

TRABAJO FIN DE GRADO



# DESARROLLO DE PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA DIMERIZACIÓN DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA ERBB DE RECEPTORES.

Miriam Verdú Bou

Grado en Biotecnología

Universidad Miguel Hernández de Elche

Curso 2015-2016

Tutores:

Miguel Saceda Sánchez

José Antonio Encinar Hidalgo

María del Pilar García Morales

Área de Bioquímica y Biología Molecular

# ÍNDICE.

---

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	3
RESUMEN.....	4
SUMMARY.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	10
3. MATERIALES Y METODOS.....	12
3.1 Líneas celulares.....	12
3.2 Tratamientos.....	12
3.3 Ensayos de proliferación celular (MTT).....	12
3.4 Ciclo celular.....	13
3.5 ARRAY de fosfoproteínas.....	14
4. RESULTADOS.....	15
OBJETIVO 1: Generación de los péptidos inhibidores de la dimerización de los receptores ErbB.....	15
OBJETIVO 2: Determinar el efecto de los péptidos diseñados en el objetivo 1, sobre modelos celulares de carcinoma de colon y páncreas. Comparar con los efectos producidos por los inhibidores de la actividad tirosín quinasa de los receptores ErbB.....	19
OBJETIVO 3: Proceder a la caracterización inicial de la especificidad de los péptidos.....	25
5. DISCUSIÓN.....	27
6. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS.....	30
7. BIBLIOGRAFÍA.....	32

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.

---

ADN: Ácido desoxirribonucleico	MAPK: Mitogen-activated protein kinases
AR: Anfirregulina	MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (comprobar)
ATP: Adenosín trifosfato	NRG: Neurregulinas
BTC: Betacelulina	PBS: Tampón fosfato salino
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario	PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinasa
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium	PKC: Proteína quinasa C
DMSO: Dimetilsulfóxido	PLC $\gamma$ : Fosfolipasa-C
EGF: Epidermal Growth Factor	RTK: Retceptores tirosín quinasa
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor	SBF: Suero fetal bovino
EPG: Epigén	SD: Desviación estándar
EPR: Epirregulina	STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
HB-EGF: Heparin-binding-EGF	TGF $\alpha$ : Transforming Growth Factor $\alpha$
HER: Human Epidermal Receptor	TK: Tirosín quinasa
IBMC: Instituto de Biología Molecular y Celular	TKis: Inhibidores de la actividad tirosín quinasa
IGF-1R: Insulin-like Growth Factor 1 Receptor	VIH: Virus de inmunodeficiencia humana
IMIM: Instituto Municipal de Investigaciones Biomédicas	

## RESUMEN.

---

El cáncer es un conjunto de enfermedades genéticas multifactoriales con uno de los más elevados índices de mortalidad a nivel mundial. En consecuencia, es necesaria la búsqueda de nuevas terapias con el fin de aumentar la supervivencia. Muchas vías de transducción de señales son iniciadas a partir de la dimerización y activación de los miembros de la familia ErbB de receptores. Múltiples evidencias sostienen que dichos receptores tienen una función fundamental en la transformación y progresión tumoral.

Durante el trabajo, se han estudiado los efectos biológicos de péptidos inhibidores de la dimerización, comparándolos con los efectos inducidos por los inhibidores de la actividad tirosín quinasa de los receptores en distintas líneas celulares de carcinoma de colon y carcinoma de páncreas exocrino. También se ha analizado, a partir de los niveles de fosforilación de los receptores, la capacidad de inhibir específicamente la formación de dímeros.

Se ha observado que los péptidos presentan efectos antiproliferativos en los distintos modelos celulares estudiados. Algunos de ellos presentan un efecto citoestático induciendo un aumento del porcentaje de células en la fase G1 acompañado de la reducción de las fases S y G2/M. Otros, muestran un efecto citotóxico aumentando la fase Sub-G1, indicativa de muerte celular. Por otro lado, los resultados parecen indicar que los péptidos inhiben específicamente los niveles de fosforilación de los receptores ErbB.

**Palabras clave:** péptido, dimerización, ErbB, cáncer, inhibidores de la actividad tirosín quinasa, terapia complementaria, fosforilación.

## SUMMARY

---

Cancer is a multifactorial genetic disease showing one of the highest mortality index worldwide. Consequently, it is necessary searching news therapies in order to increase patient's survival. Many signal transduction pathways are initiated through dimerization and activation of the ErbB family. Multiple evidences support that these receptors have an essential function in transformation and tumour progression.

In this project we have studied the biological effects of dimerization-inhibitory peptides, comparing those effects with the effects induced by the tyrosine kinase inhibitors in different cell lines from colon carcinoma and exocrine pancreatic carcinoma. We have also analysed peptides ability for specifically inhibit dimerization determining receptor phosphorylation levels.

It has been observed that the peptides show antiproliferative effects in the different cell models studied. Some of them show a cytostatic effect inducing an increase of G1 phase concomitant with the reduction of S and G2 / M phases. On the other hand, the results show a cytotoxic effect, with an increase of the Sub-G1 phase, indicative of cell death. Furthermore, the results suggest that the peptides specifically inhibit dimerization, reducing phosphorylation receptor levels.

**Keywords:** ErbB, peptide, dimerization, cancer, tyrosine kinase inhibitors, complementary therapy, phosphorylation.

# 1. INTRODUCCIÓN.

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se origina cuando una determinada población celular adquiere ciertas características moleculares que inducen una pérdida del control normal de su proliferación <sup>1</sup>.

Las células de un organismo crecen, en condiciones normales, de manera ordenada y están sometidas a procesos de muerte celular programada en respuesta al envejecimiento o al daño celular. Sin embargo, en los procesos carcinogénicos, dicho control se pierde, incrementándose por lo tanto, la proporción de células alteradas que, son capaces entre otras cosas, de evadir la respuesta inmune del organismo (Figura 1)<sup>1</sup>.

Las células cancerosas presentan la capacidad de diseminar desde su órgano o tejido de origen, hasta regiones más distantes del organismo, es lo que se denomina capacidad metastásica. Las células cancerosas del tumor primario, se desplazan a través del torrente sanguíneo y de los vasos linfáticos, a otros órganos<sup>1</sup>. Un tumor metastático presenta una mayor agresividad y una respuesta más limitada a los tratamientos quimioterápicos y radioterápicos, disminuyendo por tanto, la esperanza de vida de los pacientes afectados.

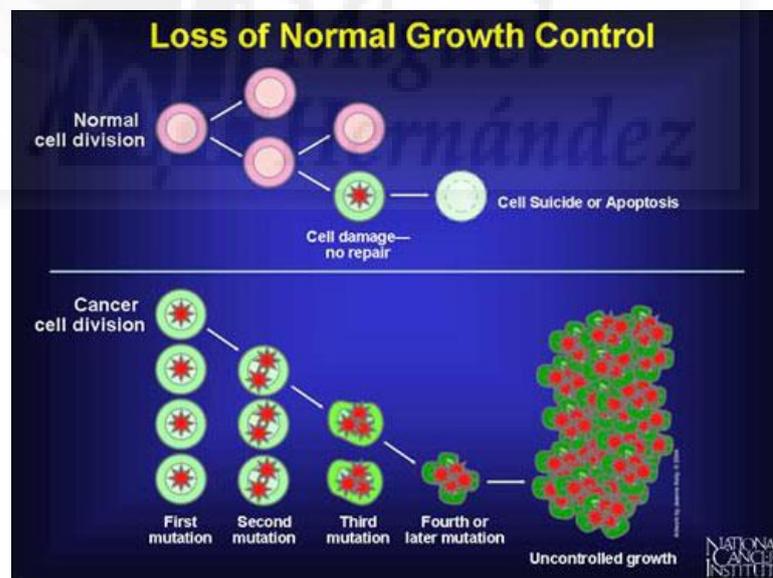


Figura 1: División celular normal frente al crecimiento tumoral descontrolado<sup>1</sup>.

El cáncer constituye una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. En 2012 se diagnosticaron 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer. En los próximos 20 años se prevee que el número de nuevos casos aumente aproximadamente un 70% <sup>2</sup>.

La extirpación quirúrgica de los tumores sólidos constituye la alternativa terapéutica más efectiva en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, no siempre es posible acudir a la cirugía y, en muchas ocasiones, aunque el tumor pueda ser extirpado, es también necesario un tratamiento adyuvante, bien mediante quimioterapia o radioterapia. El mayor problema asociado a este tipo de tratamientos es la adquisición de un fenotipo resistente por parte de las células tumorales. La mayoría de los tumores son en su inicio sensibles a los tratamientos convencionales, sin embargo, a medida que dicho tratamiento avanza, aumenta la resistencia, dificultando la respuesta tanto a los fármacos quimioterápicos como a la radioterapia. El desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que faciliten la respuesta del paciente, constituye uno de los objetivos prioritarios de la investigación oncológica<sup>3</sup>.

La búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas se centra básicamente en el concepto de terapia dirigida, es decir, el desarrollo de fármacos que influyen en la expresión y/o actividad de determinados genes que participan en vías específicas de señalización celular. Múltiples estudios han identificado diversas mutaciones oncogénicas como posibles dianas terapéuticas. Distintos mutantes del dominio quinasa de los receptores ErbB, se ha convertido en dianas terapéuticas válidas para el tratamiento de determinados tipos de tumores<sup>4</sup>.

Los receptores tirosín quinasa de factores de crecimiento constituyen el punto de inicio de cascadas de señalización celular mediante fosforilación/defosforilación de proteínas. La familia de receptores ErbB consta de cuatro miembros: el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB-1 o HER1), HER2 (NEU, ErbB-2), HER3 (ErbB-3) y HER4 (ErbB-4). La dimerización de los receptores ErbB es imprescindible para la actividad tirosín quinasa de los mismos, produciéndose en primer lugar la autofosforilación de las dos subunidades del dímero. Una vez fosforilados, los receptores ErbB fosforilan otras proteínas, desencadenando una cascada de rutas intracelulares involucradas en la proliferación, migración y diferenciación celular<sup>5, 6</sup>.

Los receptores de la familia ErbB se encuentran localizados en la membrana plasmática y están compuestos de un dominio extracelular glicosilado de unión al ligando, un segmento transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosín quinasa (TK) que se encuentra bastante conservado entre los cuatro miembros de la familia (Figura 2). Pese a que el ErbB3 no posee actividad tirosín quinasa específica, es capaz de unir ATP y transmitir señales mitogénicas mediante la heterodimerización con otros miembros de la familia<sup>6</sup>.

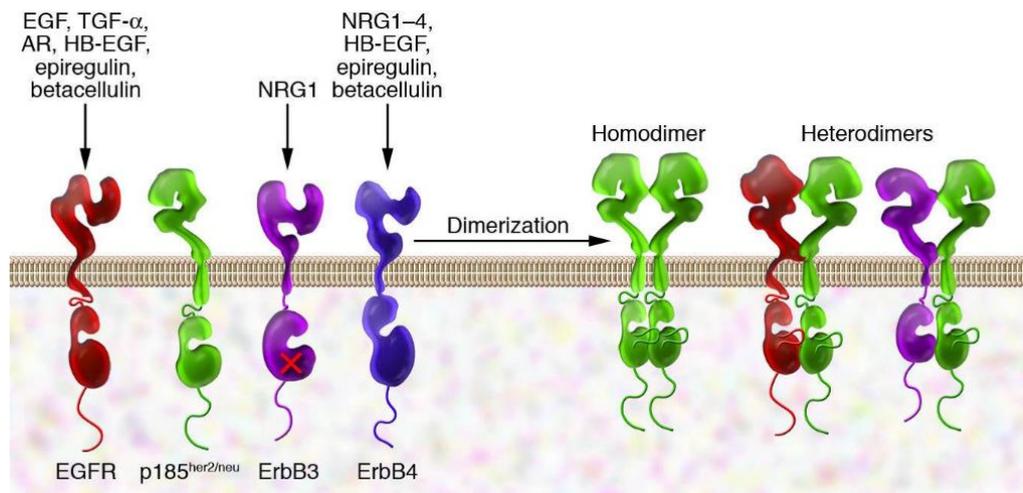


Figura 2: A la izquierda se muestra la estructura de los 4 receptores ErbB con sus respectivos ligandos. A la derecha se representa la formación de homodímeros y heterodímeros<sup>7</sup>.

En ausencia del ligando, el receptor se halla en estado monomérico y enzimáticamente inactivo. El ligando presente en el medio circundante, se une al monómero en la región extracelular promoviendo la dimerización del receptor, e induciendo un cambio conformacional que causa la activación del dominio catalítico<sup>6</sup>. La dimerización puede producirse entre dos receptores idénticos, en cuyo caso hablamos de homodimerización, o entre distintos miembros de la familia en cuyo caso hablamos de heterodimerización. Tras la dimerización, se produce la autofosforilación de residuos de tirosín intracelulares que activa la tirosín quinasa de los receptores, a partir de la cual se inicia la cascada de señales de transducción intracelulares. Entre las vías de señalización activadas, se encuentran 1) fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/Akt, 2) Ras/Raf/MAPK, 3) fosfolipasa-C (PLC $\gamma$ )/ proteína quinasa C (PKC) y 4) transductores y activadores de la señal de transcripción (STAT) (Figura 3)<sup>6, 8</sup>. Estas vías culminan en la transducción de genes implicados en la proliferación, la diferenciación, la supervivencia celular y la angiogénesis, procesos implicados en la tumorigénesis.

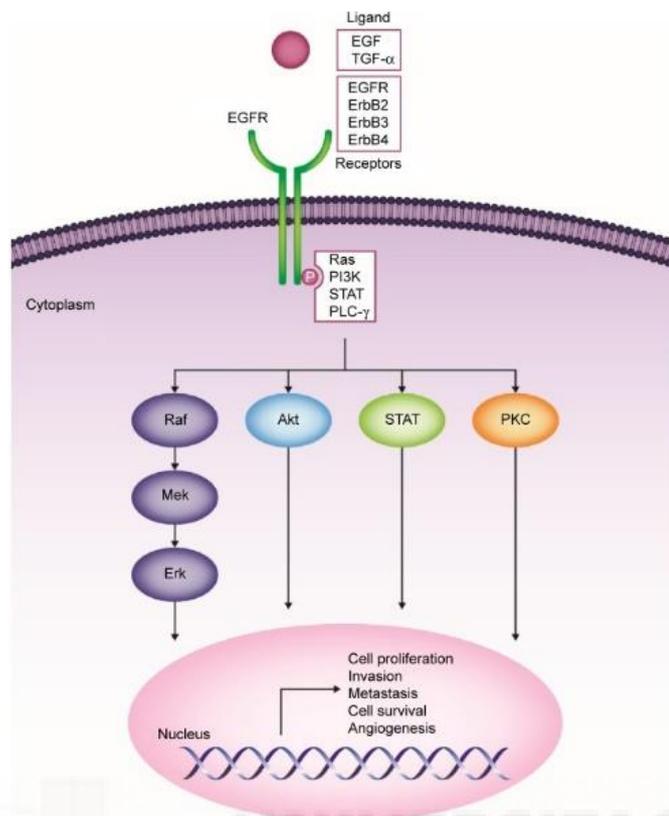


Figura 3: Vías de señalización activadas por los receptores ErbB, Ras/Raf/MAPK (Mek, Erk); vía PI3K/Akt; vía de los transductores y activadores de la señal de transcripción (STAT); vía fosfolipasa-C (PLC $\gamma$ ) / proteína quinasa C (PKC); activando la proliferación celular, invasión, metástasis, angiogénesis y supervivencia celular<sup>9</sup>.

La desregulación de las rutas de señalización descendentes de los receptores ErbB puede deberse a diversas alteraciones<sup>6, 10, 11</sup>:

- Incremento en los niveles de expresión del receptor.
- Aumento de la expresión del ligando.
- Mutación en el dominio de activación de la tirosín quinasa.
- Receptores truncados constitutivamente activos.
- Mutaciones en genes situados corriente abajo en la cascada de señalización.

Dichas alteraciones desempeñan un papel importante en la patogénesis y progresión de distintos tipos de carcinomas, y estudios in vivo e in vitro han mostrado que estas proteínas son capaces de inducir la transformación celular. Por todo ello, los receptores ErbB constituyen una de las dianas terapéuticas más importantes para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos.

La sobreproducción de ligandos es uno de los mecanismos de activación de los receptores ErbB, y puede producirse bien en las propias células tumorales o bien en el estroma tumoral. Existen tres grupos de ligandos para estos receptores. Un grupo se une específicamente al EGFR

e incluye EGF, TGF $\alpha$ , anfirregulina (AR) y EPIGEN (EPG). Un segundo grupo se une tanto EGFR y ErbB4 e incluye betacelulina (BTC), HB-EGF y epirregulina (EPR). El tercer grupo incluye a todas las neuregulinas (NRG) 1-4, de las cuales se unen NRG1 y NRG2 a ErbB3 y ErbB4, mientras que NRG3 y NRG4 sólo se unen a ErbB4<sup>12, 13</sup>. A pesar de no haberse encontrado ligandos específicos para ErbB2, este receptor funciona como un co-receptor cuando heterodimeriza con otros receptores de la familia ErbB confiriendo mayor estabilidad y potencia en la señalización, comparado con otros dímeros<sup>12, 14</sup>.

En los últimos años, se ha hecho evidente que los receptores ErbB desempeñan un papel destacado en la iniciación y mantenimiento de diversos tumores sólidos. Esto ha llevado al desarrollo y la aplicación generalizada de los inhibidores específicos de ErbB como terapias contra el cáncer<sup>13</sup>.

Principalmente hay dos categorías de fármacos dirigidos hacia los receptores ErbB. Una de ellas es la conformada por inhibidores de la tirosín quinasa (TKis) de los receptores ErbB, son moléculas de pequeño peso molecular que interactúan con el dominio tirosín quinasa intracelular, inhibiendo la fosforilación inducida por ligando. Generalmente son moléculas competidoras reversibles del sitio de unión al ATP del dominio intracelular catalítico de la tirosín quinasa. La otra categoría la conforman los anticuerpos monoclonales que se unen al dominio externo del receptor con alta afinidad, compitiendo con sus ligando naturales y bloqueando así la activación del receptor<sup>4</sup>.

Algunos receptores ErbB se encuentran sobreexpresados en diversos tipos de tumores<sup>15-17</sup>. Tal y como hemos mencionado anteriormente, la dimerización de los receptores es un paso imprescindible para la señalización celular. En el presente trabajo nos hemos planteado el desarrollo de una terapia complementaria en el tratamiento contra el cáncer, enfocada en la inhibición de la dimerización de los receptores ErbB. La estrategia consiste en crear péptidos a partir de técnicas de modelado molecular, diseñados específicamente para cada uno de los dominios extracelulares de los cuatro miembros de la familia ErbB. Dado que el dominio intracelular se encuentra prácticamente conservado, se ha diseñado un único péptido para el dominio intracelular común a los cuatro miembros de receptores. Los péptidos han sido generados a partir de la propia secuencia de los receptores que da lugar al dominio mediante el cual se produce la dimerización entre dos receptores, lo cual convierte a los péptidos en inhibidores competitivos de la dimerización.

## 2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.

---

La familia de receptores ErbB ha sido ampliamente estudiada debido a su participación en vías de señalización celular implicadas en múltiples procesos biológicos, tales como proliferación celular, angiogénesis, adhesión celular, motilidad celular y supervivencia celular. El miembro más representativo de esta familia de receptores es el EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) que desempeña un papel crucial en la oncogénesis de origen epitelial, por esta razón ha sido diana de diversos fármacos antineoplásicos<sup>18</sup>. Los miembros de esta familia de receptores muestran actividad tirosín quinasa, siendo el propio receptor el primer sustrato de fosforilación, iniciándose una cascada de señalización que culmina en el núcleo celular con la activación de factores de transcripción que regulan la expresión génica. La unión con el ligando induce una dimerización de los monómeros de receptor necesaria para la activación de la actividad quinasa del mismo<sup>18</sup>.

Como se ha citado anteriormente, actualmente están en uso dos categorías de fármacos dirigidos contra los receptores ErbB. Una de ellas la constituyen pequeñas moléculas inhibitoras de la actividad quinasa del EGFR que actúan compitiendo con el ATP por la unión del dominio catalítico de la enzima. Entre ellos, afatinib (Gilotrif<sup>®</sup>) y gefitinib (Iressa<sup>®</sup>) han sido aprobados para el tratamiento quimioterapéutico de los pacientes con cáncer avanzado de pulmón no microcítico (NSCLC); erlotinib (Tarceva<sup>®</sup>) se utiliza como tratamiento para NSCLC y cáncer de páncreas; poziotinib también utilizado para el tratamiento contra NSCLC actuando sobre EGFR, ErbB2 y ErbB4; lapatinib (Tykerb<sup>®</sup>) es utilizado para el tratamiento del cáncer de mama actuando tanto sobre EGFR como sobre ErbB2<sup>6, 19</sup>.

Por otro lado, otro grupo de fármacos antineoplásicos está constituido por los anticuerpos monoclonales (mAbs) que reconocen epítomos específicos del receptor al que se unen. Terapias dirigidas que utilizan anticuerpos monoclonales contra EGFR como cetuximab (Erbix<sup>®</sup>) y panitumumab (Vectibix<sup>®</sup>) son ampliamente utilizados para el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico sin mutaciones en las proteínas RAS<sup>20</sup>. ErbB2 también es diana de otros anticuerpos monoclonales como pertuzumab (Omnitarg<sup>®</sup>) y trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) usados en combinación para el tratamiento del cáncer de mama metastásico. Además, trastuzumab también es usado en cáncer de estómago<sup>21</sup>.

Estos tratamientos muestran beneficios clínicos para el tratamiento de varios tipos de cáncer, sin embargo, su eficacia clínica está limitada debido a la aparición de resistencia a los medicamentos. ErbB3 forma heterodímeros con los otros miembros de la familia, desempeñando un papel importante en las resistencias a los fármacos específicos para EGFR y ErbB2. Por este

motivo, actualmente se están desarrollando anticuerpos anti-ErbB3 para terapia contra el cáncer, bloqueando el sitio de unión al ligando<sup>22, 23</sup>.

Dada la importancia de la dimerización en la activación de los receptores, la inhibición de ésta, podría constituir un blanco de interés para el desarrollo de terapias complementarias para el tratamiento de determinados tumores. Por ello, este trabajo se centra en el desarrollo de péptidos específicos para los cuatro miembros de la familia ErbB (EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4), diseñados con el objetivo de inhibir específicamente la formación tanto de homodímeros como de heterodímeros en distintos modelos celulares. Los objetivos planteados son:

**OBJETIVO 1:** Diseñar péptidos inhibidores de la dimerización de los receptores ErbB.

**OBJETIVO 2:** Determinar el efecto de los péptidos diseñados en el objetivo 1 sobre modelos celulares de carcinoma de colon y páncreas. Comparar con los efectos producidos por los inhibidores de la actividad tirosín quinasa de los receptores ErbB.

**OBJETIVO 3:** Proceder a la caracterización inicial de la especificidad de los péptidos.



## 3. MATERIALES Y METODOS.

---

### 3.1 Líneas celulares.

Para poder llevar a cabo los ensayos desarrollados en este proyecto, se ha trabajado con las líneas celulares SW480 y SW620 de carcinoma de colon, y con las líneas celulares RWP-1, HS766T e IMIM-PC-2 de carcinoma de páncreas exocrino.

Tanto las líneas celulares de carcinoma de colon como las líneas celulares de carcinoma de páncreas fueron obtenidas del repositorio del Instituto Municipal de Investigaciones Médicas (IMIM) de Barcelona.

Las líneas celulares fueron cultivadas con un 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Se utilizó el medio de cultivo DMEM 1X (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco Life Technologies) + GlutaMAX™ complementado con 4,5 g/L de D-Glucosa y piruvato y suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS: fetal bovine serum) y un 1% de Penicilina/Estreptomicina (PS).

### 3.2 Tratamientos.

Para los tratamientos, las células se trataron con 5 péptidos a distintas concentraciones en un rango entre 1-25 µM. Los péptidos fueron el péptido 8 (PLMLYNPTTYQMDVNP), péptido 9 (ALVTYNTDTFESMPNP), péptido 10 (QPLVYNKLTQLEPNP), péptido 11 (QTFVYNPTTFQLEHNF), péptido 12 (IDVYMIMVKCWMGRKKRRQRRPPQ) sintetizados por la casa comercial Genemed Synth Inc (San Antonio, TX, USA). Las células fueron cultivadas a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> durante periodos cortos de 1 o 3 horas o durante periodos largos de 72 horas en función del experimento llevado a cabo. El control negativo para los péptidos 9, 11 y 12 disueltos en agua, no contiene ningún tratamiento; el control negativo para los péptidos 8 y 10 disueltos en DMSO son comparados con el control negativo con 20 µL de DMSO.

### 3.3 Ensayos de proliferación celular (MTT).

Con la finalidad de evaluar los efectos de los péptidos sobre la proliferación celular se llevó a cabo el ensayo colorimétrico MTT. Este ensayo está basado en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio, una sal de tetrazolio soluble y amarilla que al ser catalizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, da lugar al formazán, un compuesto púrpura e insoluble que permite valorar el número de células viables en función de

la cantidad de formazán producido. Mediante este método se pueden determinar tanto la supervivencia como la proliferación celular.

Para llevar a cabo este ensayo se siembran las células en placas de 96 pocillos a una proporción de 2000-4000 células/100µl de medio de cultivo y se incuban a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. A continuación se tratan las células con los distintos péptidos por sextuplicado, que son incubadas en las mismas condiciones durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, se añade el reactivo MTT (Sigma Aldrich) a cada pocillo a una concentración de 0,25 mg/ml y se incuba durante 3 horas. Se elimina el contenido de los pocillos y se le añaden 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver los cristales de formazán, agitando la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, se mide la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas de modelo Anthos 2001.

### 3.4 Ciclo celular.

Mediante análisis por citometría de flujo se analizó el contenido de ADN de las muestras, determinando de este modo la distribución de las distintas fases del ciclo celular. El ADN de las células es marcado con un agente intercalante fluorescente, el yoduro de propidio. Dicho fluoróforo se excita a longitudes de onda de 480 nm y emite fluorescencia a 620 nm, aproximadamente. El yoduro de propidio es capaz de intercalarse entre los ácidos nucleicos de tal manera que las células emiten mayor o menor fluorescencia en función de la cantidad de ADN que contengan. Aquellas células que se encuentren en las fases G2 y M del ciclo celular emitirán el doble de fluorescencia que aquellas que se encuentren en fase G1 ya que en las fases G2 y M ya se ha producido la fase de síntesis y la duplicación del material genético (dotación cromosómica tetraploide (4n)), mientras que en fase G1 la dotación cromosómica es diploide (2n). Las células que se encuentran en la fase S o fase de síntesis, emiten una señal fluorescente comprendida entre la emitida por las células en las fases G1 y G2/M. Por otro lado, las células muertas presentan el ADN fragmentado de modo que la fluorescencia emitida es de menor intensidad que las células que presentan de manera íntegra el ADN (fase subG1).

En dicho ensayo, las células son tratadas durante 24 horas con los 5 péptidos. Transcurrido ese tiempo las células son recolectadas mediante tripsinización, lavadas mediante tampón PBS y fijadas en etanol al 70% a -20°C durante al menos 30 minutos. Una vez han sido fijadas, se procede a la precipitación de las células, las cuales se resuspenden en 500 µl de una mezcla que contiene 25 µg/ml de RNAsa, PBS-Triton al 0,5% y 25 µg/ml de yoduro de propidio y se incuban a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos.

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

### 3.5 ARRAY de fosfoproteínas.

Con el objetivo de analizar los perfiles de fosforilación de receptores tirosín quinasa se utilizó el Human Phospho-RTK Array (R&D Systems). Se trata de una herramienta de cribado que permite detectar simultáneamente los niveles relativos de fosforilación de 49 RTKs diferentes.

Cada anticuerpo de captura ha sido cuidadosamente seleccionado utilizando lisados celulares preparados a partir de líneas celulares conocidas, tratadas con los ligandos que expresan el receptor diana o líneas celulares transfectadas con cDNA que codifica un RTK particular. Los anticuerpos de captura y detección se encuentran por duplicado en membranas de nitrocelulosa.

En primer lugar las células son lisadas para la preparación de las muestras. Los lisados celulares se diluyen e incuban durante la noche con el Human Phospho-RTK Array. Después de la unión al dominio extracelular del RTK tanto fosforilado como no fosforilado, la matriz se somete a sucesivos lavados para eliminar las proteínas no unidas y seguidamente se incuba con una mezcla de un cóctel de anticuerpos de detección biotinilados. Cualquier complejo proteína-anticuerpo de detección presente está sujeto a la membrana mediante su anticuerpo afín de captura inmovilizado. Posteriormente se añade estreptavidina-HRP y los reactivos de detección de quimioluminiscencia, de modo que se produce una señal en cada punto proporcional a la cantidad de RTK fosforilado unido a la matriz. La quimioluminiscencia es detectada de la misma manera que una transferencia mediante ensayo Western. El protocolo seguido fue el facilitado por la casa comercial (R&D Systems).

## 4. RESULTADOS.

### OBJETIVO 1: Generación de los péptidos inhibidores de la dimerización de los receptores ErbB.

Los miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB2, ErbB3 y ErbB4) son proteínas transmembrana con actividad tirosín quinasa, que es activada al producirse la dimerización del receptor inducida por el ligando (Figura 5)<sup>24</sup>. Uno de los objetivos planteados en este trabajo es conseguir, mediante el diseño y la utilización de péptidos específicos, la inhibición de la dimerización de los receptores de la familia ErbB.

Para que se produzca la dimerización de los receptores, es necesario que se den dos interacciones, una a nivel del dominio extracelular y otra a nivel intracelular en el dominio catalítico de la tirosín quinasa<sup>24</sup> (Figura 5). Dicha dimerización es inducida por la unión de ligandos como el factor de crecimiento epidérmico (EGF).

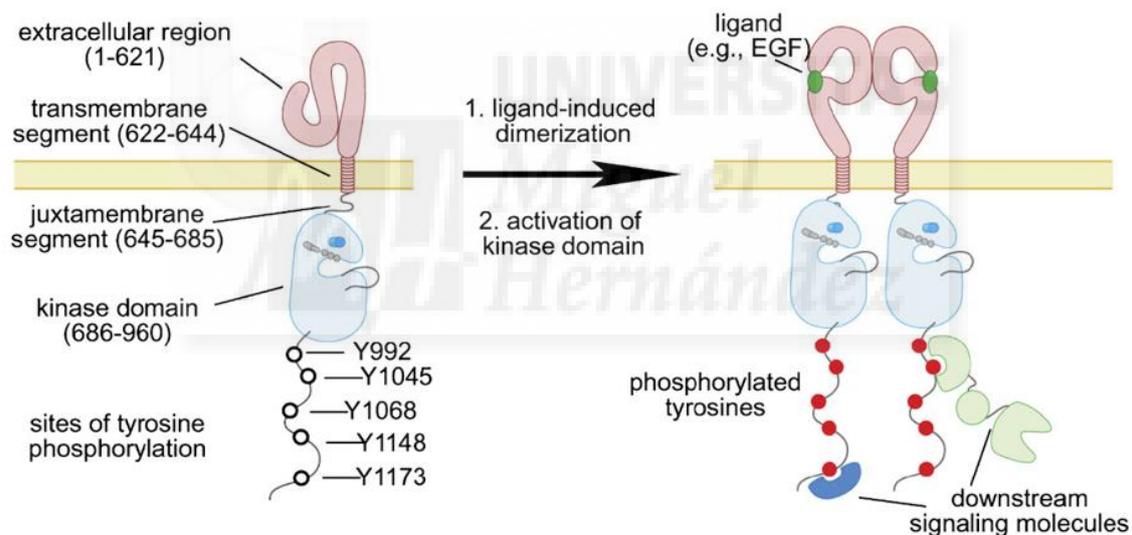


Figura 5: Estructura del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) con una región extracelular, un segmento transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosín quinasa. Vista general de la dimerización inducida por ligando y el proceso de la activación de EGFR<sup>24</sup>.

El primer paso para poder desarrollar este estudio fue diseñar distintos péptidos que pudieran competir en la interacción proteína-proteína evitando la dimerización de los receptores ErbB.

Para iniciar el estudio fue necesario el conocimiento previo de las estructuras tridimensionales de los cuatro receptores ErbB, para lo que se recurrió a la base de datos Protein Data Bank<sup>25</sup> con el objetivo de buscar la estructura cristalina de los receptores. No obstante, sólo

es conocida la estructura a alta resolución de EGFR, mostrándose en dos conformaciones distintas, la forma activa y la forma inactiva del dominio quinasa<sup>24</sup>.

El siguiente paso fue determinar el dominio mediante el cual se produce bien la homodimerización del EGFR, o bien su heterodimerización con cualquiera de los restantes miembros de la familia. Para ello, se construyó el homodímero de EGFR a partir del cual se analizaron los aminoácidos que participan en la interacción (Figura 6). Esta región tiene una estructura secundaria de horquilla beta.

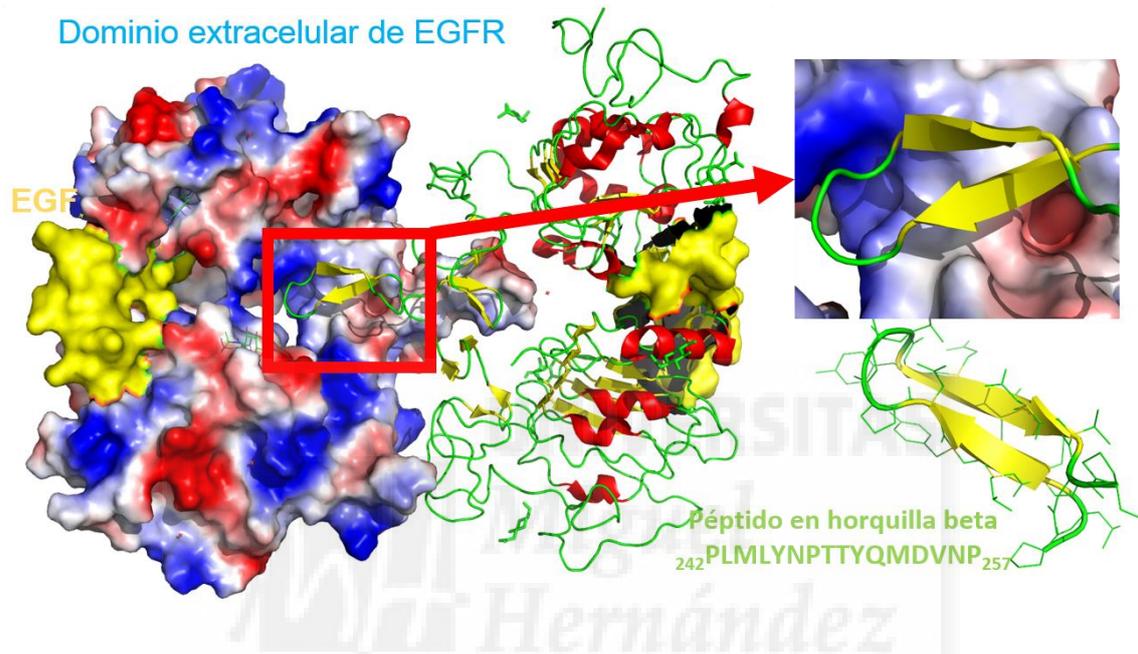


Figura 6: Región de interacción en el dominio extracelular entre dos monómeros de EGFR. Dicha presenta una estructura secundaria en horquilla beta localizada en la posición 242 y 257, cuya secuencia es PLMLYNPTTYQMDVNP.

Se realizó un alineamiento de secuencia entre los cuatro receptores ErbB con el fin de obtener la secuencia que participa en la dimerización en el dominio extracelular en los cuatro miembros de la familia (Figura 7), dicha secuencia se muestra seleccionada en amarillo.

```

ERBB3 ---RDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKG-RCWGPGEEDCQTLTKTICAPQCNGHCFGPNPQ 225
ERBB4 PWPSNLTIVSTNGSSGCRCHKSTG-RCWGPTEHCQTLTRTVCAEQCDGRCYGYPVSD 228
EGFR -----QKCDPSCPNGSCWAGEENCQKLTKIICAQQCSGRFCRGKSPSD 185
ERBB2 NNQLALTLIDTNRSRACHPCSMPCKGSRCWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCA-RCKGLPTD 234
          *   *   .   ***   .:.***:** : **   *   *   *   .:
          .

ERBB3 CCHDECAGGCSGPQDTDFACRHFNDSGACVPRCPQPLVYNKLTFFQLEPNPHTKYQYGGV 285
ERBB4 CCHRECAGGCSGPKDTCFACMNFNDSGACVTQCPQTFVYNPTTFQLEHNFNAKYTYGAF 288
EGFR CCHNQCAAGCTGPRSDCLVCRKFRDEATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNEEGKYSFGAT 245
ERBB2 CCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVYNTDTEFESMPNPEEGRYTFGAS 294
          *** : ** * * * * * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          .

ERBB3 CVASCPHNFVVDQT-SCVRACPPDKMEVD-KNGLKMCPECGGLCPKACEGTGSGSRF--Q 341
ERBB4 CVKKCPHNFVVDSS-SCVRACPSSKMEVE-ENGIKMKCKPCTDICPKACDGI GTGSLMSAQ 346
EGFR CVKKCPRNYVVDHGCVRACGADSYEME-EDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSL 304
ERBB2 CVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPHLNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVR 354
          ** * * * * * : : . * * . * * . * * : : * * : * * * * * * * * *
          .

ERBB3 TVDSSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPEKLNVFRTVREITGYLNIQS 401
ERBB4 TVDSSNIDKFINCTKINGNLI FLVTGIHGDPYNAIEAIDPEKLNVFRTVREITGFLNIQS 406
EGFR SINATNIKHFKNCTSI SGLHLIPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQA 364
ERBB2 AVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISA 414
          : : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          .

```

Figura 7: Alineamiento de secuencia del dominio extracelular de los receptores ERBB3, ERBB4, EGFR y ERBB2. La horquilla beta correspondiente a la zona de interacción de los cuatro receptores y aparece seleccionada en el cuadro amarillo.

Del mismo modo, se analizó la región de dimerización en el dominio intracelular de los cuatro miembros de la familia. Observamos que en el dominio intracelular, la secuencia de aminoácidos se encuentra conservada casi en su totalidad en los cuatro receptores a excepción de un aminoácido. Además, esta región muestra una estructura secundaria en una alfa hélice para EGFR (Figura 8).

```

ERBB3 QPQICTIDVYVMVVKCWMIDENIRPTFKELANEFTRMARDPPRYLVIKRESGPGIAPGPE 991
ERBB4 QPPICTIDVYVMVVKCWMIDADSRPKFKELAAEF SRMARDPQRYLVIQDDR-MKLPSPN 999
EGFR QPPICTIDVYIMVVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDER-MHLPSPT 948
ERBB2 QPPICTIDVYIMVVKCWMIDSECRPRFRELVEF SRMARDPQRFVVIQ-NED-LGPASPL 1000
          ** ***** : ***** : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          .

```

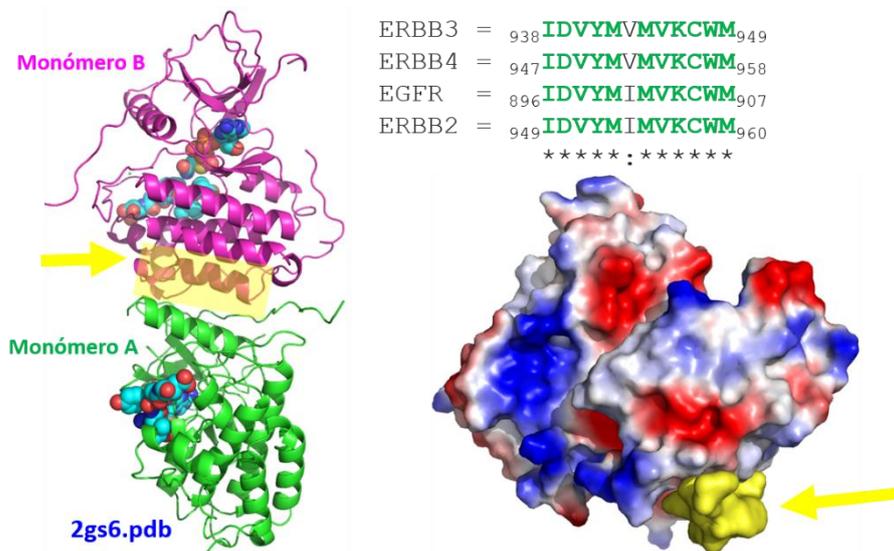


Figura 8: Alineamiento de secuencias de los receptores ERBB3, ERBB4, EGFR y ERBB2. En amarillo se muestra la zona de interacción entre los receptores. La parte superior de la figura muestra un alineamiento de las secuencias de los cuatro receptores en la región de interacción proteína-proteína. En la parte inferior izquierda se muestra la estructura secundaria de un dímero de EGFR en su dominio intracelular. En la parte inferior derecha se representa la superficie de van der Waals, coloreada en función de la carga de la cadena lateral de cada aminoácido, junto al péptido que debe competir en la interacción de un dominio con el otro.

El diseño de los péptidos responde al rescate de las secuencias aminoacídicas en la región de interacción proteína-proteína, tanto del dominio intracelular como del extracelular. La hipótesis de trabajo que planteamos supone que dichos péptidos añadidos al medio de cultivo celular van a interactuar en los sitios de dimerización y, por tanto, impedirlos. La secuencia de los péptidos utilizados se muestra en la figura 9. Pensando en posibilitar la inclusión en la célula del péptido 12 (pt12) se incluye en su secuencia un péptido facilitador de la penetración. En concreto una secuencia TAT (GRKKRRQRRRPPQ)<sup>26</sup> del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).

pt 8.- **eEGFR** (secuencia extracelular de EGFR) =

242 PLML**YNPTTY**QMDV**NP** 257

pt 9.- **eERBB2** (secuencia extracelular de ERBB2) =

248 ALVT**YNTDT**FESMP**NP** 263

pt 10.- **eERBB3** (secuencia extracelular de ERBB3) =

238 QPLV**YNKLT**FQLE**PNP** 253

pt 11.- **eERBB4** (secuencia extracelular de ERBB4) =

241 QTFV**YNPTT**FQLE**HNF** 256

pt 12.- **iEGFR-TAT** (secuencia intracelular de EGFR) =

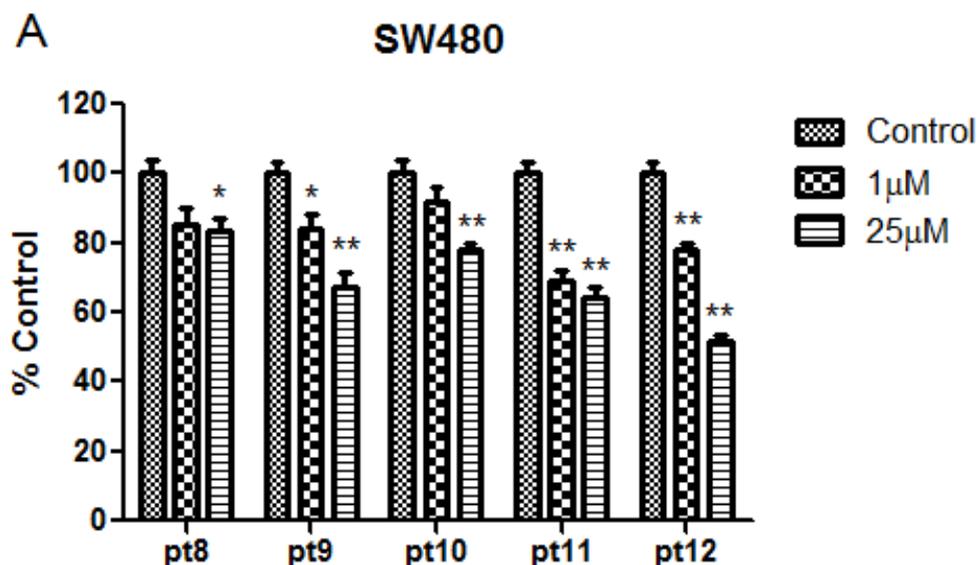
896 **IDVYIMVKCWMGRKKRRQRRRPPQ**  
} **Secuencia TAT**

Figura 9: Secuencias de los cinco péptidos diseñados. Del 8 al 11 corresponden con la secuencia de interacción del dominio extracelular de los receptores EGFR, ErbB2, ErbB3 y ErbB4, respectivamente. El pt 12 corresponde a la secuencia de interacción del dominio intracelular del EGFR (verde) y la secuencia TAT de una proteína viral del VIH (amarillo)<sup>26</sup>.

**OBJETIVO 2:** Determinar el efecto de los péptidos diseñados en el objetivo 1, sobre modelos celulares de carcinoma de colon y páncreas. Comparar con los efectos producidos por los inhibidores de la actividad tirosín quinasa de los receptores ErbB.

Una vez diseñados los péptidos, el siguiente paso fue determinar si todos ellos presentaban actividad biológica antiproliferativa en modelos celulares de diferentes tipos de tumores. Esto fue estudiado mediante ensayos de proliferación celular o MTT en placas de 96 pocillos. Se realizaron tratamientos a dos concentraciones de los cinco péptidos a estudio, 1  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$ .

Los péptidos fueron testados en líneas celulares de carcinoma de colon y de carcinoma de páncreas exocrino. Fueron utilizadas las líneas celulares SW480 y SW620 de carcinoma de colon y las líneas celulares IMIM-PC-2 y HS766T de carcinoma de páncreas. En general, se observó un mayor efecto antiproliferativo de los péptidos a la concentración más alta de 25  $\mu\text{M}$ , en las líneas celulares SW480 y SW620. En la línea celular SW480 (Figura 10A) el péptido 12 presenta un mayor efecto respecto al resto de los péptidos, reduciendo el porcentaje de células un 50% aproximadamente respecto al control. Los péptidos 9 y 11 muestran resultados similares reduciendo el porcentaje de células un 35% aproximadamente, mientras que los péptidos 8 y 10 son los que muestran menor efecto que el resto de péptidos, disminuyendo la proliferación celular en torno a un 20% respecto al control. En cuanto a la línea celular SW620 (Figura 10B), los péptidos 12 y 9 muestran mayores efectos, reduciendo la proliferación respecto al control un 50% y un 40% respectivamente. Los péptidos 8, 10 y 11 muestran resultados similares inhibiendo la proliferación un 30% aproximadamente.



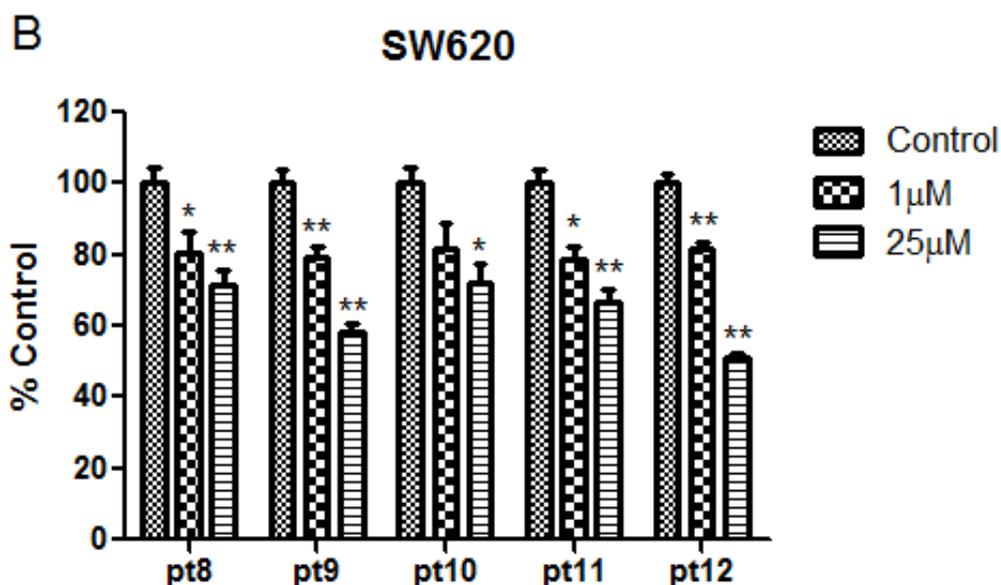
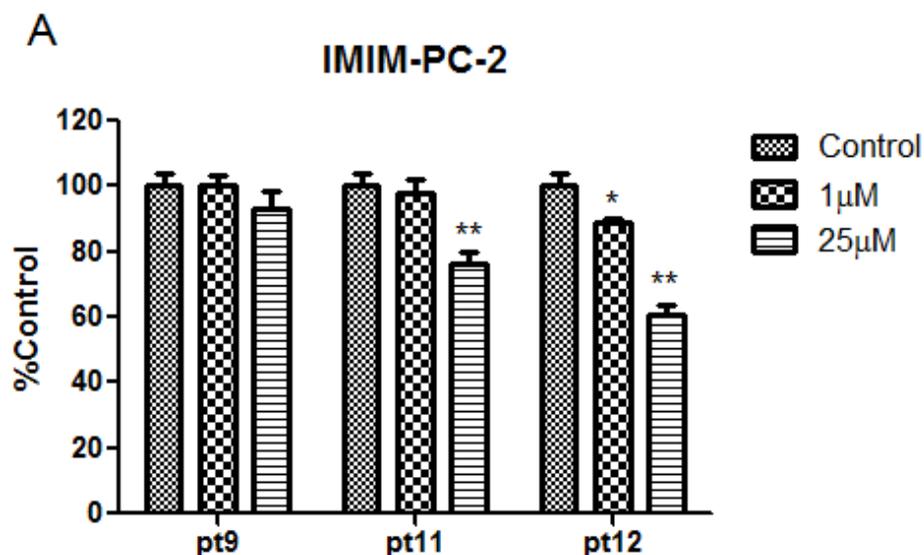


Figura 10: Resultados de los ensayos MTT en las líneas celulares de carcinoma de colon (A) SW480 y (B) SW620 tratadas con los péptidos pt8, pt9, pt10, pt11 y pt12 a concentraciones de 1  $\mu$ M y 25  $\mu$ M. Se muestra la representación de la media de los datos  $\pm$ SD,  $n \geq 6$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

En las líneas celulares de carcinoma de páncreas (Figura 11) los péptidos testados fueron únicamente los péptidos pt9, pt11 y pt12 por motivos de disponibilidad de los péptidos en el laboratorio en ese momento. En ambos casos se observan resultados similares, siendo el péptido 12 el que mayor efecto antiproliferativo presentó, reduciendo aproximadamente un 50% la proliferación celular a la concentración de 25  $\mu$ M. El péptido 11 reduce un 15% la proliferación en la línea celular IMIM-PC-2 y un 25% en la línea celular HS766T respecto al control. En cuanto al péptido 9 no se observan grandes efectos en la reducción de la proliferación en ambas líneas celulares.



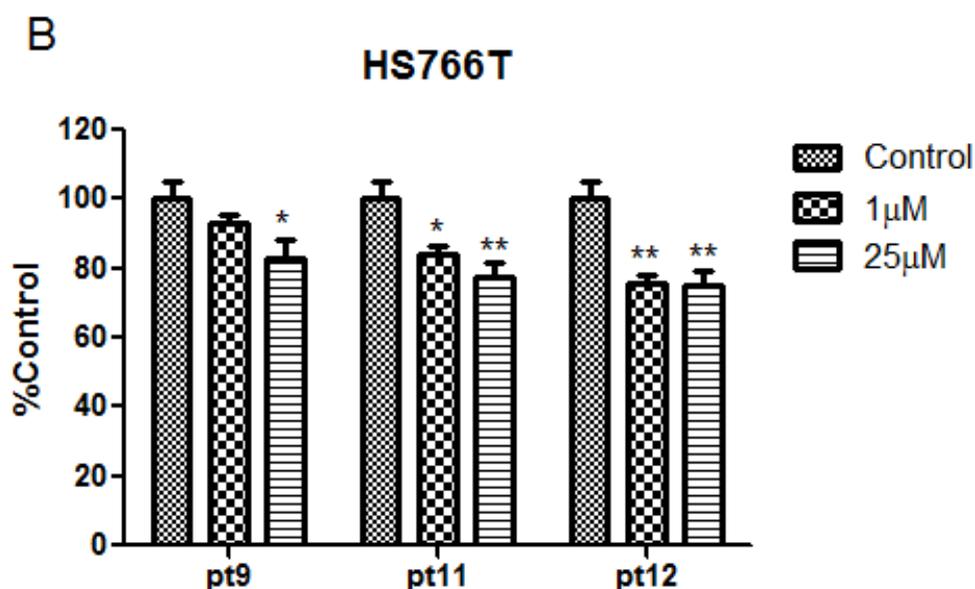


Figura 11: Resultados de los ensayos MTT en las líneas celulares de carcinoma de páncreas exocrino (A) IMIM-PC-2 y (B) HS766T tratadas con los péptidos pt9, pt11 y pt12 a las concentraciones de 1  $\mu$ M y 25  $\mu$ M. Se muestra la representación de la media de los datos  $\pm$ vSD,  $n \geq 6$ , \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Aunque con el péptidos 12 los resultados en ambos tipos de tumores son similares, con los péptidos pt 9 y pt 11 se observa un mayor efecto en las líneas celulares de carcinoma de colon (35-40% de inhibición de la proliferación), que en las líneas celulares de carcinoma de páncreas (10-30% de inhibición de la proliferación)

El siguiente paso fue comparar los efectos antiproliferativos causados por los péptidos inhibidores de la dimerización, con el efecto que causan los inhibidores de la actividad tirosín quinasa (TKis) de los receptores ErbB. Para determinar el efecto que tienen los TKis sobre la proliferación celular se escogieron gefitinib, erlotinib y AG-1478, inhibidores del EGFR y que, en el caso de gefitinib y erlotinib, están ya en uso clínico. Se eligieron las mismas líneas celulares en las que fueron testados los péptidos, las líneas IMIM-PC-2 y HS766T de carcinoma de páncreas exocrino y las líneas celulares SW480 y SW620 de carcinoma de colon.

Los resultados muestran que los tres inhibidores tienen mayor efecto sobre las líneas celulares de carcinoma de páncreas (Figura 12) que sobre las líneas celulares de carcinoma de colon (Figura 13). En la línea celular IMIM-PC-2, a la concentración de 30  $\mu$ M erlotinib reduce la viabilidad celular aproximadamente un 50%, AG-1478 un 35% y gefitinib hasta un 90%, siendo por tanto, el que presenta una mayor respuesta antiproliferativa. En la línea celular HS766T los tres inhibidores presentan un efecto similar, provocando una reducción de la viabilidad celular en un 30-40%.

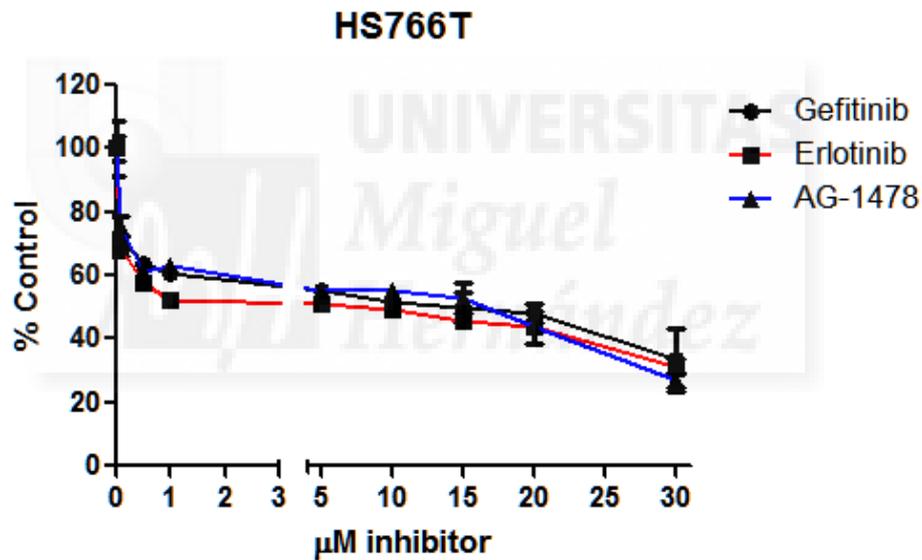
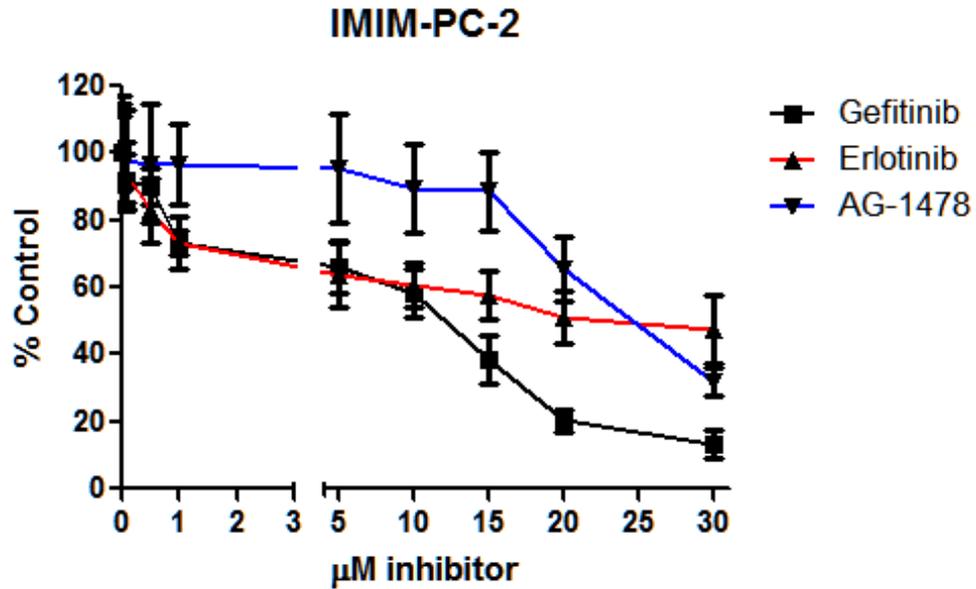


Figura 12: Resultados de los ensayos MTT en las líneas celulares de carcinoma de páncreas exocrino IMIM-PC-2 y HS766T al ser tratadas a concentraciones de 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$  de gefitinib, erlotinib y AG-1478. Los datos representan la media  $\pm$ SD, con  $n \geq 3$ .

En la línea celular SW480 se observan resultados similares al ser tratadas con los tres inhibidores llegando a reducir la proliferación celular un 40%. La línea SW620 muestra mayor resistencia a erlotinib que al resto de líneas celulares estudiadas, con una reducción de la viabilidad celular de aproximadamente un 30% mientras que AG-1478 y gefitinib, la reducen aproximadamente un 50% (Figura 13).

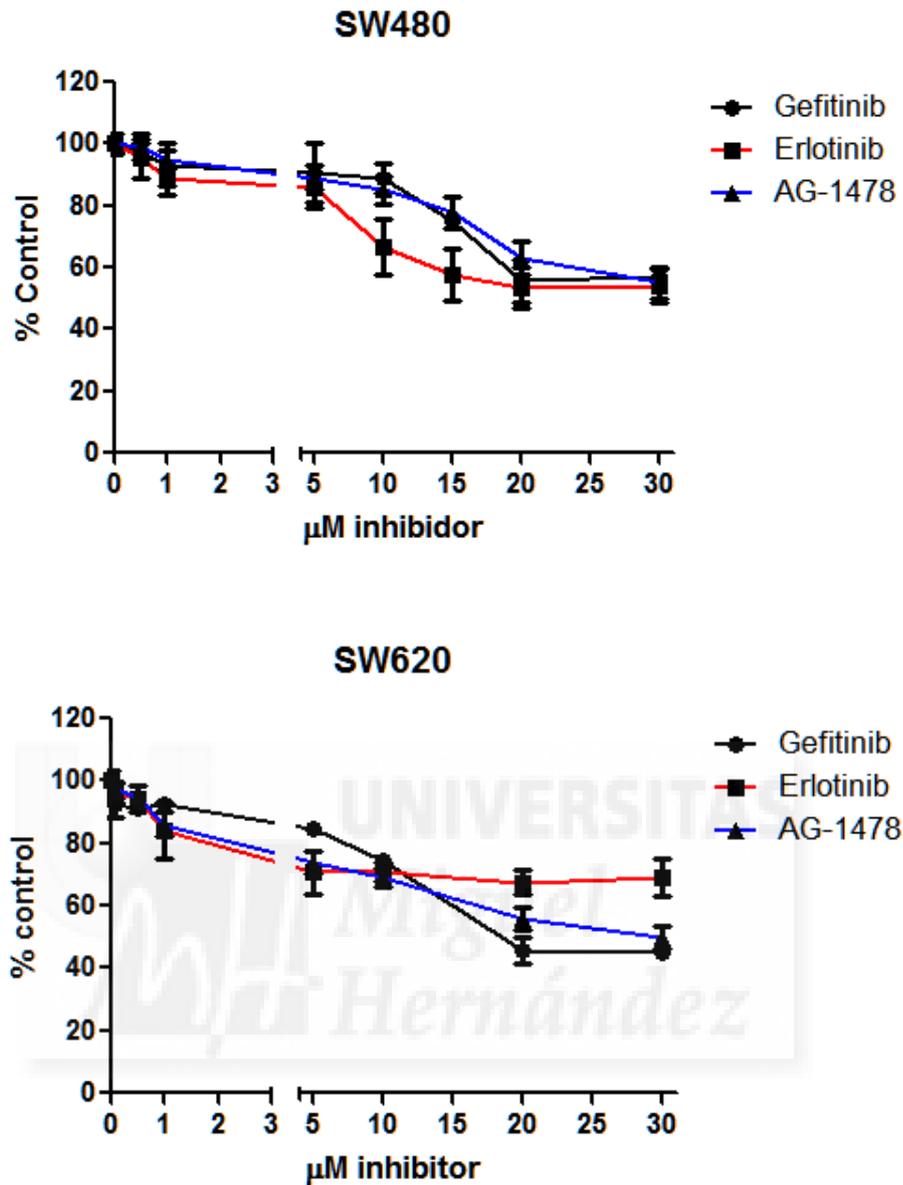


Figura 13: Resultados de los ensayos MTT en las líneas celulares de carcinoma de colon SW480 y SW620 al ser tratadas a concentraciones de 0,5 μM, 1 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM y 30 μM de gefitinib, erlotinib y AG-1478. Los datos representan la media ±SD, con n ≥ 3.

A continuación, se testaron los péptidos inhibidores de la dimerización en ensayos de ciclo celular para analizar el efecto que éstos presentan sobre la progresión de dicho ciclo. En este ensayo se utilizaron la línea celular SW620 de carcinoma de colon y la línea celular RWP-1 de carcinoma de páncreas que muestra una alta expresión de receptores ErbB, especialmente EGFR. El ensayo se realizó con los cinco péptidos a una concentración de 25 μM.

En los resultados (Figura 14) se puede apreciar que en la línea celular RWP-1 el péptido 9 provoca un aumento de la fase G1 mientras que se ven reducidas la fase S y G2/M. Por otro lado, los péptidos 11 y 12 muestran un ligero aumento de la G2/M y una reducción de la fase S.

En cuanto a la línea celular SW620, se puede observar que los péptido 8 y 10 aumentan la fase G1 mientras que, los péptidos 9 y 12 aumentan el porcentaje de células en fase Sub-G1, es decir, el porcentaje de células muertas, por lo que pueden presentar un ligero efecto citotóxico en esta línea celular. El péptido 9 también causa un ligero aumento de la fase G1. Además, todos ellos inducen un descenso en la fase G2/M en mayor o menor medida. En el caso del péptido 12, sin embargo, se observa también una reducción de la fase G1.

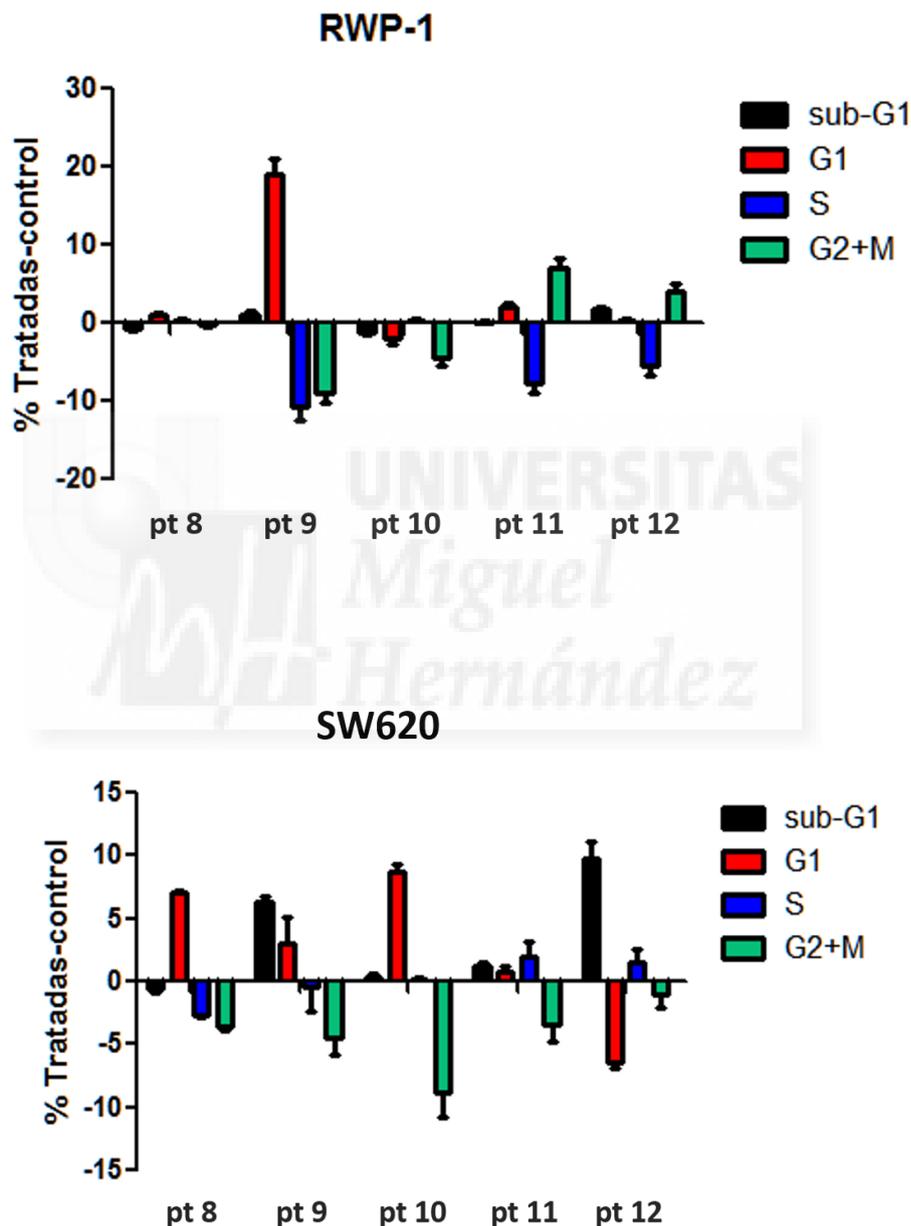


Figura 14: Efecto de los péptidos pt8-12 a la concentración de 25  $\mu$ M sobre el ciclo celular en las líneas celulares RWP-1 de carcinoma de páncreas exocrino y SW620 de carcinoma de colon. Los datos representan la media  $\pm$ SD, con  $n \geq 3$ .

Para comparar el efecto observado por los péptidos sobre la distribución de las distintas fases del ciclo celular con los efectos de los inhibidores de la actividad tirosín quinasa de los receptores ErbB, se realizó el ensayo con erlotinib en la línea celular RWP-1 de carcinoma de páncreas. Se utilizaron concentraciones crecientes de erlotinib, 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , y 20  $\mu\text{M}$ . Los resultados (Figura 15) mostraron un efecto citoestático del erlotinib, con un bloqueo del ciclo en la fase G1. A medida que se aumenta la concentración de erlotinib, también aumenta el porcentaje de células que se encuentran en fase G1 mientras que disminuye el porcentaje de células en las fases S y G2/M.

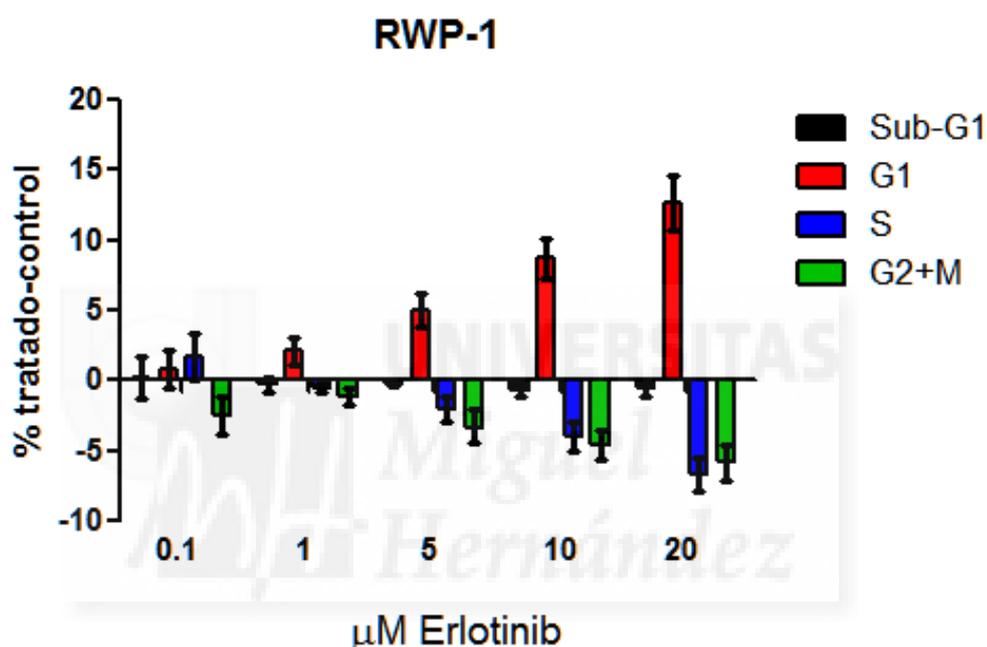


Figura 15: Efecto del erlotinib a concentraciones crecientes sobre el ciclo celular en la línea celular RWP-1 de carcinoma de páncreas exocrino. Los datos representan la media  $\pm$ SD, con  $n \geq 3$ .

### OBJETIVO 3: Proceder a la caracterización inicial de la especificidad de los péptidos.

Una vez demostrado el efecto biológico de los péptidos, se procedió a demostrar la especificidad de los mismos, es decir, a demostrar que su efecto antiproliferativo es debido a que actúan específicamente en los receptores ErbB y no sobre dianas secundarias implicadas en vías de proliferación celular. Con este objetivo se analizaron, mediante el Human Phospho-RTK Array (R&D Systems), los perfiles de fosforilación de receptores tirosín quinasa. En este ensayo se analizaron cuatro muestras: el control negativo, el control positivo en el que las células fueron tratadas con lapatinib (inhibidor de EGFR y ErbB2), y dos tratamientos de las células: con el

péptido 8 y con el péptido 9 (Figura 16A). Fueron elegidos los péptidos 8 y 9 para realizar el ensayo, puesto que corresponden con los inhibidores de los dominios extracelulares de los receptores ErbB1 y ErbB2 respectivamente, sobre los cuales actúa lapatinib.

Los resultados muestran una reducción de los niveles de fosforilación de EGFR respecto al control al ser tratados con el pt8, pt9 y lapatinib. Los niveles de fosforilación del receptor ErbB2 se reducen ligeramente en el tratamiento con el péptido 8 y no se observa fosforilación al tratar las células tanto con el péptido 9 como con lapatinib (Figura 16B). Respecto a los receptores ErbB3 y ErbB4 no se observan resultados apreciables en las muestras tratadas con los péptidos, sin embargo parecen no observarse niveles de fosforilación en estos receptores al tratarse con lapatinib. No obstante, debido a la baja señal es difícil determinarlo.

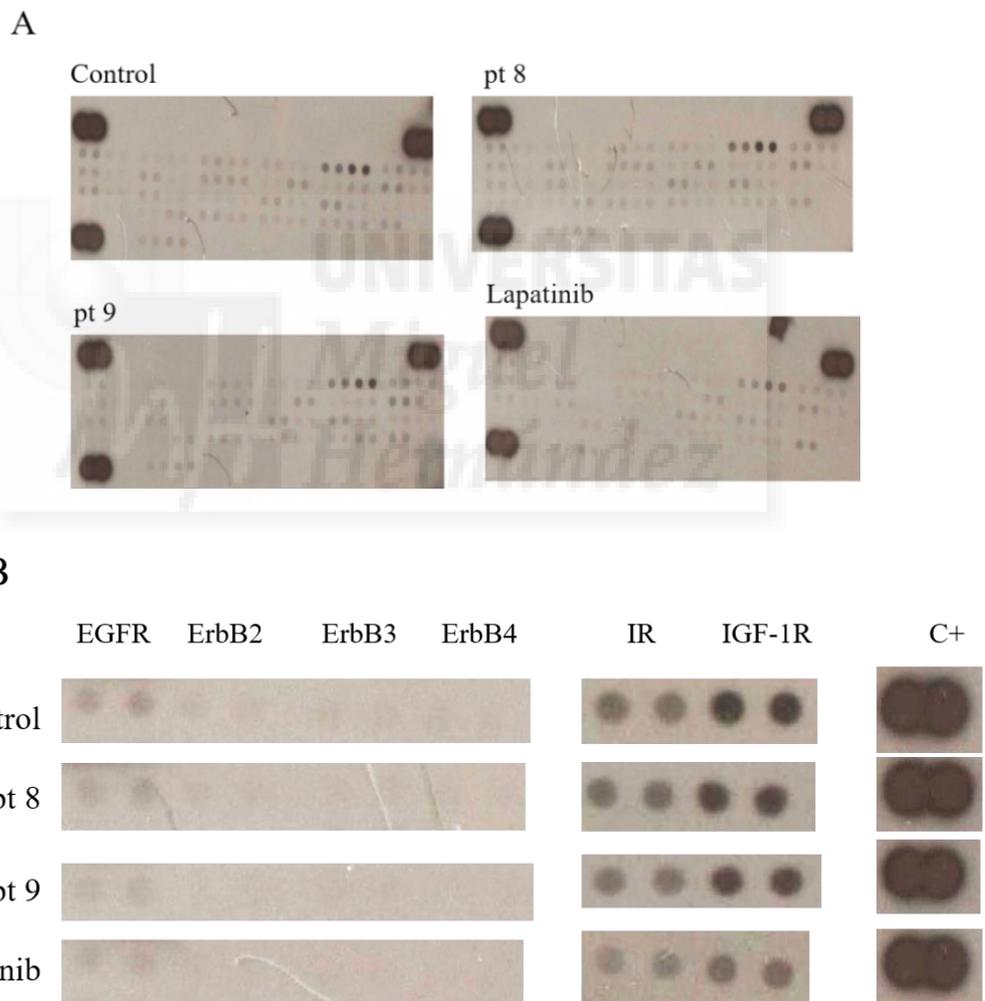


Figura 16: (A) Resultados del Human Phospho-RTK Array de la muestra control, muestra tratada con el pt 8, muestra tratada con el pt 9 y muestra tratada con lapatinib. (B) Ampliación de los resultados obtenidos mostrándose los receptores ErbB, el receptor de insulina, el IGF-1R y los controles positivos de las cuatro muestras.

## 5. DISCUSIÓN.

---

En este estudio se han generado cinco péptidos mediante técnicas de modelado molecular (figuras 5-9), con el objetivo de inhibir la dimerización de los receptores ErbB. Los efectos biológicos de los péptidos han sido demostrados mediante ensayos de proliferación celular (Figuras 10 y 11) y ensayos de análisis de la distribución de las fases del ciclo celular (Figura 14). La especificidad de los péptidos, se ha determinado mediante "fosfoarrays" de proteínas (Figura 16).

Los estudios de proliferación celular han demostrado la capacidad antiproliferativa que presentan los péptidos en distintas líneas celulares de carcinoma de páncreas exocrino y carcinoma de colon, mostrando mayor efecto inhibitorio en estas últimas. Sería conveniente testar el efecto de los péptidos pt 8 y pt10 en las líneas de carcinoma de páncreas exocrino ya que, por motivos de disponibilidad de los péptidos en el laboratorio, no se pudo realizar dicho análisis.

Estos efectos son comparables con los obtenidos a partir de los ensayos realizados con los inhibidores de la actividad tirosín quinasa, tales como erlotinib, gefitinib y AG-1478 (Figuras 12 y 13). Estos inhibidores presentan un efecto antiproliferativo, semejante a los resultados obtenidos mediante el tratamiento con los péptidos en las líneas celulares de carcinoma de colon. En las líneas celulares de carcinoma de páncreas exocrino, los TKis muestran mayor efecto inhibitorio que los péptidos inhibidores de la dimerización, esto puede deberse a que estén actuando además, sobre otras proteínas quinasas implicadas en otras vías de señalización celular.

Estudios previamente descritos en la literatura, muestran que los inhibidores de la actividad tirosín quinasa reducen significativamente la viabilidad celular, además de inducir moderadamente la apoptosis<sup>27, 28</sup>. Otros investigadores han demostrado previamente los efectos inhibitorios del erlotinib<sup>29-31</sup> y lapatinib<sup>32</sup> sobre la proliferación celular en diversos tipos de tumores, con distinta expresión de los receptores ErbB.

Respecto a la distribución de las distintas fases del ciclo celular, se puede destacar el aumento en la fase G1 inducido por el péptido 9 en la línea celular RWP-1, así como el aumento en la fase G1 inducido por los péptidos 8 y 10 en la línea celular SW620 y el aumento en la fase Sub-G1 inducido por los péptidos 9 y 12 en esta última línea celular. Sin embargo, los resultados obtenidos no nos permiten discernir si los péptidos inducen un bloqueo en alguna de las fases del ciclo celular o si, por el contrario, el ciclo se ha enlentecido en alguna de ellas. Para resolver esta cuestión, deberíamos de realizar ensayos de ciclo celular más prolongados, no sólo a 24 horas, sino también a 48 y 72 horas.

Hemos demostrado que el aumento en la fase G1 inducido por algunos péptidos es comparable al efecto inducido por algunos inhibidores de la actividad tirosín quinasa de los receptores ErbB como erlotinib (Figura 15). En dicho ensayo se ha observado que dosis crecientes de erlotinib, inducen un aumento del porcentaje de células en la fase G1 y una disminución del porcentaje de células en las fases S y G2/M.

Por otro lado, los efectos producidos por algunos péptidos son similares a los obtenidos en respuesta a los TKis. Los resultados mostrados mediante ensayos de ciclo celular mediante el tratamiento con erlotinib en carcinoma de páncreas, se asemejan a los obtenidos por otros autores, mostrando que dicho fármaco produce un bloqueo en fase G1 acompañado de un retraso en la fase S y fase G2/M<sup>33</sup>.

No obstante, se observan resultados diversos con los distintos péptidos. El aumento de la fase Sub-G1 causado por los péptidos pt 9 y pt 12 es observado por algunos TKis, tal y como se ha observado en otros estudios en los que el tratamiento con lapatinib aumenta la frecuencia de células en fase Sub-G1 del ciclo celular<sup>29</sup>.

En cuanto a la especificidad de los péptidos, nuestros resultados mediante “fosfoarrays” de proteínas, parecen mostrar que inhiben de manera específica la fosforilación que se produce en esta familia de receptores tras la dimerización (Figura 16). Los resultados obtenidos parecen indicar que tanto el péptido 8 como el péptido 9 reducen los niveles de fosforilación de EGFR. Aunque el péptido 9 no está diseñado para competir por el receptor EGFR, podría verse reducida la fosforilación del heterodímero entre EGFR y ErbB2. En principio, podemos pensar que tal vez ocurra algo similar con los receptores ErbB3 y ErbB4, sin embargo, debido a la escasa resolución obtenida, no es posible determinarlo. Además de esto, no se observa reducción de la fosforilación en otras proteínas analizadas mediante el “fosfoarray”, a diferencia de lo que sucede con el lapatinib, cuyos resultados muestran que, además de reducir los niveles de fosforilación de los receptores ErbB, también reduce la fosforilación de otros blancos como son el receptor IGF-1R y el receptor de insulina.

Todo ello, hace pensar que los efectos biológicos obtenidos, probablemente se deben a la especificidad que presentan los péptidos por los receptores ErbB, reduciendo los niveles de fosforilación mediados por la actividad tirosín quinasa activada tras la dimerización de los receptores.

Datos de la literatura afirman que el lapatinib suprime de manera eficaz la fosforilación de los receptores EGFR y ErbB2<sup>34</sup>, en consonancia con los resultados que hemos obtenido mediante el "fosfoarray" de proteínas. Además, otros estudios han demostrado los efectos que, sobre la

fosforilación de los receptores, muestran también los anticuerpos monoclonales como cetuximab y panitumumab<sup>35</sup>.

El análisis de nuestros resultados, demuestra el efecto inhibitorio de los péptidos sobre la proliferación celular, reduciendo la viabilidad de las células al ser tratadas con los mismos. Los resultados han mostrado distinta respuesta frente a los cinco péptidos en las distintas líneas celulares, esto puede deberse a una pérdida de actividad o especificidad de alguno de ellos tras el tiempo. También puede ser debido a la expresión diferencial de los receptores de esta familia entre las distintas líneas celulares utilizadas, así como a la existencia de mutaciones en algunas de las proteínas efectoras de las vías de transducción de señales activadas por estos receptores, como pueden ser mutaciones en KRAS, BRAF o en la vía de la PI3K. Esto podría reducir la eficacia de los péptidos en los distintos tipos de tumores.

Por todos los datos previamente expuestos, los péptidos estudiados podrían constituir una terapia complementaria a los fármacos antineoplásicos, ya que los péptidos inhiben específicamente la fosforilación de los receptores ErbB, con el subsecuente efecto antiproliferativo.



## 6. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS.

---

El trabajo se ha basado en la generación de 5 péptidos diseñados específicamente mediante la utilización de técnicas de modelado molecular, para interferir con los dominios de dimerización de los receptores ErbB. Los efectos biológicos de los péptidos han sido testados y comparados con los efectos causados por los inhibidores de la actividad tirosín quinasa de los receptores, así como su capacidad de inhibir específicamente la formación de homodímeros y heterodímeros entre ellos. Finalmente, las conclusiones que se pueden extraer en este trabajo son:

1. Los péptidos presentan efectos antiproliferativos en distintas líneas de adenocarcinoma de colon y carcinoma de páncreas exocrino, siendo el péptido 12 el que mayor efecto inhibitorio muestra.

2. Los inhibidores de la actividad tirosín quinasa (TKis) tales como erlotinib, gefitinib y AG-1478 presentan igualmente efectos antiproliferativos en las mismas líneas celulares, siendo más efectivos en carcinoma de páncreas exocrino que en adenocarcinoma de colon.

3. El péptido 9 tiene efecto citoestático, aumentando el porcentaje de células en la fase G1 del ciclo celular en la línea RWP-1 de carcinoma de páncreas exocrino, así como también lo hacen en menor medida los péptidos 8, 9 y 10 en la línea celular SW620. Además, algunos de ellos inducen una reducción en las fases S y G2/M del ciclo celular.

4. Los péptidos 9 y 12 pueden mostrar efectos citotóxicos sobre el ciclo celular aumentando el porcentaje de células en la fase Sub-G1 indicativa de muerte celular, en la línea celular SW620 de carcinoma de colon.

5. El erlotinib muestra un efecto citoestático correlacionado con el aumento de la dosis, que se asemeja al observado con los péptidos 8-10, produciendo un aumento en el porcentaje de células en la fase G1 a la vez que se reducen las fases S y G2/M.

6. Los péptidos reducen los niveles de fosforilación de los receptores impidiendo por lo tanto de forma específica, la dimerización entre los monómeros.

A pesar de que el “fosfoarray” parece indicar que los péptidos actúan específicamente sobre los receptores ErbB, se deberían realizar estudios más detallados y concluyentes sobre la especificidad de estos péptidos para corroborar los resultados obtenidos. Puesto que no fueron testados los cinco péptidos, el laboratorio tiene pendiente realizar nuevos "fosfoarrays" donde

fueran testados los péptidos restantes (pt 10-12) que todavía no han sido evaluados en estos experimentos, con el fin de corroborar que, efectivamente, todos los péptidos sintetizados, inhiben de manera específica la dimerización de los receptores. La especificidad podría igualmente estudiarse mediante otros ensayos tales como ensayos de Western blot o de co-inmunoprecipitación.

El estudio podría ampliarse a un mayor número de líneas celulares de ambos tipos de tumores, así como a distintas líneas de otros tipos de tumores, que presenten expresión diferencial de los receptores, para estudiar con más detalle el efecto biológico causado por los mismos.

Por otro lado, el efecto biológico observado en nuestro estudio, podría incrementarse a partir de la optimización de los péptidos, es decir, sería posible modificar las secuencias de los aminoácidos, de tal manera que aumente la afinidad del péptido sobre el receptor.

Algunos péptidos han mostrado un aumento del porcentaje de células en la fase Sub-G1 en ensayos de ciclo celular, por lo que sería conveniente estudiar con mayor profundidad si los péptidos presentan algún efecto tóxico. Otros péptidos, sin embargo, no han mostrado resultados significativos. Debido a la disparidad de resultados, sería interesante estudiar a qué son debidas tales diferencias.

En última instancia, los péptidos deberían poder ser utilizados como herramienta terapéutica complementaria en el tratamiento contra el cáncer. Los péptidos únicamente han sido testados *in vitro*, de modo que en un futuro el estudio debería ampliarse a modelos animales. Para ello, podrían vehiculizarse los péptidos o encapsular en liposomas aquellos menos solubles como el pt 8 y pt 10. Además sería interesante llevar a cabo estudios para analizar el seguimiento de los péptidos hasta el blanco deseado, la efectividad que éstos muestran y los posibles efectos tóxicos que puedan ocasionar.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

---

1. Pecorino, L., *Molecular biology of cancer : mechanisms, targets, and therapeutics*. Third edition. ed.; p xviii, 342 pages.
2. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D.; Bray, F., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **2015**, 136, E359-86.
3. Daga, A.; Ansari, A.; Patel, S.; Mirza, S.; Rawal, R.; Umrana, V., Current drugs and drug targets in non-small cell lung cancer: limitations and opportunities. *Asian Pac J Cancer Prev* **2015**, 16, 4147-56.
4. Wang, Y.; Huang, H. Y.; Yang, L.; Zhang, Z.; Ji, H., Cetuximab-modified mesoporous silica nano-medicine specifically targets EGFR-mutant lung cancer and overcomes drug resistance. *Sci Rep* **2016**, 6, 25468.
5. El Maassarani, M.; Barbarin, A.; Fromont, G.; Kaissi, O.; Lebbe, M.; Vannier, B.; Moussa, A.; Seite, P., Integrated and Functional Genomics Analysis Validates the Relevance of the Nuclear Variant ErbB380kDa in Prostate Cancer Progression. *PLoS One* **2016**, 11, e0155950.
6. Roskoski, R., Jr., The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res* **2014**, 79, 34-74.
7. Zhang, H.; Berezov, A.; Wang, Q.; Zhang, G.; Drebin, J.; Murali, R.; Greene, M. I., ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest* **2007**, 117, 2051-8.
8. Brand, T. M.; Iida, M.; Luthar, N.; Wleklinski, M. J.; Starr, M. M.; Wheeler, D. L., Mapping C-terminal transactivation domains of the nuclear HER family receptor tyrosine kinase HER3. *PLoS One* **2013**, 8, e71518.
9. Sacco, A. G.; Worden, F. P., Molecularly targeted therapy for the treatment of head and neck cancer: a review of the ErbB family inhibitors. *Oncotargets Ther* **2016**, 9, 1927-43.
10. Stec, W. J.; Rosiak, K.; Siejka, P.; Peciak, J.; Popeda, M.; Banaszczyk, M.; Pawlowska, R.; Treda, C.; Hulas-Bigoszewska, K.; Piaskowski, S.; Stoczynska-Fidelus, E.; Rieske, P., Cell line with endogenous EGFRvIII expression is a suitable model for research and drug development purposes. *Oncotarget* **2016**.
11. Lin, L. I.; Chen, L. L.; Wang, Y.; Meng, X. Y.; Liang, C.; Zhou, F. X., Efficacy of cetuximab-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer according to RAS and BRAF mutation subgroups: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol* **2016**, 4, 1017-1024.
12. Nagaoka, T.; Kitaura, K.; Miyata, Y.; Kumagai, K.; Kaneda, G.; Kanazawa, H.; Suzuki, S.; Hamada, Y.; Suzuki, R., Downregulation of epidermal growth factor receptor family receptors and ligands in a mutant K-ras group of patients with colorectal cancer. *Mol Med Rep* **2016**, 13, 3514-20.

13. Arteaga, C. L.; Engelman, J. A., ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2014**, *25*, 282-303.
14. Normanno, N.; De Luca, A.; Bianco, C.; Strizzi, L.; Mancino, M.; Maiello, M. R.; Carotenuto, A.; De Feo, G.; Caponigro, F.; Salomon, D. S., Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* **2006**, *366*, 2-16.
15. Moulder, S. L.; Yakes, F. M.; Muthuswamy, S. K.; Bianco, R.; Simpson, J. F.; Arteaga, C. L., Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* **2001**, *61*, 8887-95.
16. Wang, D. D.; Ma, L.; Wong, M. P.; Lee, V. H.; Yan, H., Contribution of EGFR and ErbB-3 Heterodimerization to the EGFR Mutation-Induced Gefitinib- and Erlotinib-Resistance in Non-Small-Cell Lung Carcinoma Treatments. *PLoS One* **2015**, *10*, e0128360.
17. Harle, A.; Salleron, J.; Perkins, G.; Pilati, C.; Blons, H.; Laurent-Puig, P.; Merlin, J. L., Expression of pEGFR and pAKT as response-predictive biomarkers for RAS wild-type patients to anti-EGFR monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancers. *Br J Cancer* **2015**, *113*, 680-5.
18. Abdelgawad, M. A.; Bakr, R. B.; Alkhoja, O. A.; Mohamed, W. R., Design, synthesis and antitumor activity of novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives as EGFR-TK inhibitors. *Bioorg Chem* **2016**, *66*, 88-96.
19. Han, J. Y.; Lee, K. H.; Kim, S. W.; Min, Y. J.; Cho, E.; Lee, Y.; Lee, S. H.; Kim, H. Y.; Lee, G. K.; Nam, B. H.; Han, H.; Jung, J.; Lee, J. S., A Phase II Study of Poziotinib in Patients with Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Mutant Lung Adenocarcinoma who Have Acquired Resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Res Treat* **2016**.
20. Veluchamy, J. P.; Spanholtz, J.; Tordoir, M.; Thijssen, V. L.; Heideman, D. A.; Verheul, H. M.; de Gruijl, T. D.; van der Vliet, H. J., Combination of NK Cells and Cetuximab to Enhance Anti-Tumor Responses in RAS Mutant Metastatic Colorectal Cancer. *PLoS One* **2016**, *11*, e0157830.
21. Saito, M.; Kawakami, Y.; Yamashita, K.; Nasuno, H.; Ishimine, Y. U.; Fukuda, K.; Isshiki, H.; Suzuki, R.; Arimura, Y.; Shinomura, Y., HER2-positive gastric cancer identified by serum HER2: A case report. *Oncol Lett* **2016**, *11*, 3575-3578.
22. Le Clorennec, C.; Lazrek, Y.; Dubreuil, O.; Larbouret, C.; Poul, M. A.; Mondon, P.; Melino, G.; Pelegrin, A.; Chardes, T., The anti-HER3 (ErbB3) therapeutic antibody 9F7-F11 induces HER3 ubiquitination and degradation in tumors through JNK1/2- dependent ITCH/AIP4 activation. *Oncotarget* **2016**.
23. Zhang, N.; Chang, Y.; Rios, A.; An, Z., HER3/ErbB3, an emerging cancer therapeutic target. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2016**, *48*, 39-48.

24. Zhang, X.; Gureasko, J.; Shen, K.; Cole, P. A.; Kuriyan, J., An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* **2006**, 125, 1137-49.
25. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E., The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **2000**, 28, 235-42.
26. Silhol, M.; Tyagi, M.; Giacca, M.; Lebleu, B.; Vives, E., Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat-derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat. *Eur J Biochem* **2002**, 269, 494-501.
27. Xu, L.; Qi, Y.; Xu, Y.; Lian, J.; Wang, X.; Ning, G.; Wang, W.; Zhu, Y., Co-inhibition of EGFR and IGF1R synergistically impacts therapeutically on adrenocortical carcinoma. *Oncotarget* **2016**.
28. Yao, Y. L.; Shao, J.; Zhang, C.; Wu, J. H.; Zhang, Q. H.; Wang, J. J.; Zhu, W., Proliferation of colorectal cancer is promoted by two signaling transduction expression patterns: ErbB2/ErbB3/AKT and MET/ErbB3/MAPK. *PLoS One* **2013**, 8, e78086.
29. Shiota, M.; Bishop, J. L.; Takeuchi, A.; Nip, K. M.; Cordonnier, T.; Beraldi, E.; Kuruma, H.; Gleave, M. E.; Zoubeidi, A., Inhibition of the HER2-YB1-AR axis with Lapatinib synergistically enhances Enzalutamide anti-tumor efficacy in castration resistant prostate cancer. *Oncotarget* **2015**, 6, 9086-98.
30. Shingu, T.; Holmes, L.; Henry, V.; Wang, Q.; Latha, K.; Gururaj, A. E.; Gibson, L. A.; Doucette, T.; Lang, F. F.; Rao, G.; Yuan, L.; Sulman, E. P.; Farrell, N. P.; Priebe, W.; Hess, K. R.; Wang, Y. A.; Hu, J.; Bogler, O., Suppression of RAF/MEK or PI3K synergizes cytotoxicity of receptor tyrosine kinase inhibitors in glioma tumor-initiating cells. *J Transl Med* **2016**, 14, 46.
31. Nishimura, T.; Nakamura, K.; Yamashita, S.; Ikeda, S.; Kigure, K.; Minegishi, T., Effect of the molecular targeted drug, erlotinib, against endometrial cancer expressing high levels of epidermal growth factor receptor. *BMC Cancer* **2015**, 15, 957.
32. Gschwantler-Kaulich, D.; Grunt, T. W.; Muhr, D.; Wagner, R.; Kolbl, H.; Singer, C. F., HER Specific TKIs Exert Their Antineoplastic Effects on Breast Cancer Cell Lines through the Involvement of STAT5 and JNK. *PLoS One* **2016**, 11, e0146311.
33. Ubezio, P.; Falcetta, F.; Carrassa, L.; Lupi, M., Integrated experimental and simulation study of the response to sequential treatment with erlotinib and gemcitabine in pancreatic cancer. *Oncotarget* **2016**, 7, 15492-506.
34. Li, J.; Cho, Y. Y.; Langfald, A.; Carper, A.; Lubet, R. A.; Grubbs, C. J.; Ericson, M. E.; Bode, A. M., Lapatinib, a preventive/therapeutic agent against mammary cancer, suppresses RTK-mediated signaling through multiple signaling pathways. *Cancer Prev Res (Phila)* **2011**, 4, 1190-7.
35. Kavuri, S. M.; Jain, N.; Galimi, F.; Cottino, F.; Leto, S. M.; Migliardi, G.; Searleman, A. C.; Shen, W.; Monsey, J.; Trusolino, L.; Jacobs, S. A.; Bertotti, A.; Bose, R., HER2 activating mutations are targets for colorectal cancer treatment. *Cancer Discov* **2015**, 5, 832-41.