también presentan actividad contra el receptor de insulina [4].

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El receptor del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1 (IGF-1R) y sus moléculas de señalización aguas abajo han sido cada vez más reconocidos por tener un papel importante en el desarrollo y supervivencia tumoral, y consecuentemente IGF-1R ha llegado a ser una diana potencial en la terapia contra el cáncer. Muchos inhibidores de IGF-1R están en desarrollo clínico para el tratamiento de tumores sólidos. Estos agentes cuya diana es el IGF-1R incluyen anticuerpos monoclonales como cixutumumab (IMC-A12), AMG-479, AVE1642, BIIB022, dalotuzumab (MK-0646), y robatumumab (Sch717454), el anticuerpo neutralizante del ligando Medi-573, y las moléculas pequeñas inhibitoras BMS-754807, linsitinib (OSI-906), XL228, y AXL1717 [12].

OSI-906 es un inhibidor selectivo de IGF-1R con una  $IC_{50}$  de 35 nM en ensayos celulares y es modestamente potente contra el receptor de insulina con una  $IC_{50}$  de 75 nM. No presenta actividad hacia Abl, ALK, BTK, EGFR, FGFR1/2, PKA, etc [13].

OSI-906 inhibe la proliferación de carcinoma hepatocelular (CHC) en al menos un 40%. Las células de CHC sensibles a OSI-906 muestran un nivel de fosforilación de IGF-1R e IR mayor que en las resistentes, lo que sugiere que la sensibilidad a OSI-906 está asociada con la activación de estos receptores [14].

La apoptosis y la inhibición de la proliferación celular debido al tratamiento con OSI-906 parecen estar directamente vinculadas a la inhibición de Akt en varias líneas celulares tumorales incluyendo líneas celulares de pulmón, páncreas y colorrectal. Tratamientos de xenoinjertos con OSI-906 muestran una disminución en el crecimiento del tumor y un aumento de la apoptosis *in vivo* e *in vitro*, estadísticamente significativa, observándose fragmentación del ADN. OSI-906 disminuye la proliferación celular alterando la fase  $G_0/G_1$  y mostrando una disminución en el contenido de ADN 4n [15].

BMS-754807 es un potente y reversible inhibidor de IGF-1R y del receptor de insulina con un  $IC_{50}$  de 1,8 nM y 1,7 nM, respectivamente en ensayos celulares, es menos potente contra Met, Aurora A/B, TrKA/B y Ron, y muestra pequeña actividad sobre Flt3, Lck, MK2, PKA, PKC, etc [16].

BMS-754807 inhibe eficazmente el crecimiento de una amplia gama de tipos de tumores humanos *in vitro*, incluyendo líneas de células tumorales mesenquimales (de Ewing, rhabdomyosarcoma, neuroblastoma, y liposarcoma), epitelial (mama, pulmón, páncreas, colon, gástrico), y hematopoyético (mieloma múltiple y leucemia). Se ha demostrado que este compuesto causa apoptosis en una línea celular de rhabdomyosarcoma humano y, además, un aumento de poli ADP ribosa polimerasa y de la caspasa 3 [17].

Este estudio se centra en la determinación del mecanismo molecular por el cual dos moléculas pequeñas inhibitoras de IGF-1R, OSI-906 y BMS-754807, presentan actividad antiproliferativa en cáncer:

- **OBJETIVO 1:** demostrar la inhibición de la fosforilación del receptor de IGF-1 mediada por OSI-906 y BMS-754807.
- **OBJETIVO 2:** demostrar la actividad antiproliferativa de los inhibidores de IGF-1R estudiados.

- **OBJETIVO 3:** determinar el mecanismo de acción molecular por el cual detienen la proliferación celular en cáncer.

Tras observar que ambos inhibidores presentan un mecanismo molecular de acción muy diferente, nos proponemos identificar los posibles blancos secundarios del inhibidor BMS-754807 y evaluar estos blancos secundarios como posibles nuevas dianas terapéuticas antitumorales.

Por tanto, los dos nuevos objetivos que surgieron durante el estudio son los siguientes:

- **OBJETIVO 4:** determinar las diferencias en el mecanismo de acción molecular de ambos compuestos.
- **OBJETIVO 5:** determinar los blancos alternativos del inhibidor de IGF-1R BMS-754807.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### CULTIVO CELULAR

En este estudio se utilizaron diferentes líneas celulares procedentes de distintos tipos de tumores. Hemos utilizado las líneas celulares de carcinoma humano de páncreas M220 (IMIM-PC-2), HS766T, RWP1 y M186 (IMIM-PC-1); las líneas de carcinoma humano de colon SW620, DLD1 y HCT-15 y la línea celular de glioblastoma multiforme humano T98, además de los cultivos primarios de glioblastoma HGUE-GB-16, HGUE-GB-17, HGUE-GB-18, HGUE-GB-23, HGUE-GB-24, HGUE-GB-25, HGUE-GB-26 y HGUE-GB-27 procedentes de pacientes afectados con este tipo de tumor.

Los cultivos primarios fueron obtenidos en el Hospital General Universitario de Elche (HGUE), las líneas de glioblastoma fueron cedidas por la Doctora Isabel Martínez-Lacaci (Unidad AECC (Asociación Española de la Lucha contra el Cáncer) de Investigación Traslacional en Cáncer, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca) y el resto de líneas celulares fueron proporcionadas generosamente por el Instituto Municipal de Investigaciones Médicas (IMIM) de Barcelona.

Las líneas celulares se incubaron a 37°C y al 5% de CO<sub>2</sub>, empleando el medio de cultivo DMEM 1x (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco Life Technologies) + GlutaMAX™ complementado con 4,5 g/LD-Glucosa y piruvato al que se le añade un 10% de suero fetal bovino (FBS: fetal bovine serum) y 1% de Penicilina/Estreptomina (PS). Los cultivos primarios se incubaron en las mismas condiciones, pero en este caso, el medio utilizado fue DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12)

### TRATAMIENTOS

Se han utilizado los inhibidores del IGF-1R OSI-906 (Catalog Number: CT-O906) y BMS-754807 (Catalog Number: CT-BMS75) ambos de la casa comercial ChemieTek (Indianapolis, USA). Las concentraciones utilizadas de estos inhibidores en los ensayos están en un rango de 1-10 µM.

### ENSAYO MTT

Con el objetivo de evaluar los efectos de los fármacos sobre la proliferación celular se realizaron ensayos colorimétricos MTT. Este ensayo está basado en el uso del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT), una sal de tetrazolio de color amarillo, que es reducido por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (sales de formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

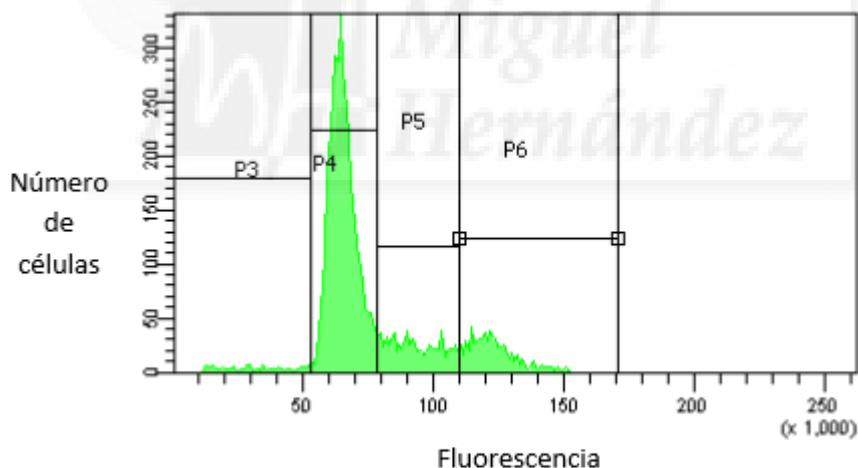
En estos experimentos las células se siembran en placas de 96 pocillos a una proporción de 4000 células/100 µl de medio de cultivo y se tratan 24 horas después. Los tratamientos se realizaron por sextuplicado, incubándose tres días con el tratamiento correspondiente. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, se les añade el reactivo MTT (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 horas. A continuación, se elimina el

líquido de los pocillos y se les añade 200  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver los cristales de formazán. Para ello, las placas deben estar en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se mide la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas modelo Anthos 2001.

## CICLO CELULAR

La distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular se determinó mediante citometría de flujo. Esta técnica se basa en el marcaje con yoduro de propidio, un agente intercalante que nos permite cuantificar la cantidad de ADN celular.

El yoduro de propidio se excita con longitudes de onda de 480nm y emite fluorescencia roja a 620nm, aproximadamente. Se intercala en los ácidos nucleicos de las células, de forma que estas emiten mayor o menor fluorescencia en función de su contenido de ADN. Las células que se encuentran en las fases G<sub>2</sub> y M del ciclo celular y que, por tanto, han superado la fase de síntesis y han duplicado su material genético (dotación cromosómica tetraploide (4n)), dan lugar a una señal de fluorescencia cuya intensidad duplica a la de las células que se encuentran en la fase G<sub>1</sub> y tienen dotación cromosómica diploide (2n). La señal fluorescente que emiten las células que se encuentran en la fase S o de síntesis se encuentra comprendida entre la que emiten las células de las fases G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>/M. Por su parte, las células muertas presentan el ADN fragmentado y emiten fluorescencia de menor intensidad que las que tienen el ADN íntegro (fase subG<sub>1</sub>).



**FIGURA 4: Perfil de ciclo celular obtenido mediante citometría de flujo a partir del marcaje del ADN con yoduro de propidio. Cada uno de los sectores P representa una fase del ciclo celular, quedando de la siguiente manera, P3: fase subG<sub>1</sub>; P4: fase G<sub>1</sub> (2n); P5: fase S; P6: G<sub>2</sub>/M (4n).**

Tras 24 horas de tratamiento con OSI-906 y BMS-754807, las células se despegan de su superficie de cultivo mediante tripsinización, se lavan con tampón PBS y se fijan en Etanol al 70% durante al menos una hora a -20°C. A continuación, se centrifugan y se resuspenden en 500  $\mu$ l de una solución que contiene PBS-Tritón al 0,5% (para permeabilizar la membrana plasmática), 2,5 mg/ml de RNasa y 2,5 g/ml de yoduro de propidio y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

La distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular se determinó mediante citometría de flujo en un citómetro Beckman, Coulter EPICS XL y BD FACSCanto II, equipado con un láser de argón que excita a 388 nm.

## DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA MEDIANTE HIBRIDACIÓN WESTERN

### EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Las células sembradas en frascos de 75 cm<sup>3</sup> (7,5 millones de células) se tratan durante 3 horas con los inhibidores de IGF-R1 OSI-906 o BMS (10 μM), dejando un frasco control sin tratamiento. Pasado el tiempo de incubación, las células se separan de la superficie de cultivo mediante raspado en PBS, centrifugándose durante 5 minutos a 1000 rpm.

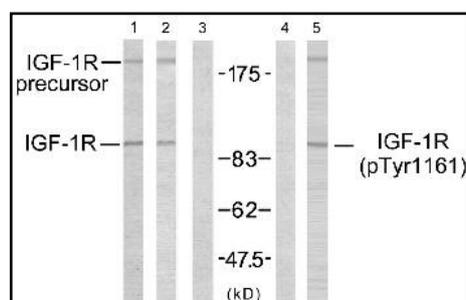
El precipitado de células se lisa en 200 μl de tampón de lisis (1% NP-40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 30 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl pH 7,4) al que se añaden 10 μl de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich). Tras una incubación de 30 minutos en hielo, el lisado se centrifuga y el precipitado se desecha.

### DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA MEDIANTE EL MÉTODO BRADFORD

El método Bradford se basa en la unión del colorante Azul de Coomassie G-250 a las proteínas. Al unirse a éstas, el colorante se desprotona y adquiere una coloración azul con un máximo de absorbancia a 595 nm. Los valores de absorbancia obtenidos en nuestras muestras, se extrapolan a los valores de una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de albúmina bovina de suero.

### ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La separación de las proteínas en función de su peso molecular (95kDa), se llevó a cabo mediante SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), empleando el sistema Mini protean 3 de BioRad.



**FIGURA 5:** Análisis de Western blot utilizando el anticuerpo (#21080, líneas 1, 2 y 3) del IGF-1R (Ab-1161) y el anticuerpo (#11087, líneas 4 y 5) del IGF-1R (phospho-Tyr1161). Imagen tomada de la página web <http://www.sabbiotech.com/>

Se prepara un gel de poliacrilamida compuesto por una parte inferior separadora (7,5% de acrilamida) y una parte superior concentradora (4% de acrilamida).

REACTIVOS	GEL SEPARADOR	GEL CONCENTRADOR
ACRIL:BIS 30%	2,5 ml	0,65 ml
H <sub>2</sub> O	4,85 ml	3,05 ml
TRIS	2,5 ml (pH 8,8)	1,25 ml (pH 6,8)
SDS 10%	50 µl	50 µl
PSA 10%	100 µl	35 µl
TEMED	7 µl	5 µl

Cuando el gel ha polimerizado, se cargan las muestras (50 µg) y se deja que corra a un voltaje de 80 V en el gel concentrador y, posteriormente el voltaje se sube a 150 V en el gel separador.

---

#### TRANSFERENCIA A MEMBRANAS DE PVDF

Las proteínas separadas en el gel, se transfieren a membranas de nitrocelulosa (BioRad), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. La transferencia se realiza a 4°C y 40V durante toda la noche.

---

#### BLOQUEO

Las uniones inespecíficas se bloquean mediante incubación de la membrana con buffer TBS (195 mM tris, 270 mM NaCl) con 0,05% de Tween 20 (TBS-Tween) y 25g de leche desnatada en polvo (para 1L de buffer de bloqueo).

---

#### INCUBACIÓN CON EL ANTICUERPO PRIMARIO

Tras el bloqueo, la membrana de nitrocelulosa se incuba con los anticuerpos primarios anti-IGF-1R(Phospho-Tyr1161) (#11087 de Signalway Antibody) en un agitador de balanceo a 4°C durante toda la noche. El anticuerpo se prepara a 1:500 en un volumen final de 10 ml de buffer TBS-Tween y 2 µl de azida sódica al 20%.

---

#### INCUBACIÓN CON EL ANTICUERPO SECUNDARIO

Tras la incubación con el anticuerpo primario se realizan tres lavados de 15, 10 y 10 minutos con buffer TBS-Tween. Posteriormente, la membrana se incuba con los anticuerpos secundarios anti-rabbit IgG (ECL™ de GE Healthcare), preparados a una dilución 1:5000 (3 µl en 15 ml TBS-Tween) durante una hora a temperatura ambiente y en agitación orbital. Tras la incubación, la membrana se lava dos veces con buffer TBS-Tween y una última vez con buffer TBS sin Tween.

## REVELADO

El revelado se realizó con el *Kit ECL Plus Western Blotting Detection System* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones de la casa comercial

## ELISA

Se utilizó el *Kit InstantOne ELISA™* (eBioscience) que utiliza el formato tradicional del sándwich ELISA. En el sándwich ELISA, primero se adhiere una cantidad conocida de anticuerpo de captura a una superficie, éste es específico para el antígeno que queremos detectar, por ello, se bloquean todos los posibles sitios de unión no específicos. A continuación, la muestra que contiene el antígeno es añadida a la placa y se realiza un lavado para eliminar todos los antígenos que no se hayan unido al anticuerpo. Seguidamente, se añade un anticuerpo específico para el antígeno y otro anticuerpo secundario ligado a una enzima que detecta la región Fc del anticuerpo unido al antígeno, y se vuelve a lavar la placa para eliminar el anticuerpo que no se haya unido. Finalmente, se añade un compuesto químico que será convertido por la enzima en una señal colorimétrica, fluorescente o electroquímica. Dicha señal es medida para determinar la presencia y cantidad de antígeno (figura 6).



**FIGURA 6: ELISA tipo sándwich Instant One™.** [www.ebioscience.com](http://www.ebioscience.com)

El ensayo de ELISA InstantOne™ presenta una diferencia con el ELISA tipo sándwich, y es que permite una mayor flexibilidad, es muy sencillo y se realiza en un tiempo reducido al permitir que el analito diana se una a los dos anticuerpos del ELISA en solución ya que el anticuerpo de captura ya viene unido a la placa. Esto permite tanto a la muestra como a los reactivos del ensayo ser añadidos a la microplaca al mismo tiempo. Los reactivos del ensayo y los componentes de la muestra no unidos son lavados igual que en ELISA sándwich, mientras el analito específico es detectado mediante un reactivo colorimétrico.

En primer lugar, hay que preparar el lisado celular, para ello, se elimina el medio de cultivo y se lavan las células con 200µl/pocillo de PBS. Una vez lavadas, se lisan con 100µl de tampón de lisis 1x y se dejan en agitación (300 rpm) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Una vez preparada la muestra, se añaden a los pocillos 50µl del control negativo, positivo o de la muestra lisada, según corresponda. Hecho esto, se añaden 50µl del cocktail de anticuerpos preparado (anticuerpo de captura y reactivos de detección) a cada pocillo, se cubre la placa con una cinta adhesiva y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador a 300rpm. Pasado este tiempo se lavan los pocillos tres veces con 200µl de tampón de lavado 1x y, tras el último lavado, hay que eliminar por completo la solución de lavado de los pocillos por inversión de la placa sobre papel de filtro. A continuación, se añaden 100µl de reactivo de detección a cada pocillo, se incuba la placa durante 10-30 minutos y se detiene la reacción añadiendo 100µl de solución de parada. Finalmente, tras una hora con la solución de parada se lee la placa midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro de placas a 450nm.

## ARRAY DE FOSFOPROTEÍNAS

Para analizar los perfiles de fosforilación de quinasas y sus sustratos proteicos se empleó el *Human Phospho-Kinase Array* (R&D Systems), que permite detectar simultáneamente los niveles relativos de fosforilación de 43 sitios de fosforilación de quinasas. Cada anticuerpo de captura ha sido cuidadosamente seleccionado utilizando lisados celulares preparados a partir de líneas celulares conocidas que expresan la proteína diana.

Los anticuerpos de captura y detección se encuentran por duplicado en membranas de nitrocelulosa. Los lisados celulares se diluyen e incuban durante la noche con el *Human Phospho-Kinase Array*. La matriz (*array*) se lava para eliminar las proteínas no unidas, seguidamente se incuba con una mezcla de anticuerpos biotinilados de detección (reconocen tirosinas fosforiladas). Se añaden estreptavidina-HRP y los reactivos de detección de la luminiscencia, lo que genera una señal en cada punto de captura que se corresponde con la cantidad de proteína unida fosforilada.

Se siguió el protocolo facilitado por la casa comercial (R&D Systems).

## ESTADÍSTICA

En aquellos experimentos donde era necesario, se determinó si los valores de las medias eran significativamente diferentes utilizando el test de la T de Student.

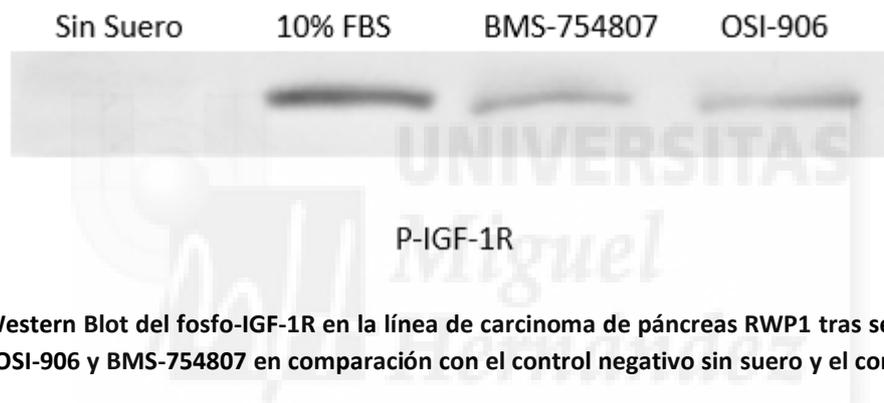
## RESULTADOS

### **OBJETIVO 1: DEMOSTRAR LA INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR DE IGF-1R MEDIADA POR OSI-906 Y BMS-754807**

En primer lugar determinamos si realmente los inhibidores de IGF-1R, OSI-906 y BMS-754807, tienen el efecto inhibitorio de la fosforilación esperado sobre su diana específica.

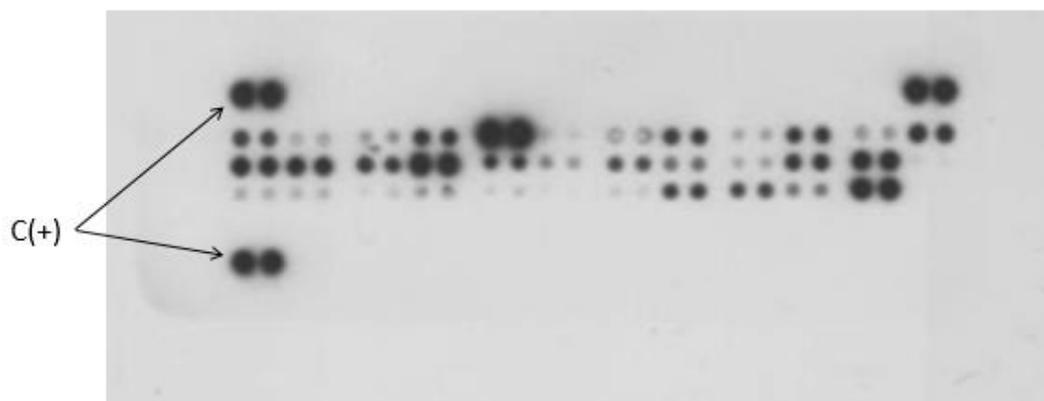
Las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas exocrino humano, HS766T y RWP1, fueron tratadas o no con los dos inhibidores. Los niveles totales de IGF-1R así como los niveles de proteína fosforilada, se determinaron mediante hibridación Western utilizando anticuerpos específicos para la proteína fosforilada y para la proteína no fosforilada.

Nuestros resultados indican que, tal y como esperábamos, ambos inhibidores inducen una disminución significativa de los niveles de fosforilación de IGF-1R.

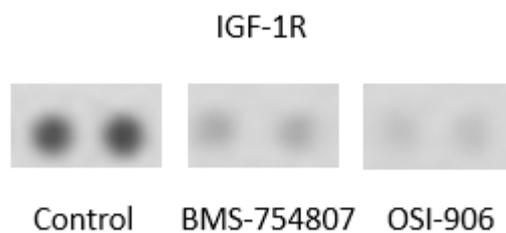


**FIGURA 7: Western Blot del fosfo-IGF-1R en la línea de carcinoma de páncreas RWP1 tras ser tratado con los inhibidores OSI-906 y BMS-754807 en comparación con el control negativo sin suero y el control positivo con suero.**

La inhibición de la fosforilación de IGF-1R se corroboró mediante un fosfoarray (figura 8) en el que se puede detectar la fosforilación de diversas proteínas quinasas y receptores quinasas. En este ensayo utilizamos las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas exocrino humano M220 y RWP1, observándose una inhibición de la fosforilación de IGF-1R en las células tratadas con OSI-906 y BMS-754807 (figura 9).

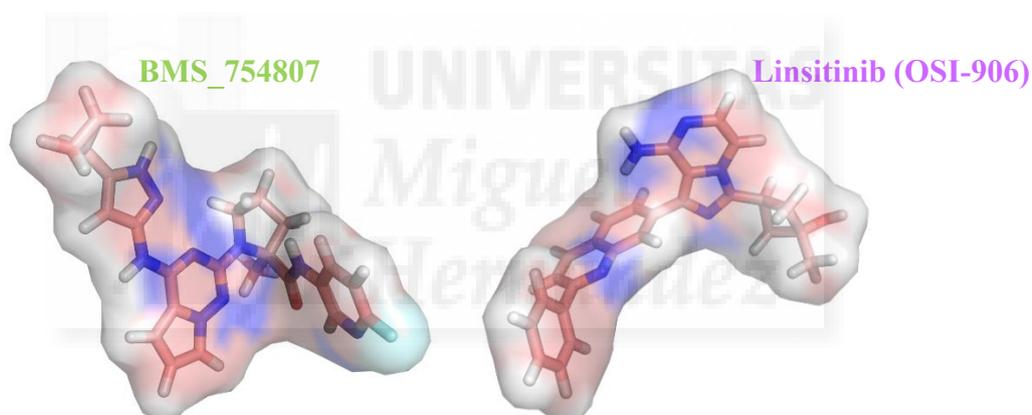


**FIGURA 8: Imagen representativa de uno de los array de fosfoproteínas realizados en este estudio.**



**FIGURA 9: Amplificación de los resultados obtenidos de un array en los que se ve los dos puntos del IGF-1R.**

Mediante técnicas de Modelado Molecular, nos planteamos determinar el sitio de unión de OSI-906 y BMS-754807 en el IGF-1R. Para este estudio contamos con la colaboración de la Unidad de Computación Estructural, en concreto con la colaboración del Dr. José Antonio Encinar Hidalgo. Obtuvimos varios sitios de unión, siendo el más probable por motivos termodinámicos el sitio de unión al ATP del IGF-1R (figura 10), al que se unen de igual manera ambos inhibidores. Por tanto, ambos actúan sobre el mismo receptor y en el mismo sitio de acción.



**FIGURA 10A: Estructura molecular de los inhibidores de IGF-1R OSI-906 o Linsitinib y BMS-754807.**

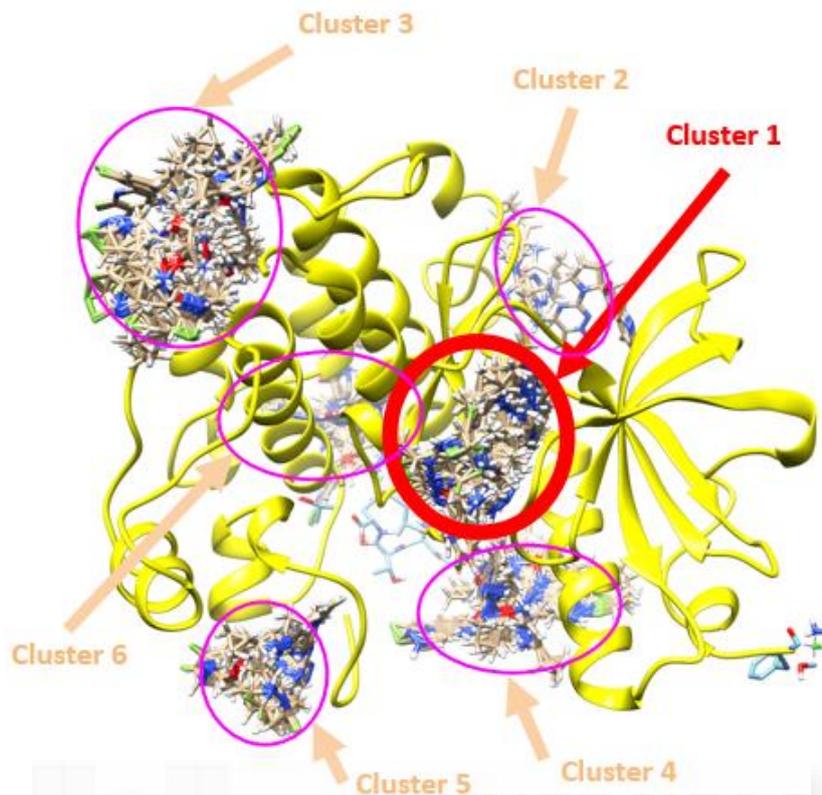


FIGURA 10B: Sitio de unión del BMS-754807 al IGF-1R.

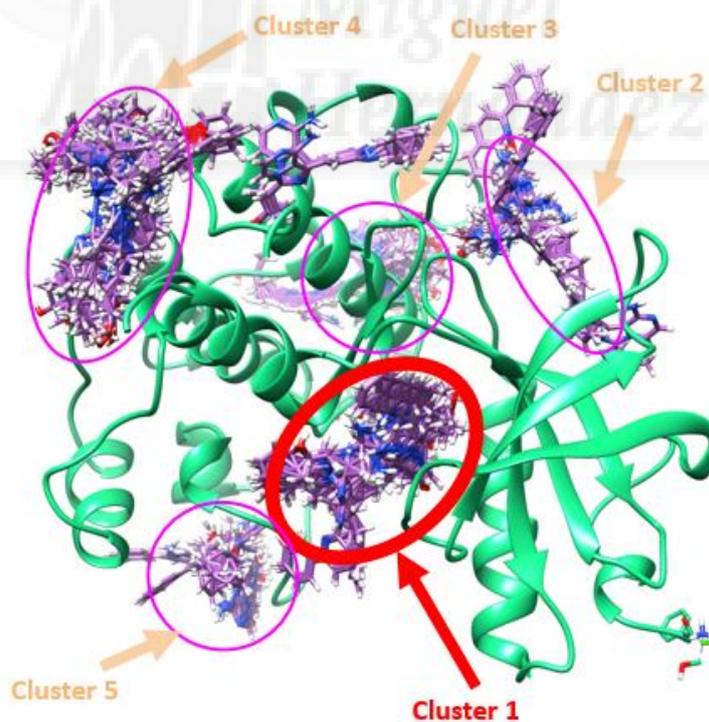


FIGURA 10C: Sitio de unión del OSI-906 al IGF-1R.

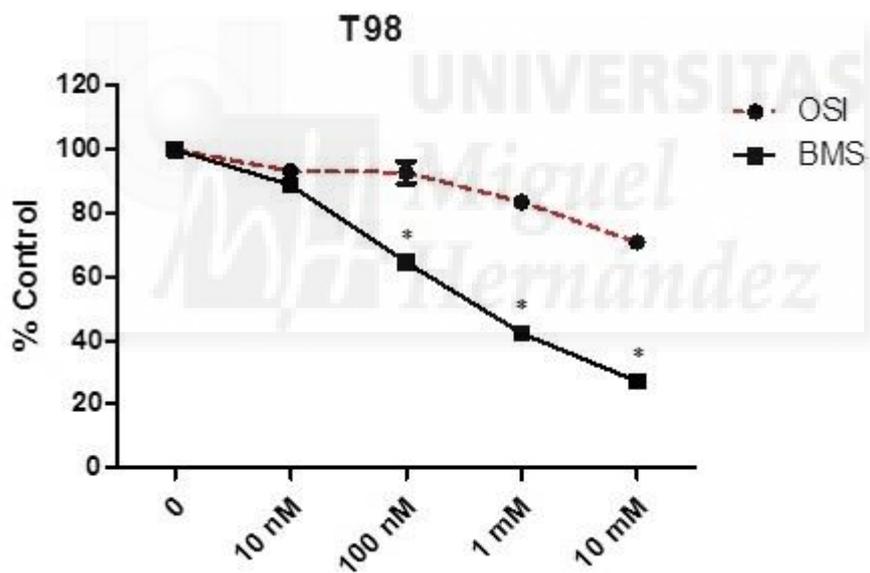
FIGURA 10: Imagen de las estructuras moleculares de los inhibidores de IGF-1R, OSI-906 y BMS-754807 y de los sitios de unión de OSI-906 (FIGURA 10B) y BMS-754807 (FIGURA 10C) al IGF-1R.

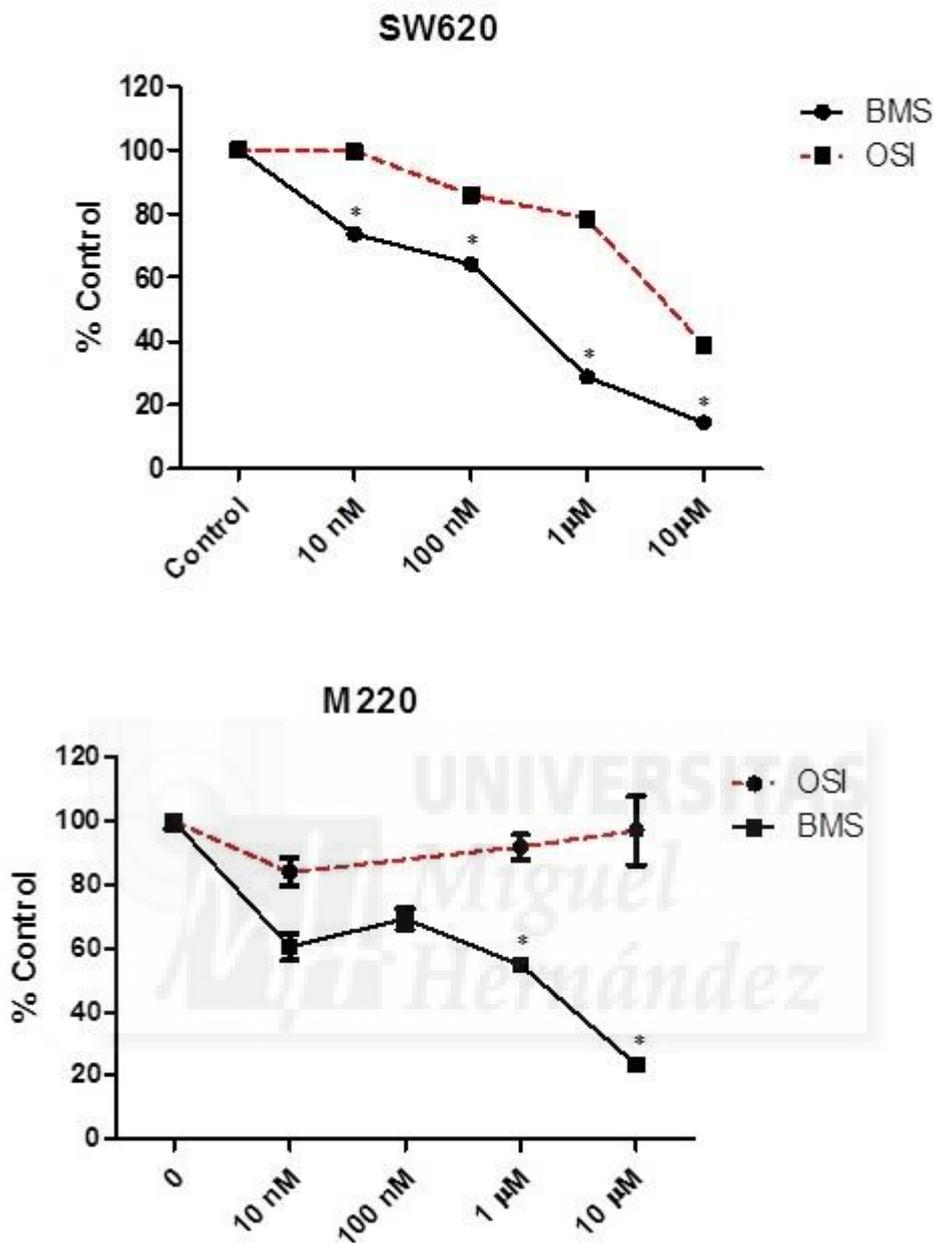
## OBJETIVO 2: DEMOSTRAR LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LOS INHIBIDORES DE IGF-1R ESTUDIADOS

Una vez demostrado que OSI-906 y BMS-754807, inhiben la fosforilación del IGF-1R, queríamos saber si estos inhibidores tienen un efecto antiproliferativo en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer.

El efecto sobre la proliferación celular se determinó mediante ensayos de MTT en placas de 96 pocillos. Los tratamientos se realizaron a diferentes concentraciones para determinar si el posible efecto antiproliferativo era dosis-dependiente.

En las líneas celulares HS766T, RWP1 y T98, se observó una disminución en la proliferación de un 30-40% respecto al control en los tratamientos con OSI-906 y del 60-80% en los tratamientos con BMS-754807. Además, se observa un efecto antiproliferativo mayor en la línea celular de carcinoma de colon (SW620), disminuyendo la proliferación un 60% respecto al control cuando se trata con OSI-906 y un 80% cuando se trata con BMS-754807. La línea celular M220 y los cultivos primarios de glioblastoma (HGUE-GB-15, HGUE-GB-16, HGUE-GB-17) mostraron resistencia a OSI-906 pero fueron sensibles a BMS-754807.





**FIGURA 11:** Ensayos MTT representativos de los resultados en distintas líneas celulares. La línea celular de glioblastoma multiforme T98 y la línea celular de carcinoma de páncreas SW620 muestran sensibilidad a ambos inhibidores de IGF-1R mostrando efectos antiproliferativos diferenciales (OSI-906 disminuye la proliferación en un 30% y 60%, respectivamente y BMS-754807 disminuye la proliferación en un 80% en ambas, ambos tratamientos con respecto al control). La línea M220 muestra resistencia a OSI-906 y sensibilidad a BMS-754807 con efectos antiproliferativos del 80%. Los datos representados son la media  $\pm$  SD,  $n \geq 6$ , \*  $p < 0.05$

Los resultados obtenidos muestran un efecto antiproliferativo de los dos inhibidores en la mayoría de las líneas celulares analizadas. En general, BMS-754807 muestra una actividad antiproliferativa mayor que OSI-906, sugiriendo la existencia de distintos mecanismos moleculares asociados a la capacidad antiproliferativa de ambos inhibidores.

**OBJETIVO 3: DETERMINAR EL MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR POR EL CUAL DETIENEN LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CÁNCER**

Con el fin de determinar cuál es el mecanismo molecular asociado a la actividad antiproliferativa de OSI-906 y de BMS-754807, analizamos la distribución de las distintas fases del ciclo celular en diversas líneas celulares tratadas o no con dichos inhibidores.

Nuestros resultados muestran diferencias en la distribución de las distintas fases del ciclo celular en líneas celulares tratadas bien con OSI-906 bien con BMS-754807. El tratamiento con OSI-906 induce un bloqueo de las células en la fase G<sub>1</sub> del ciclo, mientras que el tratamiento con BMS-754807, induce un bloqueo en la fase G<sub>2</sub>/M del ciclo, observándose también un aumento de la muerte celular (figura 12).

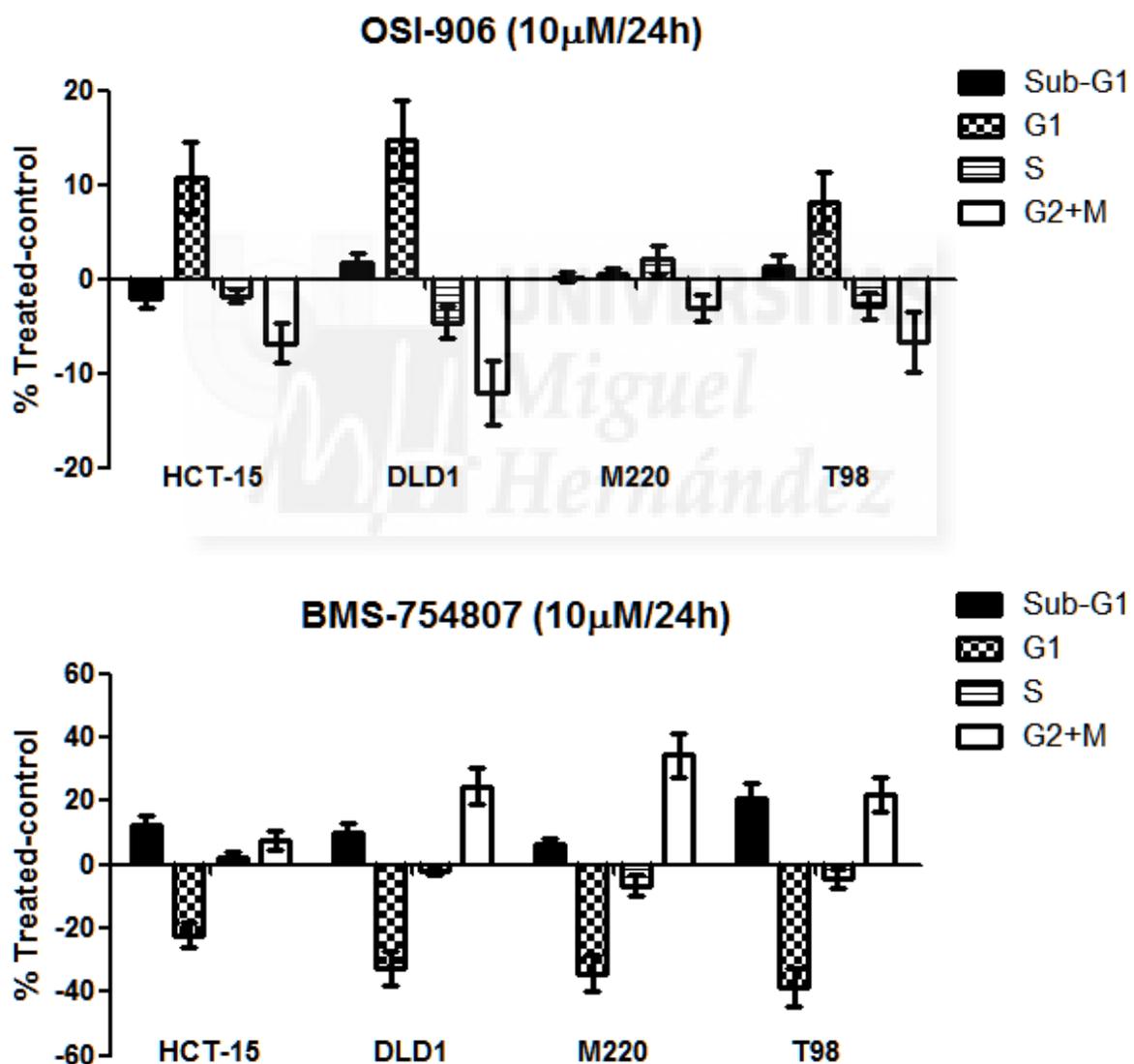
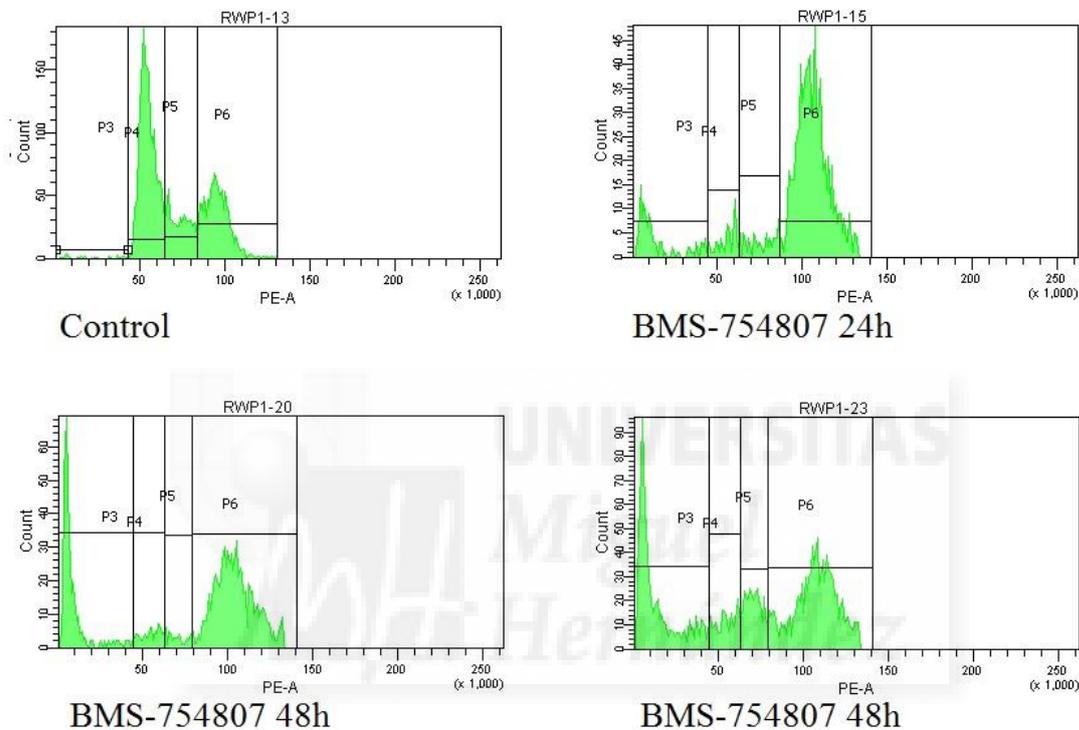


FIGURA 12: Las imágenes representan el porcentaje de células tratadas con OSI-906 y con BMS-754807, ambos a una concentración de 10  $\mu$ M, en cada fase después de restar el porcentaje de células en esa fase en el control

no tratado. Se muestran líneas de carcinoma de colon (HCT-15 y DLD-1), de carcinoma de páncreas (M220) y de glioblastoma multiforme (T98). Los datos representados son la media  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ .

Para conocer más a fondo el mecanismo de acción molecular de BMS-754807, realizamos experimentos a diferentes tiempos (24h, 48h y 72h) para seguir el curso temporal de los efectos observados. El estudio de la distribución de las células en el ciclo celular muestra, como podemos observar en la figura 13, que las células se acumulan inicialmente en la fase G<sub>2</sub>/M, esta acumulación es seguida por un incremento de las células en la fase sub-G<sub>1</sub>, indicativa de muerte celular.



**FIGURA 13: Experimento representativo de la distribución de las fases del ciclo celular en una muestra control y en tres muestras tratadas con BMS-754807 a 24h, 48h, y 72h.**

Con el fin de caracterizar la vía de señalización implicada en la inducción de muerte celular mediada por BMS-754807, analizamos la distribución de las distintas fases del ciclo celular en células tratadas simultáneamente con este inhibidor en presencia o ausencia de un inhibidor general de las caspasas (ICn) (enzimas implicadas en la inducción de apoptosis), cloroquina (CQ) (inhibidor de los procesos autofágicos), o necrostatina (implicada en la inducción de necroptosis). Los resultados muestran que la combinación de BMS-754807 con el inhibidor de caspasas, es capaz de inhibir la muerte celular inducida por BMS-754807, sugiriendo que la muerte celular observada en presencia de BMS-754807 es una muerte apoptótica, como se observa en la figura 14, donde podemos observar que, al añadir BMS-754807 con el inhibidor de caspasas, se inhibe el efecto de muerte producido por el inhibidor de IGF-1R. Por tanto, podemos concluir que BMS-754807 activa la vía de las caspasas, produciendo la apoptosis en las células. Tras este resultado, quisimos comprobar si la inducción de muerte

celular por BMS-754807 en otros modelos celulares era también inhibida por el inhibidor de caspasas. Nuestros resultados mostrados en las figuras 15 y 16, corroboran que la muerte inducida por BMS-754807 es bloqueada por ICn en todos los modelos estudiados.

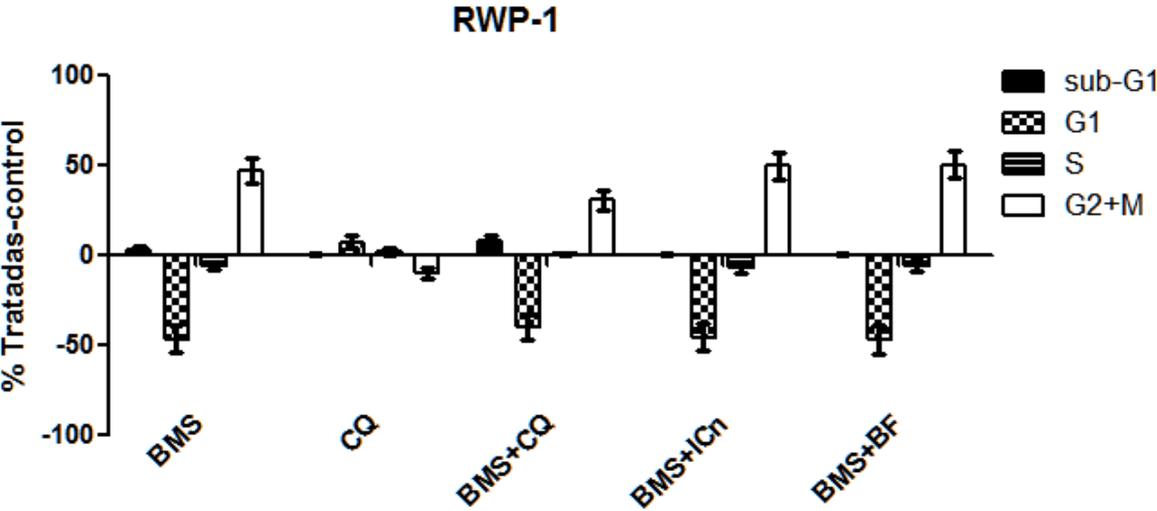


FIGURA 14: Imagen representativa de la distribución de las células en las fases celulares cuando se realiza un tratamiento con BMS-754807 en comparación con un tratamiento en el que se combina BMS-754807 10  $\mu$ M con inhibidores de cloroquina, de caspasas y necrostatina. Los datos representados son la media  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ .

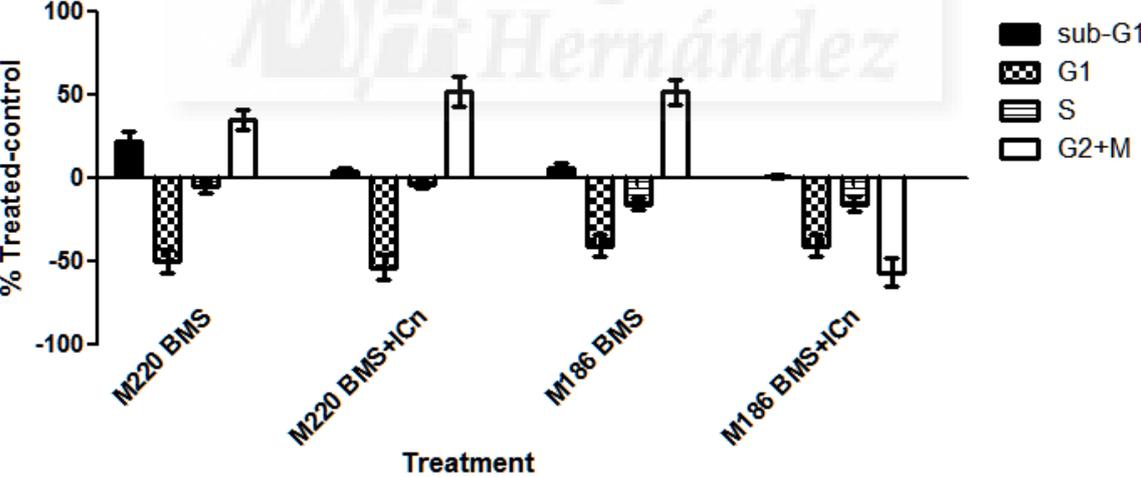
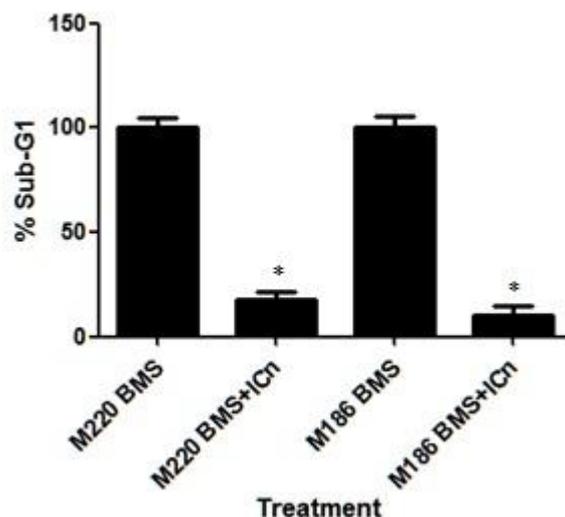


FIGURA 15: Imagen representativa de la distribución de las células en las fases celulares cuando se trata con una combinación de BMS-754807 10  $\mu$ M con inhibidor de caspasas general. Los datos representados son la media  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ .



**FIGURA 16:** Imagen representativa del porcentaje de las células en la fase subG1, siendo el 100% la muerte producida por el tratamiento con BMS-754807 y, con respecto a esta, el porcentaje de células en la fase subG1 cuando han sido tratadas con BMS-754807 10  $\mu$ M en combinación con inhibidor de caspasas general. Los datos representados son la media  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ , \*  $p < 0.05$

**OBJETIVO 4:** DETERMINAR LAS DIFERENCIAS EN EL MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR DE AMBAS MOLÉCULAS POR EL CUAL TIENEN EFECTOS ANTIPROLIFERATIVOS

Con el fin de caracterizar de modo más preciso el mecanismo molecular de acción de ambos inhibidores, hicimos estudios combinando ambos inhibidores, analizando si existe algún tipo de potenciación entre ellos. Analizamos la distribución de las distintas fases del ciclo celular en células tratadas con una concentración constante de uno de los inhibidores y con concentraciones crecientes del otro inhibidor.

Los resultados de citometría de flujo muestran que, cuando mantenemos la concentración de BMS-754807 constante (1  $\mu$ M) y añadimos concentraciones ascendentes de OSI-906 (1  $\mu$ M, 2'5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) (Figura 17A), se observa siempre el mismo efecto, correspondiente con el efecto de BMS-754807 a dicha concentración. Cuando mantenemos constante la concentración de OSI-906 (1  $\mu$ M) y añadimos concentraciones ascendentes de BMS-754807 (1  $\mu$ M, 2'5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) (Figura 17B), observamos un bloqueo en G<sub>2</sub>/M que va disminuyendo mientras aumenta la muerte celular, lo que indica que se está produciendo el efecto propio del BMS-754807 al ir aumentando la concentración. Nuestros datos sugieren que BMS-754807 tiene probablemente otras dianas moleculares independientes de su efecto sobre el IGF-1R responsables del efecto diferencial con OSI-906.

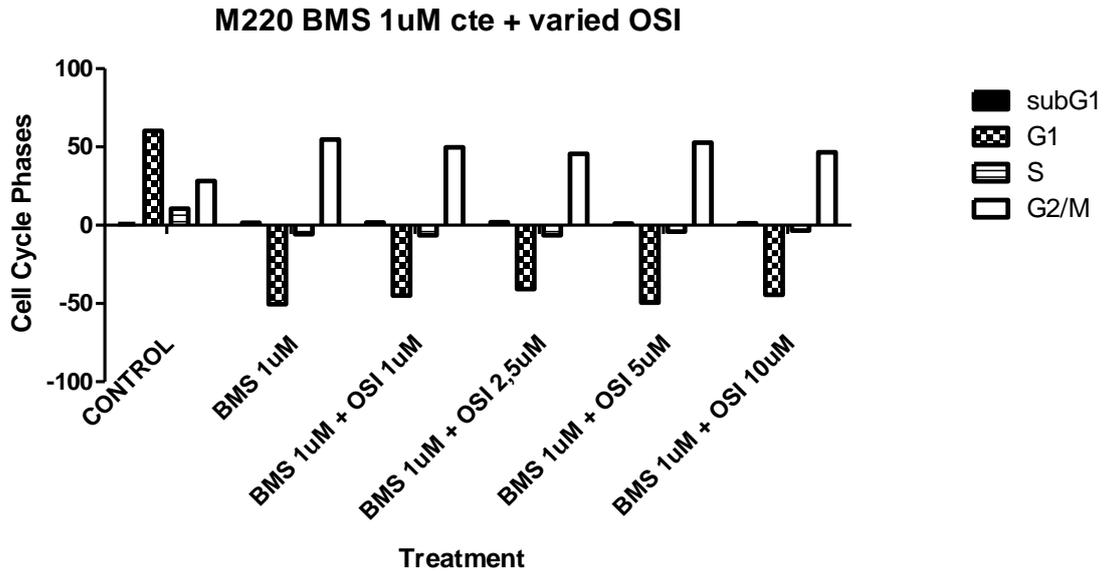


FIGURA 17A

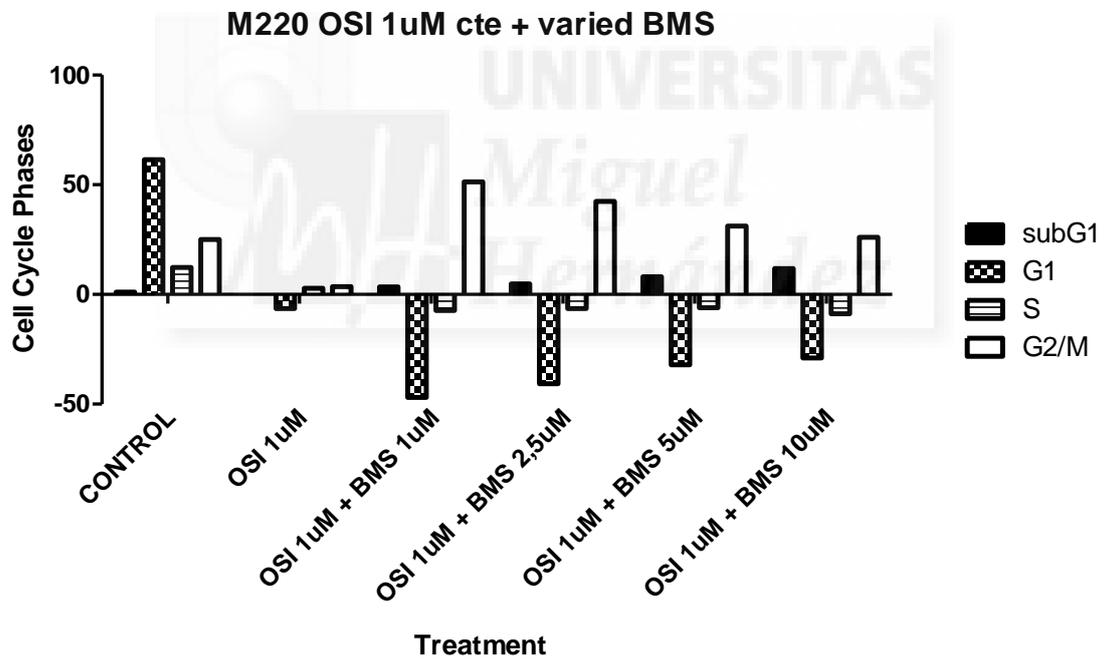
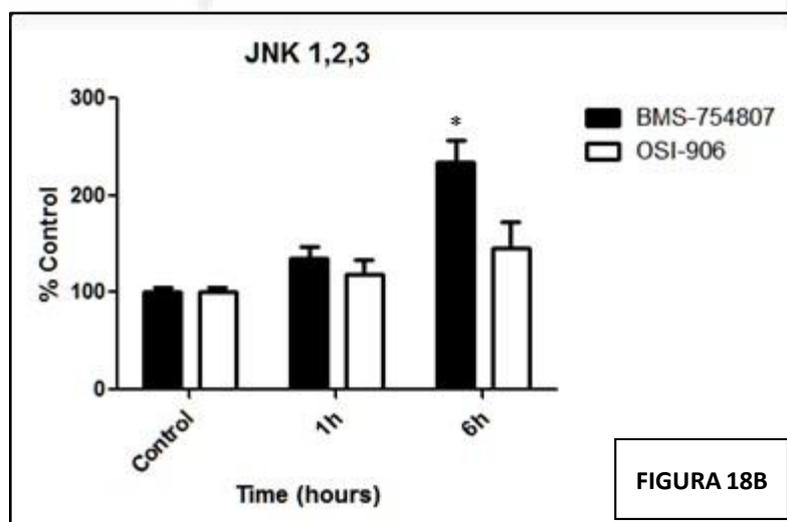
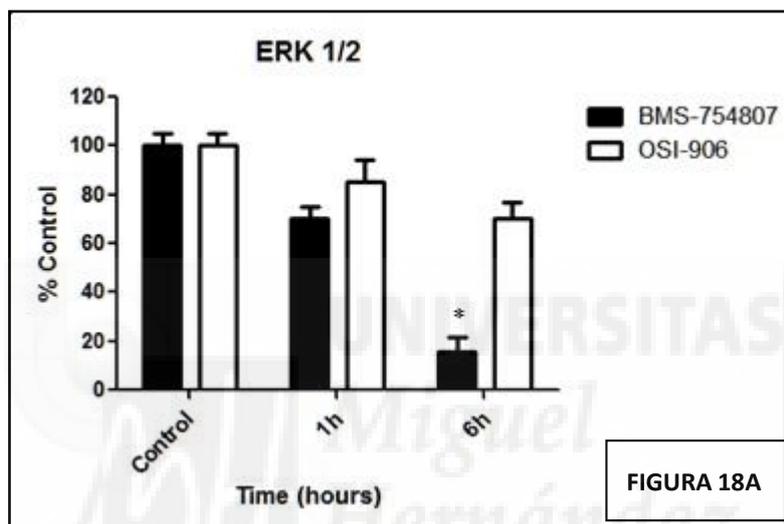
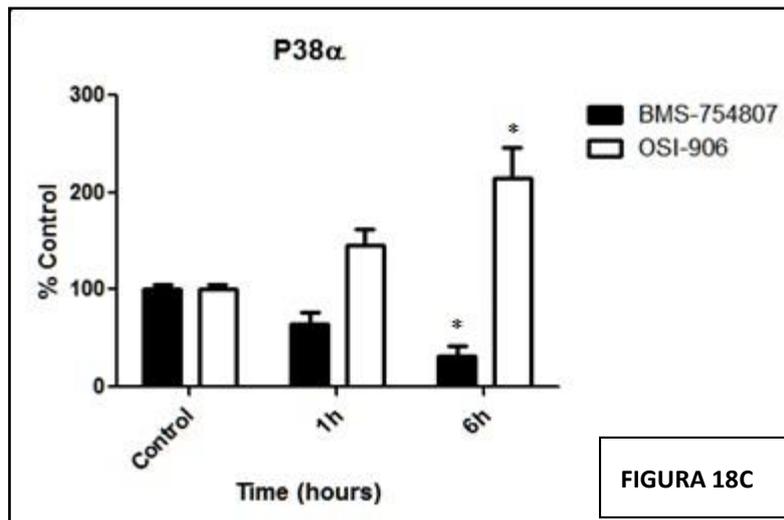


FIGURA 17B

Figura 17: Distribución de las fases del ciclo celular de la muestra control y la distribución de las muestras tratadas con respecto al control. En la FIGURA 17A se realizó un tratamiento con una concentración de BMS-754807 (1  $\mu$ M) constante y concentraciones ascendentes de OSI-906 (1  $\mu$ M, 2'5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M). En la FIGURA 17B se realizó un tratamiento con una concentración de OSI-906 (1  $\mu$ M) constante y concentraciones ascendentes de BMS-754807 (1  $\mu$ M, 2'5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M).

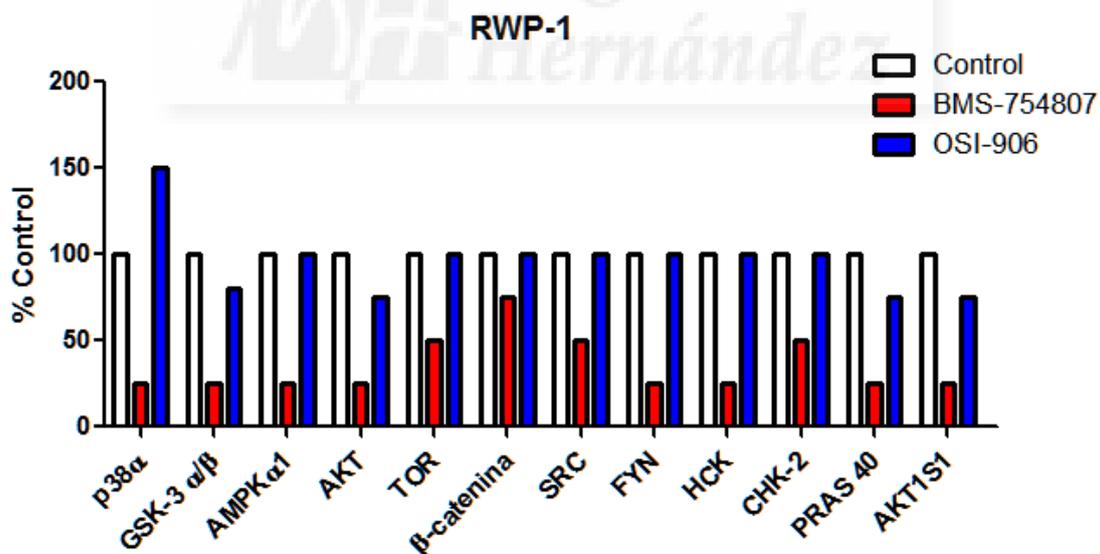
Tras los resultados previos, en los que se observa un bloqueo en la fase celular G<sub>1</sub> por parte de OSI-906 y un bloqueo en G<sub>2</sub>/M y posterior muerte celular por apoptosis causada por el tratamiento con BMS-754807, quisimos conocer qué vías de señalización se veían afectadas para producir estos efectos diferentes entre ambos inhibidores. Para ello, realizamos ensayos ELISA para determinar la actividad de las vías de las MAPK en presencia y ausencia de ambos inhibidores. Nuestros resultados mostrados en la figura 18, muestran que ambos inhibidores son capaces de inhibir la vía de las ERK quininas, aunque la inhibición mediada por BMS-754807 fue significativamente mayor que la inhibición mediada por OSI-906. En cuanto a la vía de las JNK quininas era activada significativamente por BMS-754807 y moderadamente activada por OSI-906. Los efectos más diferentes se observaron en la vía de la P38-MAPK, en la que OSI-906 activa la vía en tanto que BMS-754807 la inhibe significativamente.





**FIGURA 18:** Determinación de los niveles de proteína ERK (FIGURA 18A), JNK (FIGURA 18B) y p38α (FIGURA 18C) habiendo sido tratadas con OSI-906 y BMS-754807 independientemente. Los datos representados son la media ± SD, n ≥ 3, \* p<0.05

A continuación, realizamos un fosfoarray de quinasas y de receptores quinasas en las líneas celulares M220 (resistente a OSI-906 y sensible a BMS-754807) y RWP1 (sensible a ambos inhibidores) con el fin de determinar las diferencias a nivel molecular producidas por ambos inhibidores. Esta aproximación experimental nos permitirá identificar vías de señalización afectadas por el inhibidor BMS-754807.



**FIGURA 19:** Resultados del fosfoarray. Se representa el efecto diferencial del tratamiento con OSI-906 o BMS-754807 sobre ciertas quinasas respecto a la fosforilación control, considerada como el 100%.

Los resultados indican una inhibición diferencial de ambos inhibidores sobre diferentes quinasas. La figura 19 muestra una representación de estas diferencias en algunas quinasas importantes para la proliferación y la supervivencia celular.

En primer lugar, BMS-754807 inhibe la fosforilación de AMPK $\alpha$ 1, TOR,  $\beta$ -catenina, SRC, FYN, HCK y CHK-2 mientras que OSI-906 no les afecta. Por otro lado, OSI-906 y BMS-754807 inhiben la fosforilación de GSK-3  $\alpha/\beta$ , AKT, PRAS40 y AKT1S1 pero con un mayor efecto inhibitorio por parte de BMS-754807. Finalmente, el mayor efecto diferencial es sobre p38 $\alpha$ , coincidiendo con los datos del ensayo ELISA (figura 18C), cuya fosforilación es sobreactivada por OSI-906 e inhibida por BMS-754807.

**OBJETIVO 5: DETERMINAR LOS BLANCOS ALTERNATIVOS DEL INHIBIDOR DE IGF-1R BMS-754807**

En el último objetivo, utilizando los mismos fosfoarrays de quinasas y de receptores quinasas utilizadas en el objetivo anterior (figura 19) tratamos de determinar quinasas sobre las que existiera un efecto diferencial de BMS-754807 frente a OSI-906 y que pudieran ser de hecho los blancos alternativos de BMS-754807 responsables del efecto diferencial de dicho inhibidor. Este objetivo está actualmente en curso y aún no hemos identificado dichos blancos. La estrategia a seguir una vez determinadas las posibles quinasas, sería inhibir la expresión de las mismas mediante un ARN de interferencia y determinar si dicha inhibición produce el bloqueo en G<sub>2</sub>/M y la muerte celular similares a los producidos por BMS-754807 en dichas células.



## DISCUSIÓN

Este trabajo, se ha centrado en el estudio de OSI-906 y BMS-754807, dos inhibidores de IGF-1R y, de forma más moderada, del receptor de insulina (IR) como posible terapia antitumoral mediante la inhibición del IGF-1R, el cual es sobreexpresado en células cancerosas.

Este trabajo ha demostrado que, efectivamente, estas moléculas actúan como inhibidores de IGF-1R [4, 15, 18, 19, 20, 21] tras realizar ensayos con técnicas inmunológicas, Western Blot (figura 7) y arrays de proteínas (figuras 8 y 9) y a través de estudios de Modelado Molecular (figura 10). Además, se ha podido comprobar que, efectivamente, tanto OSI-906 [18] como BMS-754807 [17, 21, 22], presentan efectos antiproliferativos en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer y cultivos primarios de tumores (figura 11). Sin embargo, en general, el tratamiento con BMS-754807 produce un mayor efecto antiproliferativo (60-80%) en las células cancerosas que el tratamiento con OSI-906 (30-40%). Además, existen líneas celulares que son resistentes a OSI-906 pero sensibles a BMS-754807, tales como la línea de carcinoma de páncreas M220 y los cultivos primarios de glioblastoma HGUE-GB-15, HGUE-GB-16 y HGUE-GB-17.

Estos hechos nos hacen pensar que BMS-754807, además de inhibir IGF-1R e IR, tiene blancos alternativos a los que inhibe y que son los causantes del efecto antiproliferativo diferencial.

Según la literatura, los tratamientos con los distintos inhibidores de IGF-1R presentan una  $IC_{50}$  diferente. OSI-906 muestra una  $IC_{50}$  de 35 nM [13] mientras que BMS-754807 tiene una  $IC_{50}$  de 1,8 nM para la inhibición del IGF-1R [16], por tanto, BMS-754807 es más potente. Debido a que ambos inhiben al IGF-1R, se podría pensar que deberían tener los mismos efectos si aumentamos la concentración del tratamiento con OSI-906. En este estudio se han realizado ensayos de distribución del ciclo celular en el que aumentamos progresivamente la dosis de tratamiento de OSI-906, sin embargo, no se llegan a observar los efectos producidos por BMS-754807, lo que indica que las diferencias en la  $IC_{50}$  no son las responsables de los efectos diferenciales entre ambos inhibidores de IGF-1R.

Tras estudiar la distribución del ciclo celular al tratar con los diferentes inhibidores se observa que el tratamiento con OSI-906 bloquea el ciclo celular en la fase  $G_1$ , (figura 12) tal y como ha sido observado anteriormente por otros autores [15] mientras que BMS-754807 bloquea en la fase  $G_2/M$  y produce un aumento en la fracción sub- $G_1$  (figura 12 y 13), fracción que se corresponde con la muerte celular, este efecto también ha sido documentado en la literatura [17]. El hecho de que ambos inhibidores actúen a través de mecanismos de acción moleculares diferentes es otra evidencia de que BMS-754807 presenta blancos alternativos que producen dichos efectos.

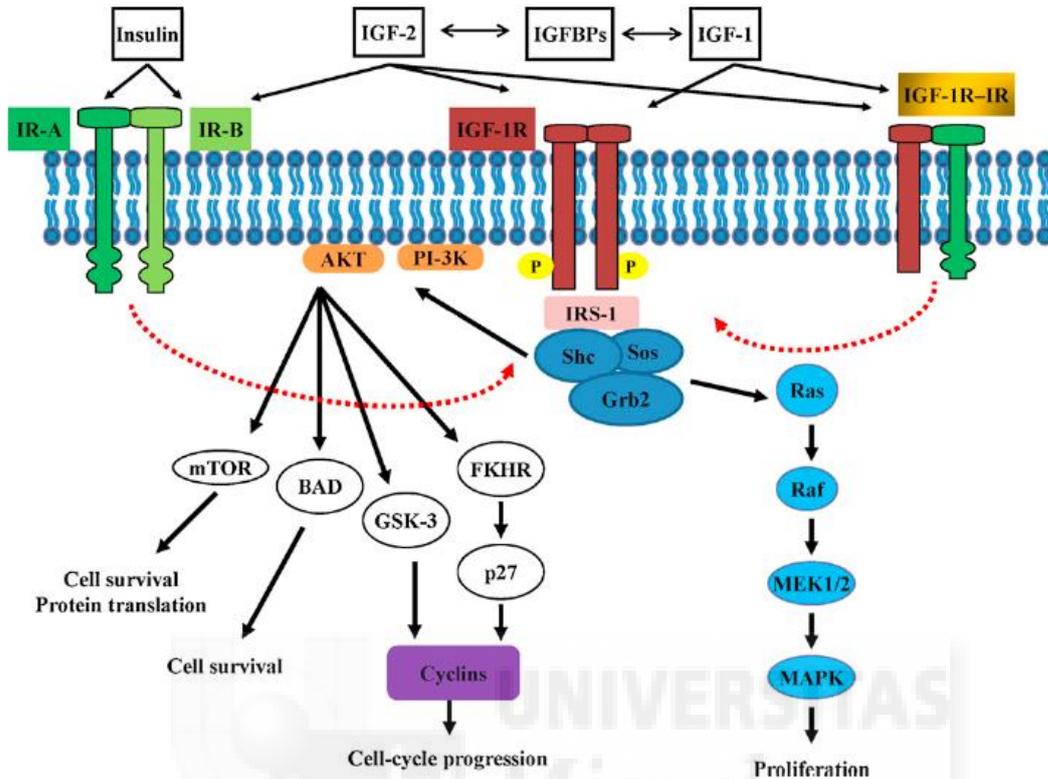
La muerte celular producida por el tratamiento con BMS-754807 responde a una muerte por apoptosis mediada por caspasas, ya que al tratar las células con inhibidor de caspasas en combinación con BMS-754807 se ha visto que se inhibe la muerte celular producida por BMS-754807 (figura 14 y 15). Sin embargo, no se observa una disminución de la muerte celular con el resto de inhibidores de otros tipos de muerte celular. Otros estudios han mostrado que se trata de una apoptosis mediada por la caspasa-3 [17, 21] y por PARP-1 [21], además de observarse un aumento de poli ADP ribosa polimerasa [17].

Para comprobar nuestra hipótesis de que BMS-754807 tiene blancos alternativos que son las responsables de su mayor efecto antiproliferativo y de su mecanismo de acción diferencial, realizamos experimentos de distribución del ciclo celular en el que tratamos las células con ambos inhibidores aumentando la concentración de uno de ellos, mientras el otro se mantenía constante (figura 17). Cuando mantenemos una concentración subóptima constante de BMS-754807 1  $\mu$ M y aumentamos progresivamente la concentración de OSI-906, se ve siempre el efecto de BMS-754807 a la concentración constante. Al mantener constante la concentración subóptima de OSI-906  $\mu$ M y aumentar progresivamente la de BMS-754807, se ve un bloqueo en G<sub>2</sub>/M que va disminuyendo mientras que la fracción sub-G<sub>1</sub> aumenta progresivamente. En el caso en el que efecto viniera mediado únicamente por la inhibición del IGF-1R e IR, al ir aumentando progresivamente la concentración de ambos inhibidores, pasando de una concentración subóptima a una óptima capaz de inhibir por completo el IGF-1R, se debería ver el mismo mecanismo de acción molecular. Sin embargo, en ambos casos, se observa el efecto producido por el tratamiento con BMS-754807 como dominante, por lo que esto es una evidencia más sólida de la presencia de blancos alternativos para BMS-754807.

Para profundizar en los mecanismos moleculares responsables de los efectos de BMS-754807, determinamos el efecto de dicho inhibidor sobre las vías de las MAPKs (figura 18). Los estudios sobre las vías de señalización de las MAPK, son necesarios ya que son unas vías cruciales en el mantenimiento de la proliferación celular y que responden a estímulos de crecimiento y estrés [23]. El hecho de que BMS-754807 disminuya la actividad de las ERK 1/2 tiene sentido puesto que estas MAPKs están implicadas en la regulación de la proliferación celular, de hecho inhibidores de las mismas se están investigando en ensayos clínicos como potentes agentes anticancerígenos [23]. Se podría pensar que el hecho de disminuir la expresión de ERK 1/2 es debido a que se encuentra aguas debajo de la vía de señalización del IGF-1R, sin embargo, la diferencia entre la inhibición por OSI-906 (40%) y BMS-754807 (80%) es significativa, por tanto, debe haber algún otro mecanismo que medie esa mayor inhibición por acción de BMS-754807. BMS-754807 también aumenta la expresión de JNK 1, 2, y 3, la cual induce mecanismos de defensa que protege el organismo frente el estrés oxidativo y los xenobióticos [24]. Además, BMS-754807 disminuye la expresión de p38, una proteína crítica para las respuestas inmunes e inflamatorias [22], por tanto, la inhibición de esta MAPK induce apoptosis y podría ser otra de las causantes del mecanismo molecular por el cual actúa BMS-754807. Los efectos de BMS-754807 sobre estas MAPKs pueden ser responsables en su conjunto del efecto antiproliferativo y la inducción de apoptosis producida.

Un análisis inicial de los resultados de los arrays (figura 19) identifica 12 proteínas diferencialmente reguladas por BMS-754807 (AMPK $\alpha$ 1, TOR,  $\beta$ -catenina, SRC, FYN, HCK y CHK-2, GSK-3  $\alpha/\beta$ , AKT, PRAS40, AKT1S1, p38 $\alpha$ ) distintas al IGF-1R e IR, lo cual ya ha sido observado en otros estudios en los que se afirma que BMS-754807 inhibe otras quinasas además de IGF-1R e IR [17, 20, 22]. Más concretamente, los estudios de Joan M. Carboni [17] y Halvorson KG [22] afirman que BMS-754807 también inhibe la fosforilación de las quinasas MET, TRKA, TRKB, AURKA y AURKB y el estudio de Helen X. Chen determinó la inhibición de la fosforilación de MET, ALK, TRKA, TRKB, AURKA, AURKB, JAK2 y CDK2 además del IGF-1R e IR. Además de las proteínas ya identificadas en este estudio, es posible que haya más proteínas que sean afectadas por BMS-754807, por lo que se tendrían que realizar más arrays de proteínas para poder determinarlas todas, de hecho otros estudios [17, 22] ya han

encontrado otras proteínas, diferentes a las de este estudio (MET, TRKA, TRKB, AURKA, AURKB, ALK, JAK2 y CDK2), que son afectadas por BMS-754807.



**FIGURA 20: Componentes y las moléculas efectoras del sistema IGF [15].**

AKT y su ligando endógeno PRAS40 regulan el metabolismo y están implicadas en la proliferación y supervivencia celular [25, 26, 27], por tanto, al ser inhibidas inducen apoptosis [28], igual que el efecto que se observa al tratar con BMS-754807. En otros estudios ya se ha observado la defosforilación de AKT mediada por OSI-906 [14, 15, 20] y por BMS-754807 [19, 21]. El estudio de Hui Zhao asegura que los efectos antiproliferativos causados por OSI-906 son mediados por la inhibición de la vía de supervivencia de la quinasa AKT [14]. Según el estudio de Niranjana Awasthi, la inhibición de la fosforilación de AKT en combinación con la activación de la caspasa-3 y PARP-1 son los cambios moleculares que parecen ser los causantes de la inhibición de la proliferación celular y la inducción de apoptosis producida por BMS-754807 [21].

GSK-3 está implicada en la homeostasis de la glucosa, efectos pro-inflamatorios y proliferación celular [29, 30, 31], por lo que su inhibición alteraría dicha homeostasis, lo cual es perjudicial para la supervivencia celular.

La fosforilación de las quinasas AKT1S1 (subunidad de mTORC1) [32] y AMPK $\alpha$ 1 [33] y algunas quinasas de la familia SRC (SRC [34, 35, 36], FYN [37] y HCK [38]) son inhibidas por BMS-754807. Estas quinasas están relacionadas con procesos de crecimiento, proliferación y supervivencia celular, por tanto, se podría pensar que, al inhibir su fosforilación, se induciría apoptosis. Además podríamos considerar que BMS-754807 es un inhibidor de las quinasas de la familia SRC.

Otras proteínas inhibidas diferencialmente por BMS-754807 son TOR,  $\beta$ -catenina y CHK. TOR está implicado en muchos procesos celulares como la síntesis de biomoléculas y, como función más interesante para este estudio, en la regulación del metabolismo, crecimiento y supervivencia celular [26, 39],  $\beta$ -catenina es una E-cadherina integral adaptadora de la adhesión célula-célula y un co-regulador transcripcional [40, 41] y CHK-2 está relacionada con la apoptosis [42]. La inhibición de estas proteínas produciría una alteración en la homeostasis celular, por lo que posiblemente se induciría la apoptosis.

Este estudio muestra que BMS-754807 inhibe la fosforilación de algunas proteínas (GSK-3  $\alpha/\beta$ , AKT, PRAS40 y AKT1S1) que también son inhibidas por OSI-906. Estas proteínas están reguladas por la vía de señalización del IGF-1R y, por tanto, podría indicar que la inhibición de su fosforilación es debido a la inhibición del IGF-1R, receptor sobre el cual ambos inhibidores tienen efecto. Sin embargo, nuestros resultados muestran que BMS-754807 inhibe con más intensidad la fosforilación de las quinasas, lo que indica que está actuando a través de vías alternativas en las que estas quinasas están involucradas. También encontramos que la fosforilación de AKT1S1 es inhibida por ambos inhibidores de IGF-1R pero esta no pertenece a la vía de señalización del IGF-1R. En este caso, la inhibición por parte de BMS-754807 sigue siendo mayor al ser tratadas con BMS-754807 que con OSI-906.

Un efecto marcadamente más diferencial es el hecho de que BMS-754807 inhiba la fosforilación de proteínas que no son afectadas por OSI-906. Estas proteínas son AMPK $\alpha$ 1, TOR,  $\beta$ -catenina, SRC, FYN, HCK y CHK-2. De entre estas, TOR se encuentra aguas abajo de la vía de señalización del IGF-1R, sin embargo, la inhibición de su fosforilación no puede deberse a la acción de la vía de señalización del IGF-1R puesto que al ser tratadas con OSI-906 no se observa tal efecto.

El efecto más destacable es el observado sobre p38 $\alpha$  puesto que su fosforilación es sobreactivada por OSI-906 pero es inhibida por BMS-754807. El efecto de que su fosforilación sea inhibida por BMS-754807 ya ha sido discutido previamente. Este hecho es remarcable porque está implicado en respuestas inmunes e inflamatorias [23] y, por tanto, podría ser responsable de que se produzca apoptosis cuando se realizan tratamientos con BMS-754807.

Para finalizar, aún debemos estudiar todas estas proteínas candidatas para poder determinar de un modo más concreto, cuáles de estas proteínas serían las causantes del mecanismo de acción molecular producido por el tratamiento con BMS-754807. En el momento en que se identifique dicha quinasa, podría pasar a ser una potente diana terapéutica para inhibidores neoplásicos a estudiar para ser usados como terapia alternativa contra el cáncer.

Respecto al inhibidor OSI-906, a pesar de ser un fármaco comercializado (linsitinib), no es un tratamiento muy eficaz tal y como muestran estudios como el nuestro y estudios en fases clínicas. Como ejemplo, un estudio en fase clínica III en pacientes con carcinoma adrenocortical avanzado o metastásico concluye que el tratamiento con Linsitinib (OSI-906) no mejora la supervivencia de los pacientes [43]. Además, otro inconveniente tanto de OSI-906 como de BMS-754807 es que inhiben al receptor de insulina y esto está relacionado con problemas

metabólicos como reducción del peso corporal, hiperglicemia e hiperinsulinemia [44]. Por estas razones, hace más interesante el hecho de que BMS-754807 actúe sobre blancos secundarios, ya que, como se ha dicho previamente, podrían convertirse en dianas terapéuticas para fármacos antitumorales con menores efectos secundarios y un potencial efecto antineoplásico.



## CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

En este estudio se ha evaluado la acción de OSI-906 y BMS-754807 sobre el IGF-1R, así como su efecto antiproliferativo en diferentes líneas celulares de cáncer y cultivos primarios, el mecanismo de acción molecular por el cual producen dicho efecto y las diferencias moleculares que hacen que el mecanismo de acción molecular sea diferencial. Finalmente, las conclusiones obtenidas son las siguientes:

1. OSI-906 y BMS-754807 son inhibidores del IGF-1R en líneas celulares de cáncer ya que inhiben la autofosforilación del receptor. El sitio más probable de unión al que se unen estos inhibidores en el IGF-1R es el sitio de unión al ATP.
2. OSI-906 y BMS-754807 presentan actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares de cáncer y cultivos primarios. Sin embargo, el tratamiento de las líneas celulares con BMS-754807 produce una mayor disminución de la proliferación celular (60-80%) comparado con el tratamiento con OSI-906 (40%), además algunas líneas celulares se muestran resistentes a OSI-906 pero todas son sensibles a BMS-754807.
3. El mecanismo molecular de acción por el cual actúan los inhibidores a estudio es diferente. OSI-906 bloquea el ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>, mientras que BMS-754807 bloquea en G<sub>2</sub>/M y, posteriormente, produce muerte celular.
4. El efecto de BMS-754807 se debe en parte a su capacidad de inhibir otras quinasas además de su efecto sobre IGF-1R.
5. La muerte celular que produce el tratamiento de líneas celulares con BMS-754807 es apoptosis, ya que puede ser inhibida por inhibidores de las caspasas.
6. Además de la vía de señalización del IGF-1R, el tratamiento con BMS-754807, y OSI-906 en menor medida, afectan a otras vías de señalización, en concreto la vía de las MAPK (ERK 1/2, JNK 1, 2 y 3 y p38 $\alpha$ ) que regulan la proliferación, la supervivencia y otras funciones vitales para las células.
7. Otros blancos afectados diferencialmente por BMS-754807 son GSK-3  $\alpha/\beta$ , AMPK $\alpha$ 1, AKT, TOR,  $\beta$ -catenina, SRC, FYN, HCK, CHK-2, PRAS40, AKT1S1.

Aunque se ha demostrado el efecto diferencial del tratamiento con BMS-754807 respecto al tratamiento con OSI-906, se necesitan más estudios moleculares para conocer las vías de transducción por las que actúa BMS-754807 y estudiar los blancos alternativos del inhibidor, ya que podrían ser una diana potencial en tratamientos contra el cáncer.

El laboratorio tiene pendiente realizar más arrays de fosfoquinasas para determinar finalmente todos los posibles blancos alternativos del inhibidor de IGF-1R, BMS-754807. Una vez detectados los posibles blancos alternativos, se realizarán estudios de inhibición de la traducción mediante ensayos de degradación del ARN mensajero utilizando ARN interferente y observar el efecto que se produce sobre la distribución de las fases del ciclo celular.

La proteína que, al no traducirse, produzca efectos similares al tratamiento de las células con BMS-754807, podría ser la proteína que, al inhibirse por BMS-754807, lleva a cabo el bloqueo de la fase celular G<sub>2</sub>/M y la

posterior muerte celular. Por tanto, sería interesante buscar inhibidores específicos para esa proteína y comprobar su efectividad como antitumoral. Además, este posible nuevo tratamiento evitaría los problemas producidos por los inhibidores de IGF-1R estudiados al inhibir la vía del receptor de insulina.



## BIBLIOGRAFÍA

1. What is cancer? (2015). *National Cancer Institute*.
2. Cancer (2015). *World Health Organization*. Fact sheet N° 297.
3. Bentov Y, Werner H (2009). IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 13(8), 559-561.
4. Douglas Yee (2012). Insulin-like Growth Factor Receptor Inhibitors: Baby or the Bathwater? *Journal of the National Cancer Institute*, 104(13), 975-81.
5. Michalis V. Karamouzis and Athanasios G. Papavassiliou (2012). Targeting insulin-like growth factor in breast cancer therapeutics. *Oncology Hematology*, 84 (1), 8–17.
6. Thomas B. Karasic, Tom K. Hei, Vladimir N. Ivanov (2010). Disruption of IGF-1R signaling increases TRAIL-induced apoptosis: A new potential therapy for the treatment of melanoma. *Experimental Cell Research*, 316(12), 1994-2007.
7. Rinat Yerushalmi, Karen A. Gelmon, Samuel Leung *et al.* (2012). Insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) in breast cancer subtypes. *Breast cancer research and treatment*, 132(1), 131-42.
8. Valsecchi ME, McDonald M, Brody JR *et al.* (2012). Epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor 1 receptor expression predict poor survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer*, 118(14), 3484-93.
9. Takahari D, Yamada Y, Okita NT *et al.* (2009). Relationships of insulin-like growth factor-1 receptor and epidermal growth factor receptor expression to clinical outcomes in patients with colorectal cancer. *Oncology*, 76(1), 42-8.
10. Lin YC, Hou SC, Hung CM (2015). Inhibition of the insulin-like growth factor 1 receptor by CHM-1 blocks proliferation of glioblastoma multiforme cells. *Chemico-biological Interactions*, 231, 119-26.
11. Helen X. Chen and Elad Sharon (2013). IGF-1R as an anti-cancer target trials and tribulations. *Chin J Cancer*; 32(5), 242-252.
12. Scagliotti, Giorgio V. *et al* (2011). The role of the insulin-like growth factor signaling pathway in non-small cell lung cancer and other solid tumors. *Cancer Treatment Reviews*, 38(4), 292-302
13. OSI-906 (Linsitinib). *Selleckchem* > Protein Tyrosine Kinase > IGF-1R Inhibitor.
14. Hui Zhao, Vidhi Desai, Jian Wang *et al.* (2011). Epithelial–Mesenchymal Transition Predicts Sensitivity to the Dual IGF-1R/IR Inhibitor OSI-906 in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *Molecular cancer therapeutics*, 11(2), 503–13.
15. Premila D. Leiphrakpam, Ekta Agarwal, Michelle Mathiesen *et al.* (2014). *In vivo* analysis of insulin-like growth factor type 1 receptor humanized monoclonal antibody MK-0646 and small molecule kinase inhibitor OSI-906 in colorectal cancer. *Oncology reports*, 31(1), 87-94.
16. BMS-754807. *Selleckchem* > Protein Tyrosine Kinase > IGF-1R Inhibitor.
17. Joan M. Carboni, Mark Wittman, Zheng Yang *et al.* (2009). BMS-754807, a small molecule inhibitor of insulin-like growth factor-1R/IR. *Molecular cancer therapeutics*, 8(12), 3341–9.

18. Premila D. Leiphrakpam, Ekta Agarwal, Michelle Mathiesen *et al.* (2014). *In vivo* analysis of insulin-like growth factor type 1 receptor humanized monoclonal antibody MK-0646 and small molecule kinase inhibitor OSI-906 in colorectal cancer. *Oncology reports*, 31(1), 87-94.
19. Xiaonan Hou, Fei Huang, Luciana F. Macedo, *et al.* (2011). Dual IGF-1R/InsR Inhibitor BMS-754807 Synergizes with Hormonal Agents in Treatment of Estrogen-Dependent Breast Cancer. *Cancer Research*, 71(24), 7597-7607.
20. Helen X. Chen and Elad Sharon (2013). IGF-1R as an anti-cancer target-trials and tribulations. *Chinese Journal of Cancer*, 32(5), 242-52.
21. Niranjana Awasthi, Changhua Zhang, Winston Ruan *et al.* (2012) BMS-754807, a Small-Molecule Inhibitor of Insulin-like Growth Factor-1 Receptor/Insulin Receptor, Enhances Gemcitabine Response in Pancreatic Cancer. *Molecular cancer therapies*, 11(12):2644-53.
22. Halvorson KG, Barton KL, Schroeder K *et al.* (2015). A high-throughput in vitro drug screen in a genetically engineered mouse model of diffuse intrinsic pontine glioma identifies bms-754807 as a promising therapeutic agent. *Public Library of Science*, 10(3).
23. Philippe P. Roux and John Blenis (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(2), 320–344
24. Zhou YY, Li Y, Jiang WQ and Zhou LF (2015). MAPK/JNK signaling: a potential autophagy regulation pathway. *Bioscience Reports*.
25. Masahito Hanada, Jianhua Feng and Brian A Hemmings (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target. *1697*(1-2):3-16.
26. Wiza C, Nascimento EB and Ouwens DM (2012). Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 302(12), E1453-60.
27. 2014. *UniProt*. P31749 - AKT1\_HUMAN.
28. Masahito Hanada, Jianhua Feng and Brian A Hemmings (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target. *1697*(1-2):3-16.
29. Richard S. Jope, Christopher J. Yuskaitis, and Eléonore Beurel (2007). Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases, and Therapeutics. *Neurochemical research*, 32(4-5), 577–595.
30. 2014. *UniProt*. P49840 - GSK3A\_HUMAN.
31. 2014. *UniProt*. P49841 - GSK3B\_HUMAN.
32. 2014. *UniProt*. Q96B36 – AKT1S1\_HUMAN.
33. 2014. *UniProt*. Q13131 - AAPK1\_HUMAN.
34. Jennifer McDowall SRC, proto-oncogene tyrosine-protein kinase. *InterPro Protein Archive*.
35. David Goodsell (2003). Src Tyrosine Kinase. *PDB-101*.
36. 2014. *UniProt*. P12931 - SRC\_HUMAN.
37. 2014. *UniProt*. P06241 - FYN\_HUMAN.
38. 2014. *UniProt*. P08631 - HCK\_HUMAN.
39. 2014. *UniProt*. P42345 - MTOR\_HUMAN.

40. Cell Signaling Technology® Home > Science > CST Pathways > Stem Cell Markers > Wnt /  $\beta$ -Catenin Signaling Pathway.
41. 2014. *UniProt*. P35222 - CTNB1\_HUMAN.
42. 2014. *UniProt*. O96017 - CHK2\_HUMAN.
43. Martin Fassnacht, MD, Alfredo Berruti, MD, Eric Baudin, MD *et al.* (2015). Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study. *The Lancet Oncology*, 16(4), 426-35.
44. Jun Shirakawa, Tomoko Okuyama, Eiko Yoshida *et al.* (2014). Effects of the Antitumor Drug OSI-906, a Dual Inhibitor of IGF-1 Receptor and Insulin Receptor, on the Glycemic Control, Cell Functions, and Cell Proliferation in Male Mice. *Endocrinology*, 155(6), 2102–2111.

