

**Descubrimiento y evaluación biológica de un sistema pirido[2,3-  
d]pirimidínico como potencial pan-inhibidor para el tratamiento del cáncer de  
pulmón**

**Silvia García Román**

<http://hdl.handle.net/10803/401388>

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

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

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and

## TESIS DOCTORAL

Título Descubrimiento y evaluación biológica de un sistema pirido[2,3-*d*]pirimidínico como potencial pan-inhibidor para el tratamiento del cáncer de pulmón

Realizada por Silvia García Román

en el Centro IQS School of Engineering

y en el Departamento Química Orgánica i Farmacéutica

Dirigida por Dr. José I. Borrell Bilbao y Dr. Rafael Rosell Costa



*A mis padres y hermana,  
este trabajo es también vuestro.*



*“Duda siempre de ti mismo, hasta que los datos no dejen lugar a dudas”*

Louis Pasteur

*“No entiendes realmente algo a menos que seas capaz de explicárselo a tu abuela”*

Albert Einstein



## Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado de manera compartida en el laboratorio de oncología, de Pangaea Oncology y el laboratorio de síntesis del grupo de ingeniería molecular del departamento de química orgánica del instituto químico de Sarriá, bajo la dirección del Dr. Rafael Rosell y el Dr. José Ignacio Borrell, respectivamente, a quienes quiero agradecer la oportunidad de participar en este proyecto.

Agradecer al Dr. Rosell su ayuda y soporte, así como las múltiples oportunidades científicas que me ha brindado, para formarme y ampliar mis conocimientos. Quiero agradecerle la paciencia y confianza depositadas en mí para la realización de esta tesis. Muchas gracias por la orientación y visión clínica ofrecida en todo momento. Gracias por ser mi mentor.

Al Dr. Borrell por ser el primero en confiar en mí y aceptarme para darle forma a este proyecto. Su dirección y supervisión han sido necesarias para poder llegar hasta aquí. Muchas gracias por acogerme, por sus consejos y por su ayuda.

Agradecer a la Secretaria de Universidades e Investigación del Departamento de Empresa y Conocimiento de la Generalitat de Catalunya por el soporte económico con la concesión de la beca de Doctorado Industrial.

Al servicio de espectroscopia del departamento de síntesis de IQS su ayuda y colaboración en todo momento.

Y después de los agradecimientos más formales, empieza la parte más leída de todas las tesis; los agradecimientos a todas aquellas personas que, aunque su nombre no aparece en la portada, su aportación ha sido tan necesaria e imprescindible que sin ellas no habría sido capaz de finalizarla. Seguro que me dejaré a alguien y de ser así que no se dé por no agradecido, prometo esforzarme al máximo.

M'agradaria començar pels integrants del grup de síntesis de IQS quan jo vaig arribar. Tot i que tan sols vam compartir l'inici de la tesi, y alguna que altra estona d'esbarjo, tinc un molt bon record de tots vosaltres. Maia, Gemma, Albert, Gonzalo, Maria y Marta moltíssimes gràcies per acollir-me y fer-me un forat amb vosaltres. En aquest punt el Rai es mereix una menció especial. Moltes gràcies per ensenyar-me quan vaig arribar, per ajudar-me quan ho he necessitat i per facilitar-me la vida si depenia de tu, moltes gràcies de debò.

Muchas gracias a las personas que forman parte de Pangaea Oncology por la ayuda prestada en distintos momentos del proyecto.

¡Y ahora sí que sí, ahora os toca a vosotros! A vosotros con los que he reído, me he enfadado, me he indignado y también, algún que otro día, me ha caído alguna lágrima. Pero sobre todo con los que he disfrutado como una niña en el desarrollo de este proyecto de tesis, mis "compis" del laboratorio de oncología. No diremos que ha sido una época fácil, ha habido muchos cambios que nos han generado algunos quebraderos de cabeza, pero que entre todos con mayor o menor acierto hemos ido superando.



Las niñas de AP, Erika, Sonia, Cristina T. y Zaira. Aunque nuestros trabajos muy pocas veces han estado interrelacionados no nos ha hecho falta para compartir buenos ratos y alguna que otra confidencia. Gracias por vuestra ayuda y explicaciones sobre microdissección y demás técnicas patológicas, siempre habéis estado dispuestas a explicármelas hasta que las entendiera. Gracias por las risas compartidas y, ya de antemano, gracias por las que están por llegar.

El “despacho de la luz”. Hasta mi cambio de despacho estaba formado íntegramente por chicas, pero entonces cedí mi sitio a un chico para que pusiera orden, Sergio. Sin duda eres uno de los que mejor me entiende, así que te quiero agradecer tu comprensión y soporte moral sobre todo en esta recta final, porque depositar en épocas similares ha hecho que compartiéramos nervios, y cuando son compartidos parece que se llevan mejor. Ana Perez, Mónica Garzón y Cristina Aguado, tres componentes del “despacho de la luz”. No se puede ser un grupo más distinto que ese, pero cada una de vosotras ha hecho que mi tiempo en él fuera genial. Gracias por los momentos de locura máxima especialmente los viernes a las 15.30. Y a ti Cristina, no olvides que a pesar de lo que digan por televisión, el simple hecho de pensar en hacer deporte, ¡no produce una disminución del colesterol!

¡Mi equipo de comida, el bueno, el de las 14:00! Empezamos siendo solo 2, Juan Carlos y yo, pero ahora hemos aumentado hasta 6. Bea y María José gracias por las reflexiones alrededor de un buen y succulento plato de comida.

L'equip de cultiu cel·lular, Jordi i Carles Codony, moltíssimes gràcies per l'ajuda, les explicacions biològiques infinites, els experiments compartits... però sobretot pels bons moments a la campana de cultius on competim per qui prepara més plaques o té més T-75. Moltes gràcies!

Thanks Niki. Although now you are more time in the clinic than in the lab, at the beginning of the project you were my partner in the office. So that thank you for the shared moments.

Jordi Bertrán, Ana Giménez y Clarita, ¡vosotros sí que sois el laboratorio! Estáis desde que llegué y siempre habéis estado a mi lado, en lo profesional y personal, así que con vosotros sobran las palabras. Gracias por haber estado, estar ahora y estar en un futuro. Jordi, moltes gràcies per tantes i tantes hores a cultius i perquè tot i ser una “cabezota” tu sempre m’has aguantat i ajudat de manera incondicional.

Y de los de siempre a tres nuevas incorporaciones, Raquel, Lidia y Ari. Aunque hace un año escaso que nos conocemos os he cogido un cariño enorme. Raquel, gracias por tu sonrisa y positividad constantes, son contagiosas y haces que el día se vea de otra manera. Ari, tu i jo som les dues persones amb menys filtre del món, això de quedar bé no va amb nosaltres! Gràcies per entendre'm. Lidia gracias por tus palabras de ánimo y cariño constantes, y ¡sobre todo gracias porque a tu lado los martes son menos martes!

Y me faltan dos; Núria y Miguel Ángel. Con vosotros tengo un problema, tengo tanto que agradecerlos que no sé cómo hacerlo.

Núria, la meva “flor” entre les flors. Tot i que en el desenvolupament pròpiament dit de la tesi no hi has estat implicada de manera directa si que ho has estat amb mi. Gràcies per fer-me costat, per protegir-me i fer-me tenir seny quan no en tenia. Gràcies per no decaure mai en

l'intent de trobar-me un noi català, ben plantat, que fes maratons i fos del Barça! Gracies per tot però sobre tot per la teva amistat.

Miguel Ángel tengo tanto que agradecerte que necesitaría varias tesis como esta para hacerlo como se merece, sin duda tu nombre debería estar en la portada, incluso, delante del mío. Gracias por ayudarme y por exigirme, gracias por enseñarme y escuchar mis dudas, gracias por apoyarme y confiar en mí, gracias por orientarme y guiarme... Gracias por TODO en todo lo amplio de la palabra, es un verdadero placer poder trabajar contigo. Así que simplemente GRACIAS una y mil veces.

También agradecer al equipo clínico de IOR (instituto oncológico Rosell) que, aunque no hemos trabajado de manera directa, siempre que los he necesitado han estado dispuestos a ayudarme. De manera especial, quiero agradecerle a Daniela sus explicaciones y visión clínica de la que yo carezco. Muchas gracias.

Ester, Pau y Andreu, sens dubte el millor record que guardo de la UB, treballar amb vosaltres significava riure sense parar. Vosaltres sou els que em veu animar a iniciar tot això y vostre és també el resultat.

No puedo, ni quiero, olvidarme de mi "compis" y aun mejores amigos de entreno, sin vosotros nada sería igual. Gracias por arrancarme una sonrisa por muy malo que hubiera sido el día y porque con vosotros todas las penas se pasan, sin duda sois el mejor remedio para cualquier problema. Gracias por aguantarme y animarme siempre, y sobre todo por confiar en mí cuando ni yo misma lo hago, sois insustituibles no se me ocurren mejores compañeros de batallas que vosotros. Gracias Laura, Gavi, Sergio, Enric, Viki y Alex, ¡y vamos que ya lo tenemos!

Para ir terminando quiero agradecer a mi familia su apoyo y soporte en todo momento. Moisés y Narciso gracias por despertar en mí el interés científico y por hacer que me encantara la ciencia cuando yo decía que no servía para nada, gracias por eso y por mucho más.

Y finalmente, no puedo acabar de otra manera que no sea con mis padres y hermana. Gracias porque todo esto, todo lo que tengo y todo lo que soy os lo debo a vosotros, sin vuestra confianza inquebrantable nada sería igual. Simplemente, GRACIAS.



Abreviaturas	
<i>ABL</i>	Proto-oncogén ABL
<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>AKT</i>	AKT serina/treonina quinasa
<i>ALK</i>	Receptor tirosina quinasa de limfoma anaplásico
Anal	Análisis
<i>ARN</i>	Ácido ribonucleico
<i>ATP</i>	Adenosina trifosfato
<i>AXL</i>	Receptor tirosina quinasa AXL
<i>BCR</i>	Proteína activadora de BCR, RhoGEF y GTPasa
<i>BID</i>	Dos veces al día
<i>BIM</i>	BCL2 como 11
<i>BRAF</i>	Proto-oncogén B-Raf, serina/treonina quinasa
<i>BSA</i>	Suero de albúmina bovina
<i>BTK</i>	Tirosina quinasa Bruton
<sup>13</sup> C-NMR	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
calcd	Calculada
<i>CCD6</i>	Dominio cola-cola que contiene la proteína 6
<i>CD74</i>	Molécula CD74
<i>CDCl<sub>3</sub></i>	Cloroformo deuterado
cADN	ADN complementario
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico
CI	Índice de combinación
CPNM	Carcinoma pulmonar no microcítico
CPM	Carcinoma pulmonar microcítico
<i>CSF1-R</i>	Receptor del factor estimulante de la formación de colonias 1
<i>DDR</i>	Receptor de dominio discoidina
dil	Diluyente
DMEM	Medio de cultivo de <i>Eagle</i> modificado por <i>Dulbecco</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetil sulfóxido deuterado
dp	Punto de descomposición
DS	Dominio discoidina
DTT	1,4-Ditiotreitol
ECL	Potenciador de la quimioluminiscencia
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEUU	Estados Unidos
<i>EGFR</i>	Receptor del factor de crecimiento epidermal
<i>EML4</i>	Microtúbulo equinodermo asociado a la proteína tipo 4
EMT	Transición eptitelial-mesenquimal

<i>EPHA</i>	Receptor EPH tipo A
<i>EPHB</i>	Receptor EPH tipo B
<i>ERBB</i>	Receptor tirosina quinasa erb-b
<i>ERK</i>	Quinasa reguladora de la señal extracelular
FACS	Separación de células activadas por fluorescencia
FBS	Suero fetal bovino
<i>FGFR</i>	Receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos
FI	Fracción de inhibidor
<i>FLT</i>	Tirosina quinasa relativa a fms
GEM	Grupo de Ingeniería Molecular
GI <sub>50</sub>	Concentración que inhibe el crecimiento celular el 50%
GSH	Glutación (tripéptido de cisteína, glutamato y glicina)
GST	Glutación-S-Transferasa
<sup>1</sup> H-NMR	Resonancia magnética nuclear de protón-1
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico
<i>HER</i>	Receptor tirosina quinasa erb-b
<i>HGFR</i>	Receptor del factor de crecimiento hepático
HPBCD	Hidroxi Propil-Beta-Ciclodextrina
<i>HRAS</i>	Proto-oncogén <i>HRAS</i> , GTPasa
HRMS	Espectroscopia de masas de alta resolución
IC <sub>50</sub>	Concentración de inhibición del 50% del crecimiento celular
<i>IGFR</i>	Receptor del factor de crecimiento de insulina
ICR	Instituto de investigación del cáncer
IQS	Instituto Químico de Sarriá
IR	Infrarrojo
ITQ	Inhibidor de tirosina quinasa
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>JAK</i>	Quinasa Janus
<i>KIF5B</i>	Miembro de la familia quinesina 5B
<i>KIT</i>	Proto-oncogén KIT receptor tirosina quinasa
<i>KLC1</i>	Cadena ligera quinesina 1
<i>KRAS</i>	Proto-oncogén <i>KRAS</i>
<i>LYN</i>	Proto-oncogén LYN de la familia tirosina quinasa Src
[M] <sup>+</sup>	Ion molecular
m/z	Masa/Carga
<i>MAPK</i>	Proteína quinasa activadora de mitógeno
max	Máximo
<i>MEK</i>	Proteína quinasa activadora de mitógeno
MHz	Megahercio
<i>MKNK</i>	Proteína quinasa MAP serina/treonina- quinasa-interaccionadora
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mp	Punto de fusión

MS	Espectroscopia de masas de baja resolución
<i>mTOR</i>	Diana de mamífero de rapamicina
MTT	Bromuro de 3-(4,4-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolo
mV	Milivoltios
MW	Microondas
<i>NCOA4</i>	Receptor nuclear coactivador 4
nm	Nanómetros
<i>NPM</i>	Nucleofosmina
<i>NRAS</i>	Oncogén homólogo viral de neuroblastoma RAS
OMS	Organización mundial de la salud
<i>p-</i>	Proteína fosforilada
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>PDGFR</i>	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
pH	Coefficiente que indica el grado de acidez o basicidad de una solución acuosa
Pi	Fosfato inorgánico
<i>PIK3CA</i>	Quinasa de la subunidad catalítica alfa fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3
ppm	Partes por millón
<i>p.o</i>	Vía oral
<i>PTEN</i>	Homólogo de fosfatasa y tensina
<i>RAF</i>	Familia de quinasas <i>RAF</i>
<i>RET</i>	Proto-oncogén <i>RET</i>
<i>RIPK2</i>	Receptor de interacción de quinasas 2 serina/treonina
<i>RON</i>	Receptor estimulante de macrófagos 1
<i>ROS1</i>	Receptor tirosina quinasa, proto-oncogén <i>ROS1</i>
RPMI	Medio de cultivo del instituto Roswell Park Memorial
RTQ	Receptor tirosina quinasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEOM	Sociedad española de oncología medica
<i>SHC</i>	Proteína adaptadora <i>SHC</i>
<i>SLC34A2</i>	Soluto Portador de la familia 34 miembro 2
<i>SOX2</i>	Caja 2 de <i>SRY</i>
<i>SRC</i>	Proto-oncogén <i>SRC</i> , no-receptor tirosina quinasa
<i>STAT</i>	Transductor de señal y activador de la transcripción
<i>STK17A</i>	Quinasa serina/treonina 17a
<i>TACC3</i>	Transformador ácido cola-cola que contiene la proteína 3
TBS	Tampón fosfato salino
TEMED	Tetrametiletildiamina
<i>TFG</i>	Gen TRK-Fusionado
THF	Tetrahidrofurano
<i>TRIM33</i>	Motivo tripartido que contiene 33
TRIS	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

<i>TRKA</i>	Receptor tirosina quinasa neurotófica 1
v/v	Volumen/Volumen
<i>VEGFR</i>	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
<i>wt</i>	<i>Wild type</i>
$\delta$	Desplazamiento químico
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{l}$	Microlitros
$\mu\text{M}$	Micromolar

Algunos términos ingleses, ampliamente utilizados en biología molecular y síntesis química sin clara traducción en castellano, se presentan en cursiva.

## Sumario

El laboratorio de síntesis del IQS posee amplia experiencia en la síntesis de compuestos heterocíclicos con estructura pirido[2,3-*d*]pirimidínica similares a ITQs cuyo uso clínico está ampliamente extendido como ibrutinib. Así pues, se seleccionaron 60 de estos compuestos para ser estudiados frente 24 tirosina-quinazas, de los cuáles en los 16 con mejores resultados se iniciaron sus estudios biológicos *in vitro*.

Tres de estos compuestos resultaron activos con IC<sub>50</sub> inferiores a 5 μM. Sin embargo, la elevada toxicidad selectiva y la sencillez sintética de uno de ellos, propiciaron que el desarrollo posterior tan solo se llevara a cabo con PB1.

PB1 es una molécula orgánica pequeña con una ruta sintética simple que ha presentado una elevada actividad contra la proteína DDR2 purificada en sus formas *wt* y mutada. El compuesto se ha probado posteriormente en un panel de líneas celulares tumorales de diferentes orígenes e histologías en las que mostró una buena actividad antiproliferativa con IC<sub>50</sub>s inferiores a 1 μM frente:

- i. Líneas celulares SCC con mutaciones de DDR2 como la H2286 y la HCC366.
- ii. Líneas celulares tumorales de pulmón SCC con DDR2 *wt* como la H520 y la H1703.
- iii. Algunas líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar con mutaciones de *KRAS* como la A549.
- iv. La línea celular SW48 de adenocarcinoma colorrectal con la mutación puntual G719S del exón 18 de EGFR.

Las dos líneas celulares ensayadas portadoras de la mutación activadora I638F de DDR2 son extremadamente sensibles a PB1, con una IC<sub>50</sub> en el rango nanomolar. El compuesto también muestra una buena actividad contra células con la mutación L239R de DDR2.

Se han generado dos líneas celulares resistentes a dasatinib, un inhibidor de DDR2, derivadas de las líneas celulares H2286 y HCC366. Las células han mostrado IC<sub>50</sub>s para dasatinib superiores a 25 μM, pero permanecen sensibles a PB1, con IC<sub>50</sub>s de 0,6 μM y 5,92 μM, respectivamente.

Finalmente, cuando PB1 se ha ensayado en líneas celulares no tumorales no se ha observado toxicidad a las concentraciones ensayadas (hasta 50 μM) indicando un buen índice terapéutico del compuesto.

Los estudios de *western blot* se han utilizado para estudiar los efectos de la activación en DDR2, ERK y AKT en presencia de PB1 en distintas líneas celulares y elucidar su mecanismo de acción. Los estudios anteriores se han complementado con estudios preliminares *in vivo* para decidir sobre la continuación del desarrollo de PB1.





## Sumari

El laboratori de síntesi del IQS presenta una ampla experiència en la síntesi de compostos heterocíclics amb estructura pirido[2,3-*d*]pirimidínica similars a les de diferents ITQs, l'ús dels quals està ampliament estès com ibrutinib. Es van seleccionar 60 d'aquests compostos per ser estudiats enfront de 24 tirosina-quinases, dels quals en els 16 amb millors resultats es van iniciar els estudis biològics *in vitro*.

Tres d'aquest compostos van resultar actius amb IC<sub>50</sub> inferiors a 5 µM. No obstant, l'elevada toxicitat selectiva i la senzillesa sintètica d'un d'ells, van propiciar que el desenvolupament posterior es realitzés tan sols amb PB1.

PB1 és una molècula orgànica petita amb una ruta sintètica simple que ha mostrat una elevada activitat contra la proteïna DDR2 purificada en les formes *wt* i mutada. El compost s'ha estudiat posteriorment en un ampli panell de línies cel·lulars tumorals de diferents orígens i histologies en les que va presentar una bona activitat antiproliferativa amb IC<sub>50</sub>s inferiors a 1 µM enfront de:

- i. Línies cel·lulars SCC amb mutacions de DDR2 com la H2286 o la HCC366.
- ii. Línies cel·lulars tumorals de pulmó SCC amb DDR2 *wt* com H520 i H1703.
- iii. Algunes línies cel·lulars d'adenocarcinoma pulmonar amb mutacions de *KRAS* com la A549.
- iv. La línia cel·lular SW48 de adenocarcinoma colorrectal amb la mutació puntual G719 del exó 18 de EGFR.

Les dues línies cel·lulars assajades portadores de la mutació activadora I638F de DDR2 són extremadament sensibles a PB1, amb una IC<sub>50</sub> en l'interval nanomolar. El compost també presenta una bona activitat enfront de cèl·lules amb la mutació L239R de DDR2.

S'han generat dues línies cel·lulars resistents a dasatinib, un inhibidor de DDR2, derivades de les línies cel·lulars H2286 i HCC366. Les cèl·lules han presentat IC<sub>50</sub>s per a dasatinib superiors a 25 µM, però es mantenen sensibles a PB1, amb IC<sub>50</sub>s de 0,6 µM i 5,92 µM, respectivament.

Finalment, quan PB1 s'ha estudiat en línies cel·lulars no tumorals no s'ha observat toxicitat a les concentracions assajades (fins a 50 µM) indicant un bon índex terapèutic del compost.

Els estudis de *western blot* s'han utilitzat per estudiar els efectes de l'activació de DDR2, ERK i AKT en presència de PB1 a diferents línies cel·lulars i elucidar el seu mecanisme d'acció. Els estudis anteriors s'han complementat amb estudis preliminars *in vivo* per decidir sobre la continuació del desenvolupament de PB1.



## Summary

The *Laboratori de Síntesi de l'IQS* has developed some highly efficient heterocyclic synthetic procedures for the synthesis of pyrido[2,3-*d*]pyrimidines that are structurally similar to some well stated TKs inhibitors whose clinical use is widely extended such as ibrutinib. 60 of these compounds were selected to be tested in front of 24 tyrosine kinases. The 16 compounds with better results were used to initialize the *in vitro* experiments.

3 of these compounds have IC<sub>50</sub> below 5 μM. However, the selective toxicity and the simple synthetic route of PB1, propitiate that the consequent biological development was only done with it.

PB1 is a small organic molecule with a simple synthesis route that showed a strong inhibitory activity against wt and mutated purified DDR2 protein. The compound was subsequently tested in a panel of tumor cell lines from different origins and histologies. PB1 showed a good antiproliferative activity, with IC<sub>50</sub> below 1 μM against:

- i. SCC cell lines with DDR2 mutations such as H2286 or HCC366.
- ii. SCC lung tumor cell lines wt for DDR2 such as H520 or H1703.
- iii. Some lung adenocarcinoma cell lines with *KRAS* mutations such as A549.
- iv. ADC colorectal cell line, SW48, with the mutation G719S in the exon 18 of EGFR.

Remarkably, the two cell lines tested carrying the I638F DDR2 activating mutation were extremely sensitive to PB1, with an IC<sub>50</sub> in the nanomolar range. The compound also showed a good activity against cells harboring the L239R DDR2 mutation.

We also generated two cells lines resistant to dasatinib derived from the H2286 and HCC366 cell lines. The cells showed IC<sub>50</sub>s for dasatinib over 25 μM, but they remained sensitive to PB1, with IC<sub>50</sub>s of 0.6 μM and 5.92 μM, respectively.

Finally, when PB1 was tested in non-tumoral cell lines, no toxicity was observed at the tested concentrations (up to 50 μM) indicating a good therapeutic index of the compound.

Western blotting was used to study the effects of PB1 in DDR2, ERK and AKT activation in different cell lines and to elucidate its mechanism of action. The previous studies were completed with *in vivo* preliminary studies to decide about the project development.



## Lista de figuras

Figura 1: Las células normales se dividen de forma controlada (A) mientras que las cancerosas desarrollan mutaciones y se dividen de manera incontrolada (B). .....	3
Figura 2: Incidencia de tumores en España en el año 2012 extraída de <sup>3</sup> . .....	4
Figura 3: Incidencia de tumores en España en varones en el año 2012 extraída de <sup>3</sup> . .....	4
Figura 4: Incidencia de tumores en España en mujeres en el año 2012 extraída de <sup>3</sup> . .....	5
Figura 5: Estimación de la mortalidad por tipo de tumor en España en el año 2012 extraída de <sup>3</sup> . .....	5
Figura 6: Tinción con hematoxilina-eosina de un carcinoma microcítico (a) y uno no microcítico (b)). .....	9
Figura 7: Tinción de hematoxilina-eosina de un CPM. ....	9
Figura 8: Incidencia de los subtipos histológicos de CPNM. ....	10
Figura 9: Tinción hematoxilina-eosina de un CPNM escamoso. ....	10
Figura 10: Tinción hematoxilina-eosina de un adenocarcinoma pulmonar. ....	11
Figura 11: Tinción hematoxilina-eosina de un carcinoma adenoescamoso. ....	12
Figura 12: Tinción hematoxilina-eosina de un carcinoma de células grandes. ....	12
Figura 13: Principales vías de transducción de señal en las que están implicadas los “drivers” más importantes en adenocarcinoma y carcinoma escamoso pulmonar. ....	16
Figura 14: Vía de transducción de señal simplificada de FGFR1. ....	21
Figura 15: Estructura de un dímero de DDR2 extraída de <sup>105</sup> . ....	22
Figura 16: Vía de transducción de señal de DDR2 extraído de <sup>111</sup> . ....	22
Figura 17: Estrategias para el desarrollo de nuevos inhibidores de DDR2. ....	23
Figura 18: Estructura quinazolínica de inhibidores análogos a ATP. ....	24
Figura 19: Primeros inhibidores pirrolopirimidínico y piridopirimidínico con potencia relevante. ....	25
Figura 20: Nuevas familias de pirido[2,3-d]pirimidinas. ....	25
Figura 21: Leads de las nuevas familias pirido[2,3-d]pirimidinas. ....	26
Figura 22: Estructura pirido[2,3-d]pirimidinica. ....	26
Figura 23: Esquema sintético para la obtención de pirido[2,3-d]pirimidinas. ....	27
Figura 24: Estructuras de los primeros compuestos seleccionados para ser estudiados en líneas celulares de linfoma de manto. ....	29
Figura 25: Compuestos derivados de <b>16</b> {1,1}. ....	30
Figura 26: Western blot en la línea celular Rec-1 para comparar el efecto inhibitor de <b>18</b> {1,1}, ibrutinib y R406 en la activación de Syk, Lyn y Btk, la dosis utilizada de cada uno de los inhibidores fue de 2,5 $\mu$ M. Imagen extraída de <sup>137</sup> . ....	31
Figura 27: Imagen de un gel de agarosa en el que las líneas celulares de los carriles 3 y 5 tenían contaminación por micoplasmas. ....	46
Figura 28: Representación gráfica del método de los dobles recíprocos para la obtención de la IC <sub>50</sub> . ....	50
Figura 29: Estructura pirido[2,3-d]pirimidinica. ....	67
Figura 30: Estructura de C3. ....	71
Figura 31: Estructura de C5. ....	72
Figura 32: estructura de C6. ....	72
Figura 33: Esquema sintético de PB1. ....	74
Figura 34: IC <sub>50</sub> frente un panel de líneas tumorales de distintos orígenes. ....	77

Figura 35: Gráficas comparativas de la actividad antiproliferativa de PB1 y dasatinib en la línea celular FaDu (gráfica superior) y la línea celular SK-MES-1 (gráfica inferior). Los ejes están en escala logarítmica de base 10. ....	80
Figura 36: Actividad antiproliferativa de PB1 en agar blando en dos líneas características de DDR2.....	82
Figura 37: Actividad antiproliferativa en agar de dasatinib y PB1 en los fibroblastos transfectados resistentes a dasatinib. ....	83
Figura 38: Imágenes de la línea H2286 sensible a dasatinib y de la H2286-DR resistentes a dasatinib.....	84
Figura 39: Imágenes de la línea HCC366 sensible a dasatinib y de la HCC366-DR resistentes a dasatinib.....	84
Figura 40: Secuencia de la línea H2286. En verde la mutación I638F en que hay un cambio de una adenina por una timina y en rojo la posición en que debería estar la mutación de resistencia a dasatinib, T654M, en que se cambia una citosina y una timina por una timina y una guanidina. ....	85
Figura 41: Actividad antiproliferativa de PB1 en agar blando en las líneas portadoras de mutaciones de KRAS.....	87
Figura 42: Comparación de las IC <sub>50</sub> de distintos inhibidores de EGFR con PB1 en SW48. ....	88
Figura 43: Índices de combinación de PB1 con inhibidores de EGFR en células con resistencia primaria a estos inhibidores, H1975 (gráfica superior) y H1650 (gráfica inferior). ....	90
Figura 44: Índices de combinación de PB1 con selumetinib y BGB324 en la línea celular A549. Valores determinados en la IC <sub>50</sub> del inhibidor. ....	91
Figura 45: Western blot de la línea celular A549 con un 10% de FBS y 25 g/mL colágeno I. a) Imagen de la p-Tyr y de DDR2; b) Cuantificación de la p-Tyr respecto DDR2 total. ....	92
Figura 46: Western Blot de PB1 a distintas concentraciones en A549, H2286 y SCC4. Imágenes y cuantificación de las proteínas.....	94
Figura 47: Imágenes y cuantificación de western blot de PB1 en SW48 y PC9. ....	95
Figura 48: Cuantificación del western blot de PB1 en la línea celular SW48.....	95
Figura 49: Cuantificación del western blot de PB1 en la línea celular PC9. ....	96
Figura 50: Citometría de flujo de PB1 y Dasatinib en A549 a 0,5 μM de ambos compuestos....	97
Figura 51: Citometría de flujo de PB1 y Dasatinib en H2286 a 0,1 μM de ambos compuestos. ....	97
Figura 52: Estructura C7, PB1, C18 y <b>7</b> (estructura pirido[2,3-d]pirimidínica de Klutchko) <sup>147</sup> ....	98
Figura 53: Mutaciones de DDR2 en carcinoma escamoso pulmonar <sup>150</sup> .....	99
Figura 54: Gráfica con la concentración de PB1 disponible en el organismo en función del tiempo. Se presentan los datos por vía intravenosa (IV) y por vía oral (PO).....	105
Figura 55: Puntos de metabolismo de PB1. ....	106
Figura 56: Estructura de diazepam. ....	107
Figura 57: Esquema general de la reacción de Ullman a partir de <b>17</b> {1}.....	108
Figura 58: Esquema sintético de C69. ....	109
Figura 59: Comparativa de los estudios de viabilidad celular de PB1 y C69 en A549 y Calu6. .	112
Figura 60: Imágenes y cuantificación de western blot de C69 en A549 y H2286. ....	114
Figura 61: Imagen y cuantificación de western blot de C69 en SW48.....	114
Figura 62: Citometría de flujo de PB1, C69 y dasatinib en A549.....	115
Figura 63: Citometría de flujo de PB1, C69 y Dasatinib en H2286. ....	116
Figura 64: Gráfica con la concentración de C69 disponible en el organismo en función del tiempo. Se presentan los datos por vía intravenosa (IV) y por vía oral (PO).....	117
Figura 65: Estructura de PB1.....	121
Figura 66: Estructura de C69. ....	121

Figura 67: IC <sub>50</sub> de PB1 en H1975. ....	10
Figura 68: IC <sub>50</sub> de gefitinib en H1975. ....	11
Figura 69: Combinación de PB1 con gefitinib en H1975. ....	11
Figura 70: Combinación de gefitinib con PB1 en H1975. ....	11
Figura 71: IC <sub>50</sub> de afatinib en H1975. ....	12
Figura 72: Combinación de PB1 con afatinib en H1975. ....	12
Figura 73: Combinación de afatinib con PB1 en H1975. ....	12
Figura 74: IC <sub>50</sub> de dacomitinib en H1650. ....	13
Figura 75: Combinación de PB1 con dacomitinib. ....	13
Figura 76: Combinación de dacomitinib con PB1. ....	13
Figura 77: IC <sub>50</sub> de PB1 en H1650. ....	14
Figura 78: IC <sub>50</sub> de gefitinib en H1650. ....	14
Figura 79: Combinación de PB1 con gefitinib en H1650. ....	14
Figura 80: Combinación de gefitinib con PB1 en H1650. ....	15
Figura 81. IC <sub>50</sub> de afatinib en H1650. ....	15
Figura 82: Combinación de PB1 con afatinib en H1650. ....	15
Figura 83: Combinación de afatinib con PB1 en H1650. ....	16
Figura 84: IC <sub>50</sub> de dacomitinib en H1650. ....	16
Figura 85: Combinación de PB1 con dacomitinib en H1650. ....	16
Figura 86: Combinación de dacomitinib con PB1 en H1650. ....	17
Figura 87: IC <sub>50</sub> de PB1 en A549. ....	17
Figura 88: IC <sub>50</sub> de selumetinib en A549. ....	17
Figura 89: Combinación de PB1 con selumetinib en A549. ....	18
Figura 90: combinación de selumetinib con PB1 en A549. ....	18
Figura 91: IC <sub>50</sub> de BGB324 en A549. ....	18
Figura 92: Combinación de PB1 con BGB324 en A549. ....	19
Figura 93: Combinación de BGB324 con PB1 en A549. ....	19





## Lista de tablas

Tabla 1: Mortalidad por tumores en España en el año 2012.....	5
Tabla 2: Clasificación TNM del cáncer de pulmón según el American Joint Committee on Cancer (AJCC). .....	7
Tabla 3: Mutaciones y translocaciones más habituales en adenocarcinoma de pulmón.....	11
Tabla 4: Recomendaciones de tratamiento para carcinomas pulmonares no microcíticos según su estadio. ....	13
Tabla 5: Actividad residual de las proteínas seleccionadas después de ser tratadas con los compuestos sintetizados por el GEM. En blanco actividades >80%, en rojo entre el 80 y el 60%, en amarillo entre el 60 y el 40% y en verde inferiores al 20%. ....	28
Tabla 6: GI <sub>50</sub> a 24 y 48 horas de los compuestos <b>23, 24, 16, 25, 26 y 27</b> en líneas celulares de linfoma de manto HBL-2 y Rec-1.....	29
Tabla 7: GI <sub>50</sub> a 24 y 48 horas de <b>16{1,1}</b> y <b>18{1,1}</b> en líneas celulares de linfoma de manto HBL-2 y Rec-1.....	30
Tabla 8: Volúmenes de reactivo necesarios para la preparación de la “master mix” para la determinación de micoplasmas. ....	45
Tabla 9: Volúmenes de los reactivos necesarios para la preparación de la capa base de la matriz de Agar. ....	51
Tabla 10: Volúmenes de los reactivos necesarios para la preparación de la capa de Agar-Células. ....	52
Tabla 11: Volúmenes y concentraciones de BSA requeridos para la realización del Bradford. .	54
Tabla 12: Volúmenes de los reactivos necesarios para la preparación de un gel separador al 10% de acrilamida.....	56
Tabla 13: Volúmenes requeridos de los reactivos necesarios para la preparación de un gel concentrador.....	56
Tabla 14: Anticuerpos primarios utilizados.....	58
Tabla 15: Anticuerpos secundarios utilizados.....	58
Tabla 16: Volúmenes necesarios para la preparación de la “master mix” . ....	59
Tabla 17: Condiciones de la PCR. ....	59
Tabla 18: volúmenes necesarios para la preparación de “master mix” para la PCR de secuencia. ....	60
Tabla 19: Condiciones de la PCR de secuencia.....	60
Tabla 20: Diseño del estudio. ....	61
Tabla 21: Procedimiento de preparación de la formulación.....	63
Tabla 22: Preparación de la formulación a utilizar.....	63
Tabla 23: Tirosinas quinasas seleccionadas y su relevancia clínica.....	67
Tabla 24: Actividad residual de los compuestos seleccionados en las proteínas quinasas estudiadas. Rojo, actividad residual de la proteína con el compuesto concreto está entre el 60 y el 80%, amarillo, entre el 20 y el 60% y, verde, inferior al 20%. ....	69
Tabla 25: Compuestos seleccionados. ....	70
Tabla 26: Estructuras seleccionadas por sus buenos datos en proteína aislada. ....	70
Tabla 27: Origen y principal alteración genética de las líneas celulares en las que se testaron los distintos compuestos. ....	72
Tabla 28: IC <sub>50</sub> de las moléculas testadas en las distintas líneas celulares. En verde aparecen los compuestos con actividades inferiores a 5 µM, y en amarillo aquellos con actividades entre 5 y 10 µM. ....	73
Tabla 29: Quinoma de PB1 a 0,5 y 10 µM. ....	75

Tabla 30: Toxicidad de PB1 en células no tumorales. ....	76
Tabla 31: Líneas celulares con alteraciones en DDR2. ....	78
Tabla 32: IC <sub>50</sub> de dasatinib y PB1 en una selección de líneas de carcinoma escamoso con DDR2 wt.....	79
Tabla 33: IC <sub>50</sub> de dasatinib y PB1 en una selección de líneas de carcinoma escamoso con mutaciones de DDR2.....	80
Tabla 34: Características genéticas de los fibroblastos transfectados.....	80
Tabla 35: IC <sub>50</sub> de dasatinib y PB1 en líneas con la mutación T654M de DDR2. ....	81
Tabla 36: Comparación de la actividad antiproliferativa de PB1 en presencia Colágeno I y en MTT en líneas con alteraciones en DDR2. ....	81
Tabla 37: Actividad antiproliferativa de dasatinib y PB1 en las líneas H2286, H2286-DR, HCC366 y HCC366-DR. ....	85
Tabla 38: IC <sub>50</sub> de PB1, selumetinib y paclitaxel en líneas portadoras de mutaciones en KRAS. .	86
Tabla 39: IC <sub>50</sub> de PB1 en los estudios de MTT y en presencia de colágeno en dos líneas portadoras de mutaciones de KRAS.....	86
Tabla 40: Valores de actividad de distintos inhibidores de EGFR y de PB1 en líneas portadoras de mutaciones sensibles de EGFR. ....	88
Tabla 41: Valores de actividad de distintos inhibidores de EGFR y de PB1 en líneas con resistencia primaria de EGFR.....	89
Tabla 42: Estudios de solubilidad preliminares.....	103
Tabla 43: Resultados de solubilidad de saturación de PB1 en distintos disolventes utilizados en los estudios in vivo en animales.....	104
Tabla 44: Tamaño del tumor en los distintos grupos de tratamiento. ....	104
Tabla 45: Actividad antitumoral de PB1 en el modelo A549 subcutáneo (por volumen del tumor). ....	104
Tabla 46: Actividad antitumoral de PB1 en el modelo A549 subcutáneo (por peso del tumor). ....	104
Tabla 47: Estructuras de los análogos de PB1 sintetizados. Recuadradas en rojo las modificaciones realizadas. ....	107
Tabla 48: IC <sub>50</sub> de los análogos en PB1 en la proteína DDR2 aislada en su forma wt y con la mutación N456S. ....	109
Tabla 49: IC <sub>50</sub> de PB1 y sus análogos en las líneas seleccionadas, los datos están en μM.....	110
Tabla 50: IC <sub>50</sub> de C69 en un pequeño panel de líneas celulares portadoras de mutaciones de KRAS. ....	111
Tabla 51: % de células vivas portadoras de mutaciones de KRAS, después de ser tratadas 72 horas con 1 μM de C69 y PB1. ....	111
Tabla 52: Datos de farmacocinética comparativos de PB1 y C69. ....	117
Table 53: Correlation between systematic nomenclature and the nomenclature used in the document. ....	154
Tabla 54: Actividad residual de cada una de las proteínas en presencia de los compuestos sintetizados. El código de colores indica la actividad residual de la proteína con el compuesto estudiado: entre el 80-100% blanco; entre el 60-80% (rojo), entre el 20-60% (amarillo) e inferior al 20% (verde).....	4
Tabla 55: Líneas celulares con su clasificación histológica, perfil mutacional e IC <sub>50</sub> de PB1. ....	8

## Índice

1	Introducción .....	3
1.1	Cáncer de pulmón .....	3
1.1.1	Incidencia .....	3
1.1.2	Factores de riesgo .....	6
1.1.3	Histología.....	7
1.1.4	Tratamiento.....	12
1.2	Pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidinas como inhibidores de proteínas tirosina quinasa.....	24
1.2.1	Síntesis heterocíclica en el Grup d'Enginyeria Molecular (GEM) .....	26
1.2.2	Evaluación biológica preliminar de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidinas sintetizadas por el GEM	28
2	Objetivos .....	35
3	Materiales y métodos .....	39
3.1	Materiales .....	39
3.1.1	Reactivos .....	39
3.1.2	Material fungible .....	40
3.1.3	Equipos .....	40
3.2	Métodos .....	41
3.2.1	Ensayo en proteína quinasa aislada .....	41
3.2.2	Cultivo celular.....	42
3.2.3	Estudios de viabilidad celular .....	49
3.2.4	Agar blando .....	51
3.2.5	<i>Western blot</i> .....	53
3.2.6	Análisis de las mutaciones de <i>DDR2</i> .....	59
3.2.7	Estudios en animales.....	61
3.2.8	Cultivo celular.....	61
3.2.9	Bioanálisis de las muestras de ratones para los estudios de metabolismo .....	62
4	Resultados y discusión .....	67
4.1	Selección inicial de compuestos pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidínicos para ser testados frente a quinazinas relacionadas con tumores sólidos.....	67
4.2	Actividad antiproliferativa.....	72
4.3	PB1 .....	74
4.3.1	Actividad sobre proteína purificada en 374 quinazinas del quimoma humano .....	74
4.3.2	Actividad antitumoral de PB1 sobre células en cultivo.....	75
4.3.3	Estudio del mecanismo de acción de PB1.....	91

4.3.4	Efectos de PB1 sobre el ciclo celular .....	96
4.3.5	Evaluación global de los resultados obtenidos en los ensayos <i>in vitro</i> de PB1...	97
4.4	Estudios preclínicos de PB1 en animales .....	102
4.4.1	Desarrollo de una formulación para la solubilización de PB1 .....	102
4.4.2	Estudio de eficacia de PB1 en un modelo animal .....	104
4.4.3	Estudios de farmacocinética de PB1 .....	105
4.4.4	Estudios del metabolismo de PB1 .....	105
4.5	Análogos de PB1.....	107
4.5.1	Síntesis de análogos .....	107
4.5.2	Actividad en proteína aislada de los análogos de PB1 .....	109
4.5.3	Actividad <i>in vitro</i> de los análogos de PB1.....	109
4.5.4	C69.....	110
4.5.5	Evaluación de los resultados de los análogos de PB1 .....	117
5	Conclusiones.....	121
6	Referencias.....	125
7	Synthesis and characterization of the compounds .....	141
7.1	C-16 Synthetic pathway .....	142
7.1.1	Synthesis of methyl 2-(2,6-dichlorophenyl)acrylate ( <b>9{1}</b> ) .....	142
7.1.2	Synthesis of 5-(2,6-dichlorophenyl)-2-methoxy-6-oxopiperidine-3-carbonitrile ( <b>10{1}</b> )	143
7.1.3	Synthesis of 2-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-4-imino-3-phenyl-3,4,5,6-tetrahydropyrido-[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-7(8 <i>H</i> )-one ( <b>14{1,1}</b> ) .....	143
7.1.4	Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-(phenylamino-5,6-dihydropyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-7(8 <i>H</i> )-one ( <b>12{1,1}</b> ) .....	144
7.1.5	Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-(phenylamino)pyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-7(8 <i>H</i> )-one ( <b>15{1,1}</b> ).....	145
7.1.6	Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methyl-2-(phenylamino)pyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-7(8 <i>H</i> )-one ( <b>16{1,1}</b> ) (C16 or PB1) .....	145
7.2	Synthesis of PB1 analogues.....	146
7.2.1	Synthesis of <i>N</i> -(4-fluorophenyl)guanidine <b>13{3}</b> .....	146
7.2.2	Synthesis of 2-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(4-fluorophenyl)-4-imino-4,5,6,8-tetrahydropyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-7(3 <i>H</i> )-one ( <b>14{1,3}</b> ) .....	147
7.2.3	Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-(4-fluoroanilino)-5,8-dihydropyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-7(6 <i>H</i> )-one ( <b>12{1,3}</b> ) .....	147
7.2.4	Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-(4-fluoroanilino)pyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-7(8 <i>H</i> )-one ( <b>15{1,3}</b> ).....	148
7.2.5	Synthesis of 4-amino-2-(4-fluoroanilino)-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methylpyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-7(8 <i>H</i> )-one (C69) ( <b>16{1,3}</b> ) .....	149

7.2.6	Synthesis of 4-amino-2-(4-bromoanilino)-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methylpyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-7(8 <i>H</i> )-one ( <b>17{1}</b> ) .....	150
7.2.7	Synthesis of 4-amino-2-(4-aminoanilino)-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methylpyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-7(8 <i>H</i> )-one ( <b>18{1,4}</b> ) .....	150
7.2.8	Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-{{4-(dimethylamino)phenyl}amino}-8-methyl-7 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-7-one ( <b>18{1,5}</b> ) 151	
7.2.9	Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methyl-2-{{4-(morpholin-4-yl)phenyl}amino}-7 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-7-one ( <b>18{1,6}</b> ).....	152
7.2.10	Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methyl-2-{{4-{{2-(morpholin-4-yl)ethyl}amino}phenyl}amino}-7 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-7-one ( <b>18{1,7}</b> ).....	152
7.2.11	Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methyl-2-{{4-{{2-(morpholin-4-yl)ethoxy}phenyl}amino}-7 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-7-one ( <b>18{1,8}</b> ) .....	153
8	Anexo.....	3
8.1	Tablas y gráficas .....	3
8.2	Publicaciones.....	21



# INTRODUCCIÓN





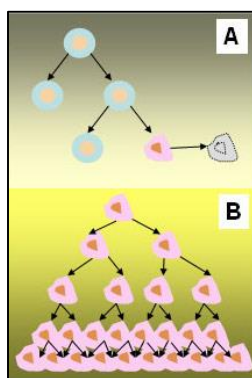
## 1 Introducción

### 1.1 Cáncer de pulmón

#### 1.1.1 Incidencia

Según la SEOM la palabra cáncer “engloba un grupo numeroso de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células anormales, que se dividen y crecen sin control en cualquier parte del cuerpo. Mientras las células normales se dividen y mueren durante un periodo de tiempo programado, la célula cancerosa “olvida” la capacidad para morir y se divide prácticamente sin límite. Tal multiplicación en el número de células llega a formar unas masas, denominadas “tumores” o “neoplasias”, que en su expansión destruyen y sustituyen a los tejidos normales” (Figura 1). Cuando estos tumores o neoplasias se originan a partir de células ubicadas en el área broncopulmonar se habla de cáncer de pulmón.

En general podemos decir que el cáncer aparece a partir de una célula que adquiere una primera alteración genética (normalmente una mutación) que la convierte en ligeramente anormal y evoluciona a fenotipos más transformados e incluso malignos a través de una serie de ciclos sucesivos de mutación y selección, que finalmente llevan a la aparición de células que se replican sin control. Esta proliferación descontrolada favorece la aparición de nuevas mutaciones <sup>1</sup>.



*Figura 1: Las células normales se dividen de forma controlada (A) mientras que las cancerosas desarrollan mutaciones y se dividen de manera incontrolada (B).*

En la década de los 70 A.G. Knudson propuso la teoría de los “dos impactos” para explicar la aparición de la enfermedad, según lo cual, es necesaria la acumulación de dos alteraciones o mutaciones independientes, una después de otra, para la aparición de un tumor <sup>2</sup>. Actualmente se ha determinado que normalmente son necesarias entre 3 y 7 alteraciones independientes, cada una de las cuales tiene baja probabilidad.

También, la SEOM, define la incidencia “como el número de casos nuevos de una enfermedad en una población y en un periodo determinado, que puede expresarse como el número absoluto de casos nuevos en un año o como el número de casos nuevos por 100.000 personas por año”.

El cáncer de pulmón es uno de los tumores más frecuentes y la primera causa de muerte por cáncer a escala mundial. Su incidencia en la sociedad va en aumento<sup>3</sup>, aunque dicha incidencia

## INTRODUCCIÓN

varía de un país a otro y, en España, entre comunidades autónomas. En general se encuentra más extendido en Europa del este y central, seguida por América del Norte, para la población masculina, y para la femenina su mayor incidencia se da en Estados Unidos, donde ocupa la tercera posición, con una tasa de mortalidad igual a la del cáncer de mama.

En 2012 se diagnosticaron en Europa 128.550 casos nuevos de cáncer de pulmón en varones y 86.984 en mujeres y hubo 102.762 fallecimientos a causa de esta enfermedad (63.579 y 39.183, respectivamente). Para 2020, la previsión es que estos valores aumenten con 148.998 casos nuevos en varones, 97.715 en mujeres y 117.859 fallecimientos en total <sup>4</sup>.

En 2012, en nuestro país se diagnosticaron 26.715 casos nuevos de carcinomas pulmonares, lo que supone el 12,4% de todos los casos de cáncer, situándose entre uno de los 4 tumores más frecuentes entre la población española (Figura 2).

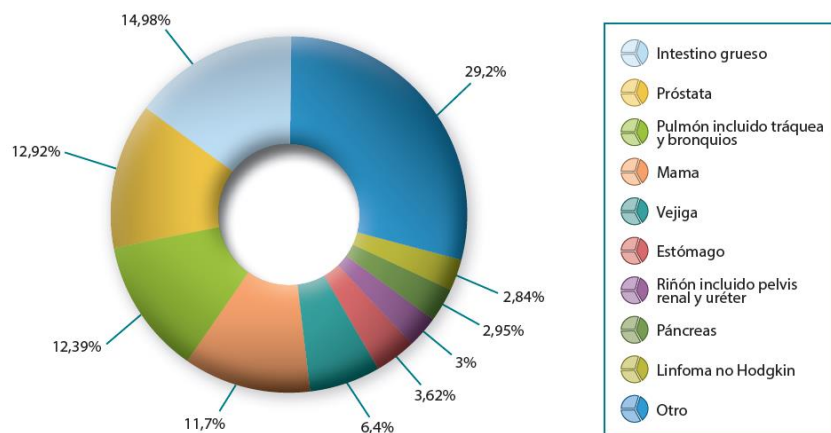


Figura 2: Incidencia de tumores en España en el año 2012 extraída de <sup>3</sup>.

Si dividimos estos datos por sexos, en el caso de varones el cáncer de pulmón ocupa el tercer lugar y en mujeres el quinto, lo que corresponde al 16,6% y al 7,6% de todos los tumores, respectivamente (Figura 3 y Figura 4) <sup>4</sup>.

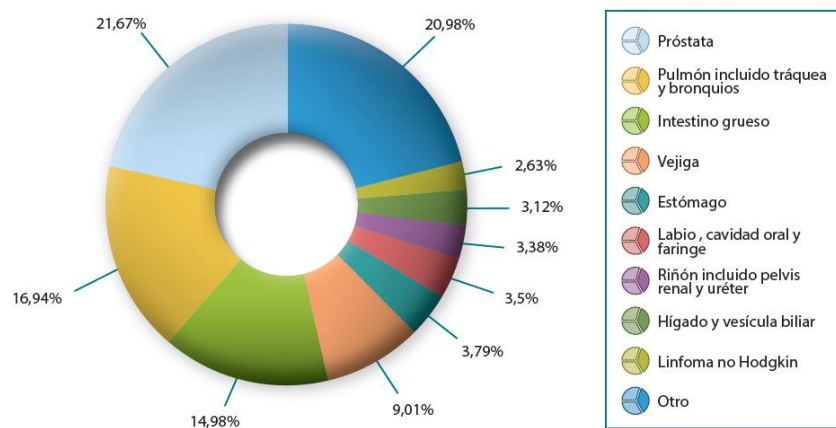


Figura 3: Incidencia de tumores en España en varones en el año 2012 extraída de <sup>3</sup>.

## INTRODUCCIÓN

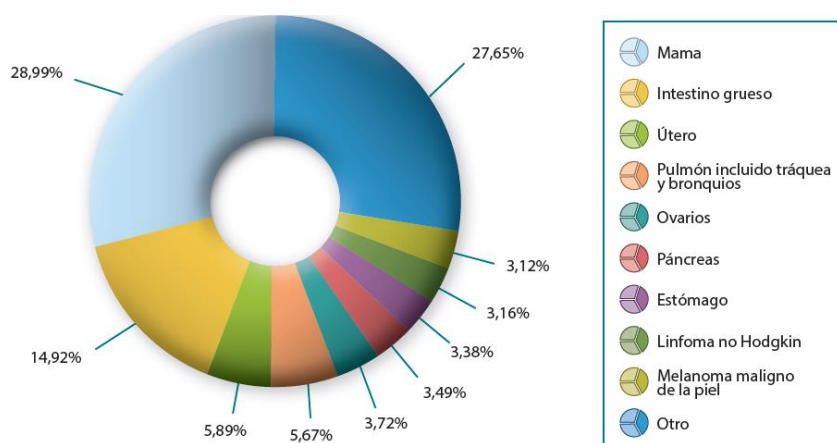


Figura 4: Incidencia de tumores en España en mujeres en el año 2012 extraída de <sup>3</sup>.

Se trata de uno de los tumores más agresivos y tiene el mayor índice de mortalidad entre la población en general (20,55%, que corresponde a 21.118 defunciones) (Figura 5). En varones el cáncer de pulmón se sitúa como la primera causa de muerte por cáncer, por delante de otras neoplasias como la de próstata o la de colon. Entre las mujeres ocupa la tercera posición, solo por detrás del de mama y colon (Tabla 1)<sup>3</sup>.

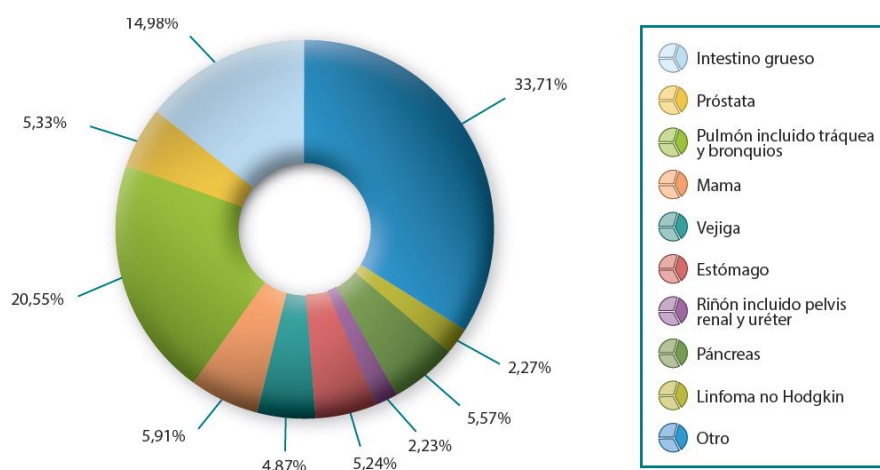


Figura 5: Estimación de la mortalidad por tipo de tumor en España en el año 2012 extraída de <sup>3</sup>.

Tabla 1: Mortalidad por tumores en España en el año 2012.

	Ambos sexos	Hombres	Mujeres
1º	Pulmón	Pulmón	Mama
2º	Colon	Colon	Colon
3º	Mama	Próstata	Pulmón
4º	Páncreas	Vejiga	Páncreas
5º	Próstata	Estómago	Estómago

En el sexo masculino tanto la mortalidad como la incidencia del cáncer de pulmón han descendido en los últimos años a causa de la disminución del consumo de tabaco. En cambio, entre las mujeres han aumentado tanto los nuevos casos como las defunciones por el incremento de mujeres fumadoras <sup>4</sup>.

En los últimos años los avances conseguidos en cuanto al conocimiento y tratamiento de la enfermedad son notables, pero no se ven reflejados en la tasa de supervivencia global a los 5 años del diagnóstico, ya que continúa situándose alrededor del 14% en hombres y del 20% en mujeres. Estos valores podrían aumentar si el diagnóstico de la enfermedad se hiciera en estadios iniciales, ya que en ese momento serían susceptibles de resección quirúrgica. Sin embargo, dado los síntomas ambiguos y poco específicos de la enfermedad se suele detectar en estadios metastásicos, cuando la progresión es más rápida. Además, en numerosos casos los pacientes tienen patologías asociadas que dificultan su tratamiento.

### 1.1.2 Factores de riesgo

Se considera un factor de riesgo todo aquel que aumenta la probabilidad de desarrollar cáncer. Son muchos los factores asociados a la aparición de un carcinoma pulmonar, entre los que destaca el tabaquismo. Se estima que el 90-95% de los casos de neoplasias pulmonares están relacionados con este hábito, además de ser la causa de alrededor del 30% de las muertes por cáncer en países desarrollados <sup>5</sup>.

Hay más de 3000 compuestos químicos diferentes en el tabaco y la identificación concreta de los agentes carcinógenos se enfrenta con importantes dificultades. Más de 60 de dichos compuestos podrían tener acción carcinogénica, que se ha confirmado en 20, entre ellos el 1, 3-butadieno, el óxido de etileno, el benceno, los aldehídos, los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las nitrosaminas <sup>6</sup>.

Otros factores como la dieta o el alcohol influyen en el desarrollo de carcinomas pulmonares. Se ha relacionado el alto consumo de frutas, verduras, flavonoides (cítricos, cebollas, vino tinto, chocolate negro, etc...) y vegetales crucíferos (col, brócoli, etc...) con un efecto protector y una disminución de la incidencia de cáncer de pulmón en la población en general, independientemente de su hábito tabáquico <sup>7</sup>. Por otro lado, se ha demostrado que dietas ricas en colesterol y grasas, así como un elevado consumo de alcohol, aumentan las posibilidades de desarrollar cáncer de pulmón.

Otros factores de riesgo se relacionan con el entorno laboral o social en el que se encuentra cada individuo. Así, personas que trabajan expuestas a sustancias químicas como el amianto, el arsénico, el cromo, el níquel, el radón o la radiación ionizante tienen un riesgo más elevado de presentar esta patología<sup>8</sup>. La polución ambiental y las sustancias químicas que se encuentran en suspensión son otro factor importante. Además, la exposición continua al humo del tabaco incrementa la posibilidad de desarrollar cáncer de pulmón en fumadores pasivos.

Finalmente, las interacciones ambientales y genéticas, así como la edad, también parecen tener un papel relevante. El paso de los años hace que nuestro contacto con carcinógenos aumente, a lo que se añade la pérdida natural por la edad de la eficacia de las vías reparadoras de errores producidos en el ADN, por lo que la posibilidad de desarrollar cáncer se incrementa con la edad. Sin embargo, son muy pocos los estudios que demuestren una clara relación entre el cáncer de pulmón y factores genéticos, aunque parece demostrado que personas con antecedentes familiares son más susceptibles de desarrollar esta enfermedad <sup>9</sup>.

1.1.3 Histología

A pesar de los avances en diagnóstico y biología molecular, la clasificación del cáncer de pulmón en tipos histológicos continúa siendo fundamental para el pronóstico y correcto tratamiento de la enfermedad. La forma, tamaño y características de las células responsables de las neoplasias dan nombre al grupo histológico al que pertenecen.

En la última clasificación hecha por la OMS en 2015, el cáncer de pulmón agrupa todos los tipos más comunes de carcinoma de pulmón y bronquios<sup>10</sup>. La clasificación anatómica más extendida en la actualidad por las guías médicas internacionales es la que emplea los descriptores T – tumor–, N –nódulos adenopáticos– y M –metástasis–, válida para cualquier histología, aceptada y avalada a nivel mundial por todas las sociedades científicas (Tabla 2).

Tabla 2: Clasificación TNM del cáncer de pulmón según el American Joint Committee on Cancer (AJCC).

DESCRIPTORES TNM	
<b>T (Tumor Primario)</b>	
• TX	Tumor primario que no puede ser evaluado, o tumor probado por la existencia de células tumorales malignas en esputo o lavados bronquiales pero no visualizado por métodos de imagen o broncoscopia
• T0	Sin evidencia de tumor primario
• Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
• T1	Tumor ≤3cm en su mayor diámetro, rodeado por pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal del bronquio lobar (es decir: no hay invasión en el bronquio principal)
•T1a	Tumor ≤2 cm en su mayor diámetro
•T1b	Tumor >2 cm pero ≤3 cm en su mayor diámetro
• T2	Tumor >3 cm pero ≤7 cm en su mayor diámetro o tumor con cualquiera de las siguientes características (Los tumores T2 con estas características se clasificarán como T2a si su diámetro es ≤5 cm): afecta al bronquio principal, distante 2 cm o más de la carina principal; invade la pleura visceral; asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende hasta la región hilar pero no afecta al pulmón entero
•T2a	Tumor >3 cm pero ≤5 cm en su mayor diámetro
•T2b	Tumor >5 cm pero ≤7 cm en su mayor diámetro
• T3	Tumor >7 cm o de cualquier tamaño que invada directamente cualquiera de las siguientes estructuras: pared torácica (incluyendo los tumores del sulcus superior), diafragma, nervio frénico, pleura mediastínica, pericardio parietal; o un tumor a menos de 2 cm de la carina principal pero sin invadirla; o asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva del pulmón entero o existencia de nódulo(s) tumoral(es) separado(s) del tumor primario, en su mismo lóbulo

DESCRIPTORES TNM	
• <b>T4</b>	Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de las siguientes estructuras: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio recurrente laríngeo, esófago, cuerpo vertebral, carina; o existencia de nódulo(s) tumoral(es) separado(s) del tumor primario, en un lóbulo diferente del pulmón homolateral
<b>N (ganglios linfáticos regionales)</b>	
• <b>NX</b>	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
• <b>N0</b>	No existen metástasis ganglionares linfáticas regionales
• <b>N1</b>	Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales homolaterales y/o hiliares homolaterales e intrapulmonares, incluyendo la afectación por extensión directa
• <b>N2</b>	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos homolaterales y/o subcarinales
• <b>N3</b>	Metástasis ganglionares linfáticas mediastínicas contralaterales, hiliares contralaterales, escalénicas homolaterales o contralaterales, o supraclaviculares
<b>M (metástasis a distancia)</b>	
• <b>MX</b>	Las metástasis a distancia no pueden ser evaluadas
• <b>M0</b>	No existen metástasis a distancia
• <b>M1</b>	Existen metástasis a distancia
• <b>M1a</b>	Existencia de nódulo(s) tumoral(es) separado(s) del tumor primario, en un lóbulo del pulmón contralateral; tumor con nódulos pleurales o derrame pleural (o pericárdico) maligno
• <b>M1b</b>	Existen metástasis a distancia

a: La poco frecuente diseminación superficial de un tumor de cualquier tamaño con su componente invasivo limitado a la pared bronquial, el cual puede extenderse proximalmente hasta el bronquio principal, se clasifica también como T1.

b: La mayoría de los derrames pleurales (y pericárdicos) asociados al cáncer de pulmón son debidos al tumor. Sin embargo, hay algunos pacientes en quienes múltiples estudios citopatológicos del líquido pleural (o pericárdico) son negativos para tumor, el líquido no es hemático y no es un exudado. Cuando estos elementos y el juicio clínico indiquen que el derrame no está relacionado con el tumor, el derrame debe ser excluido como elemento de estadificación y el paciente debe ser clasificado como T1, T2, T3 o T4.

La principal distinción en los carcinomas pulmonares se establece entre carcinoma pulmonar microcítico (CPM) y carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM), en función del tamaño de las células que lo componen (Figura 6). A su vez, estos dos grandes grupos presentan subdivisiones.

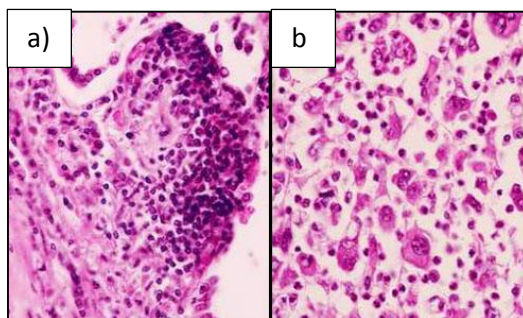


Figura 6: Tinción con hematoxilina-eosina de un carcinoma microcítico (a)) y uno no microcítico (b)).

### 1.1.3.1 Carcinoma pulmonar microcítico (CPM)

El carcinoma pulmonar microcítico, también conocido como carcinoma pulmonar de célula pequeña, constituye el 20% de los tumores pulmonares y se ha demostrado que su aparición está relacionada con el tabaquismo, la exposición al amianto y la edad avanzada. Se caracteriza por células epiteliales pequeñas con forma redondeada y aspecto linfocitario. Tienen nucléolos imperceptibles o ausentes y citoplasma escaso, además de cromatina densa (Figura 7).

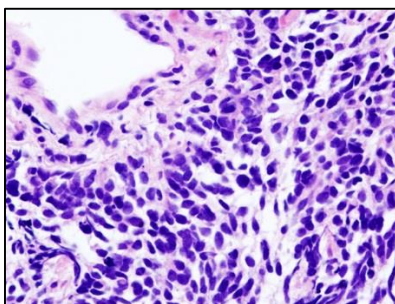


Figura 7: Tinción de hematoxilina-eosina de un CPM.

Son tumores muy agresivos y con alta capacidad metastásica, que suelen situarse en la zona central de la cavidad pulmonar, donde puede comprimir vasos u órganos cercanos. Todo ello dificulta el tratamiento de la enfermedad, y sitúa la supervivencia a los 5 años alrededor del 5%<sup>11 12</sup>.

Algunos de los fármacos utilizados para el tratamiento del CPM son el cisplatino, carboplatino, etopósido, ciclofosfamida, ifosfamida, vincristina, adriamicina, paclitaxel, irinotecán y topotecán, así como distintas combinaciones de algunos de ellos. Estos tumores pocas veces responden a la cirugía o la radioterapia.

### 1.1.3.2 Carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM)

Aproximadamente el 80-85% de los tumores pulmonares corresponden a este tipo tumoral y el 80% de los pacientes con CPNM presentan enfermedad metastásica al diagnóstico. También se conoce como carcinoma pulmonar de célula no pequeña y se subdivide en carcinoma escamoso, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes, adenoescamoso, carcinoma con elementos pleomórficos, carcinoma del tipo de glándulas salivales y carcinoma SAI<sup>13</sup>. Los cuatro primeros



tipos son los más relevantes por su mayor incidencia (Figura 8). En el CPNM el tratamiento depende del estadio en que se encuentre y del subgrupo histológico.

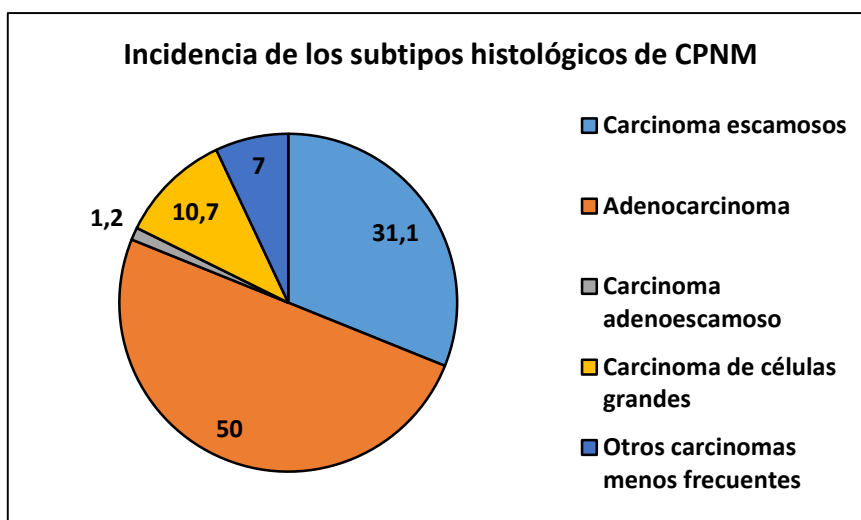


Figura 8: Incidencia de los subtipos histológicos de CPNM.

#### 1.1.3.2.1 Carcinoma escamoso o epidermoide

Es el subtipo celular más relacionado con el hábito tabáquico dentro del grupo de CPNM, donde representa el 20-30% de todos los tumores. Se trata de neoplasias localizadas en la parte central de los bronquios que se componen de células grandes con un citoplasma abundante y denso, con núcleo hiper cromático irregular y nucléolo pequeño (Figura 9). Las características morfológicas típicas que facilitan la clasificación de estos tumores son la presencia de puentes intercelulares y la elevada queratinización <sup>14</sup>.

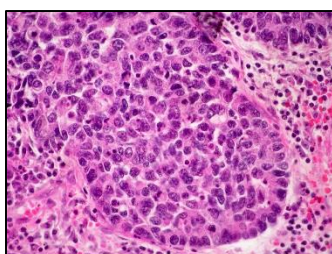


Figura 9: Tinción hematoxilina-eosina de un CPNM escamoso.

Desde un punto de vista genético, las mutaciones de mayor prevalencia (20%) en el carcinoma escamoso, son las del gen *FGFR1*<sup>14</sup>, seguidas de las mutaciones en *EGFR* (inferior al 5%), en *KRAS* (5%), en *PIK3CA* (3-5%) y en *DDR2* (4%). También se ha demostrado que la amplificación y sobreexpresión de *SOX2* está relacionada con la iniciación de estos tumores <sup>15</sup>.

#### 1.1.3.2.2 Adenocarcinoma

Es uno de los grupos con mayor relevancia clínica, ya que representa el 50% de todos los CPNM. Entre la población no fumadora con carcinomas pulmonares es el tipo histológico más común pero también es frecuente en pacientes fumadores. Suele localizarse en las zonas periféricas del pulmón, por lo que no es extraño que la pleura y la pared torácica se vean afectadas.

## INTRODUCCIÓN

Las células de los adenocarcinomas pulmonares suelen ser binucleadas con mucina intracitoplasmática y estructuras glandulares (Figura 10). Aunque son tumores de crecimiento intermedio, tienen elevada capacidad metastásica, principalmente en cerebro, hueso e hígado.

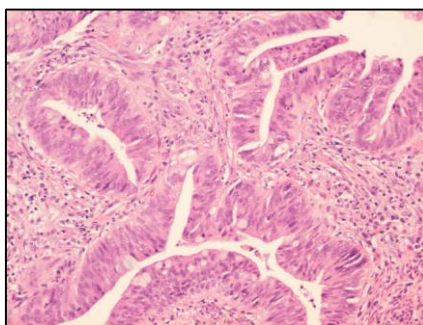


Figura 10: Tinción hematoxilina-eosina de un adenocarcinoma pulmonar.

En los últimos años se han descubierto en este tipo histológico la existencia de mutaciones o translocaciones somáticas mutuamente excluyentes que, con la excepción de *KRAS*, permiten el tratamiento con fármacos dirigidos. Los genes cuyas alteraciones presentan mayor relevancia clínica se presenta en la Tabla 3 <sup>16,17</sup>.

Tabla 3: Mutaciones y translocaciones más habituales en adenocarcinoma de pulmón.

Mutaciones			Translocaciones		
Gen	Proporción (%)	Ejemplo de ITQ	Gen	Proporción (%)	Ejemplo de ITQ
EGFR	10-40	Erlotinib	ALK	4	Crizotinib
<i>KRAS</i>	38	-----	RET	1	Sunitinib
BRAF	2	Vemurafenib	ROS	2	Crizotinib

### 1.1.3.2.3 Carcinoma adenoescamoso

El carcinoma adenoescamoso presenta una incidencia del 1,2% dentro de los CPNM. Son tumores localizados en la periferia del pulmón y suelen metastatizar con mucha facilidad, por lo que presentan mal pronóstico<sup>10</sup>. Se trata de neoplasias mixtas formadas por células de diferenciación glandular y células de diferenciación escamosa, lo que les confiere más agresividad que cada una de las dos histologías por separado (Figura 11) <sup>18</sup>.

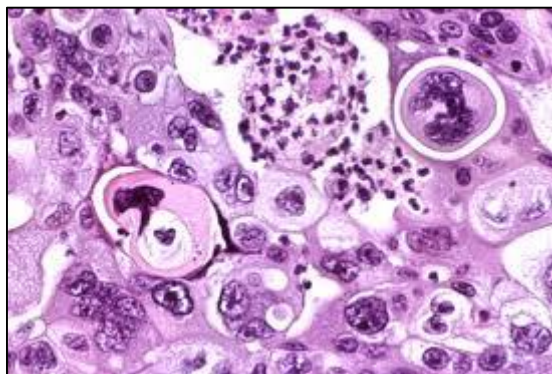


Figura 11: Tinción hematoxilina-eosina de un carcinoma adenoescamoso.

### 1.1.3.2.4 Carcinoma de células grandes

Este tipo histológico es uno de los menos frecuentes entre el CPNM representando el 3% de los casos. Es más habitual entre población masculina y está asociado al hábito tabáquico y a la exposición al radón.

Se trata de un tumor agresivo a causa de la dificultad que presenta su diagnóstico y su rápido desarrollo. Aunque habitualmente se encuentran situados en la periferia, no es extraño encontrarlos en cualquier parte del pulmón <sup>19</sup>.

Histológicamente se caracteriza por hojas y nidos de células poligonales con núcleo vesicular y nucléolo prominente, sin presentar diferenciación citoplasmática (Figura 12). Este grupo histológico se subdivide en:

- Carcinoma de células gigantes, las cuales son multinucleadas.
- Carcinoma de células claras que contienen mucina intranuclear y diferenciación de adenocarcinoma.
- Carcinoma de células fusiformes con diferenciación escamosa.

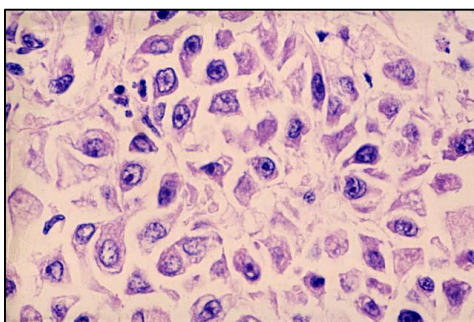


Figura 12: Tinción hematoxilina-eosina de un carcinoma de células grandes.

### 1.1.4 Tratamiento

Igual que sucede en la mayoría de las neoplasias, el tratamiento para el cáncer de pulmón difiere en función del tipo histológico, del estadio (TNM) y de la presencia de ciertas alteraciones genéticas. Además, hay factores no relacionados directamente con la enfermedad, que tienen un papel muy relevante en el momento de tomar la decisión terapéutica definitiva, como el estado general del paciente, su función pulmonar y su comorbilidad (Tabla 4).

## INTRODUCCIÓN

Tabla 4: Recomendaciones de tratamiento para carcinomas pulmonares no microcíticos según su estadio.

Estadio	Procedimiento estándar
IA	Cirugía. Pacientes seleccionados con baja reserva respiratoria o con muy alto riesgo quirúrgico; terapia ablativa local (radiocirugía o ablación por radiofrecuencia).
IB/IIA/IIB	Cirugía + Quimioterapia adyuvante.
IIIA	III A no resecable: Quimio-radioterapia. III A resecable: Valorar quimioterapia neo-adyuvante vs quimio-radio definitiva.
IIIB	T4N0 y T4N1: Cirugía. T4N2 y T4N3: Quimioterapia + Radioterapia. T4N3 no candidatos a terapia local: Fármacos inhibidores de tirosina quinasa.
IV	Quimioterapia. Fármacos inhibidores de tirosina quinasa. Inmunoterapia en segunda línea. En pacientes seleccionados con enfermedad oligometastásica: cirugía o terapia ablativa.

De manera general, la cirugía es la mejor opción cuando la enfermedad se encuentra en estadios iniciales con ausencia de metástasis. En el caso de enfermedad metastásica la cirugía no está recomendada. En su lugar se emplea la radioterapia para controlar el desarrollo del tumor primario y de los ganglios linfáticos locorregionales, y la quimioterapia. En esta patología ambas tienen un efecto raramente curativo, en pocas ocasiones se han observado respuestas completas y supervivencias prolongadas.

### 1.1.4.1 Cirugía

A pesar de los avances realizados en el tratamiento del cáncer, la cirugía continúa siendo la mejor opción para aquellos pacientes con tumores localizados, generalmente en estadios tempranos de la enfermedad (I, II y IIIA). En estos casos, además del estadiaje de la enfermedad también hay que tener en cuenta que el paciente no presente patologías asociadas y que la función pulmonar sea correcta <sup>20</sup>.

Es el tratamiento con mejores resultados en cuanto a supervivencia, con tasas del 80% en estadios T1N0 a los 5 años <sup>21</sup>.

### 1.1.4.2 Radioterapia

La radioterapia se basa en el uso focalizado de radiación de alta intensidad con el objetivo de eliminar las células tumorales sin afectar a las células sanas de los tejidos adyacentes. Se trata de una técnica utilizada en tumores pequeños y localizados, incluso en áreas de difícil acceso, o en metástasis. Su uso se recomienda cuando la dosis de radiación empleada sea proporcional a la muerte celular. En tumores de gran tamaño su utilidad es muy limitada ya que están formados por células hipóxicas poco sensibles a la radiación.

Existen distintos tipos de radioterapia, las más extendidas son la braquiterapia, donde la radiación proviene de un material radioactivo que se introduce directamente en el tumor, y la radioterapia externa, que emplea máquinas de gran tamaño (aceleradores lineales) donde el

compuesto radioactivo no entra en contacto directo con el paciente. En el cáncer de pulmón se utiliza la radioterapia externa <sup>22</sup>.

La combinación de esta técnica con cirugía o quimioterapia está ampliamente extendida <sup>23</sup>. En el primer caso se utiliza la radioterapia para disminuir el tamaño del tumor y facilitar la intervención quirúrgica, o al finalizarla, con el objetivo de eliminar las células tumorales remanentes de la zona afectada. Cuando se combina con la quimioterapia, el objetivo es potenciar los efectos de esta última.

### 1.1.4.3 *Quimioterapia*

La quimioterapia es el tratamiento principal para muchas neoplasias en estadios avanzados, incluida la de pulmón. Se usa como terapia sistémica en la que se suministra un fármaco al paciente a fin de que alcance las células cancerosas, independientemente de su localización. Los fármacos quimioterapéuticos son compuestos químicos que alteran la síntesis de ácidos nucleicos, la división celular o la síntesis de proteínas.

En los tumores de pulmón de estadios quirúrgicos la quimioterapia se puede aplicar en distintos momentos:

- **Adyuvante:** Se administra la quimioterapia después de haber sometido al enfermo a una intervención quirúrgica y pretende eliminar las micrometastasis indetectables en el momento de la cirugía <sup>24 25</sup>.
- **Neo adyuvante:** En este caso la quimioterapia es previa a la cirugía y tiene como objetivo reducir el número de micrometastasis así como disminuir las medidas del tumor primario<sup>26</sup>.

En el caso del cáncer de pulmón avanzado sin mutaciones genéticas detectables las combinaciones de distintos compuestos quimioterapéuticos continúan siendo el tratamiento de elección, pero los efectos secundarios derivados de su elevada inespecificidad hace que se vean afectados órganos y tejidos sanos. Sin embargo, el mayor inconveniente es la baja tasa de respuesta (25%) así como la rápida adaptación celular a estos medicamentos. Esto produce resistencia al fármaco y la supervivencia libre de progresión es de tan solo 6 meses <sup>27</sup>.

### 1.1.4.4 *Medicina personalizada*

El concepto de medicina personalizada hace referencia a la adaptación del tratamiento a las características de cada paciente. En el caso del paciente oncológico, consiste en tratar de manera individualizada a cada enfermo en función de las alteraciones genéticas que presente el tumor. Así pues, enfermos con la misma enfermedad pueden recibir tratamientos dispares.

En el cáncer de pulmón avanzado las mutaciones activadoras del gen EGFR y su respuesta a los inhibidores tirosina quinasa fue el descubrimiento que inició el desarrollo de terapias dirigidas <sup>28</sup>.

En la actualidad, las guías médicas internacionales recomiendan el análisis de los siguientes siete genes antes de iniciar cualquier tratamiento: *KRAS*, *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *HER2*, *BRAF* y *RET*, aunque esta lista aumenta constantemente.

### 1.1.4.5 Principales “drivers” en carcinomas pulmonares

La acumulación de anomalías en los mecanismos de control de crecimiento y proliferación celular, y el consiguiente comportamiento disfuncional se han detectado en células tumorales de diferentes órganos, así como en otras enfermedades. Dentro de estas alteraciones genéticas se encuentran algunas que confieren ventajas selectivas para la proliferación celular, denominadas alteraciones “driver”, promotoras de procesos oncogénicos. Tratamientos dirigidos a inhibir la activación de los “drivers” han demostrado tener una elevada eficacia en estadios avanzados o metastásicos de cáncer<sup>29,30</sup>. Las alteraciones oncogénicas a menudo afectan a los receptores tirosina quinasa (RTQ) que son proteínas que se hallan implicadas en procesos fundamentales de la regulación del ciclo celular.

Existen 3 mecanismos por los que un RTQ puede convertirse en promotor de procesos patológicos:

1. Estructural: las mutaciones de residuos específicos pueden dar lugar a RTQs constitutivamente activos, es decir, en funcionamiento enzimático aun en ausencia del estímulo.
2. Mediados por ligando: se establece un bucle de autoseñalización celular que promueve la acción transductora de sus RTQs.
3. Sobreexpresión: se debe a una excesiva transcripción de los genes que los codifican. A un mismo nivel de estímulos extracelulares, una mayor concentración en superficie de receptores implica una respuesta celular sobredimensionada.

Estos mecanismos pueden actuar aisladamente o en combinación.

Todo ello hace que las proteínas tirosina quinasa sean unas dianas celulares muy interesantes para los tratamientos antineoplásicos. A continuación, se describirán algunos de los “drivers” más importantes en adenocarcinoma y carcinoma escamoso pulmonar, de los cuales solo *KRAS* no es una tirosina quinasa.

#### 1.1.4.5.1 *KRAS*

*KRAS* es un oncogén perteneciente a la familia RAS junto con *HRAS* y *NRAS*. Fue uno de los primeros oncogenes en ser caracterizado y aparece mutado en adenocarcinoma de pulmón (con una frecuencia del 20-25%) y en carcinoma escamoso de pulmón (con una frecuencia del 4%)<sup>31</sup>.

Al contrario de lo que sucede con la mayoría de mutaciones oncogénicas “driver”, *KRAS* suele detectarse en pacientes fumadores y con menor incidencia en la población del sudeste asiático<sup>32</sup>. Las mutaciones de *KRAS* son mutuamente excluyentes con las de *EGFR*, *BRAF* y *HER2*, y con los reordenamientos de *ALK* y *ROS1*. En CPNM afectan a los codones 12 y 13 y, con mucha menos frecuencia, al codón 61. Las mutaciones en *HRAS* y *NRAS* son muy poco habituales. El papel pronóstico y predictivo de las mutaciones de *KRAS* en CPNM se ha estudiado extensamente<sup>33</sup>.

En estadios iniciales de carcinomas pulmonares, la detección de mutaciones de *KRAS* no tiene relevancia pronóstica ni es útil para determinar o no el uso de quimioterapia adyuvante <sup>34</sup>. Sin embargo, son muchos los estudios que demuestran un impacto negativo de estas mutaciones en estadios avanzados de la enfermedad, así como una mala respuesta a la quimioterapia estándar <sup>35</sup>.

Además, la presencia de mutaciones en *KRAS* está bien establecida como un factor predictivo de falta de respuesta a los tratamientos con inhibidores de tirosina quinasa <sup>36,37</sup>. Esto podría ser consecuencia de las distintas cascadas de señalización celular que se ponen en funcionamiento cuando *KRAS* está mutado, de manera que, a pesar de inhibir un receptor de tirosina quinasa siempre hay otras vías de señalización celular por debajo del oncogén que continúan activas (Figura 13).

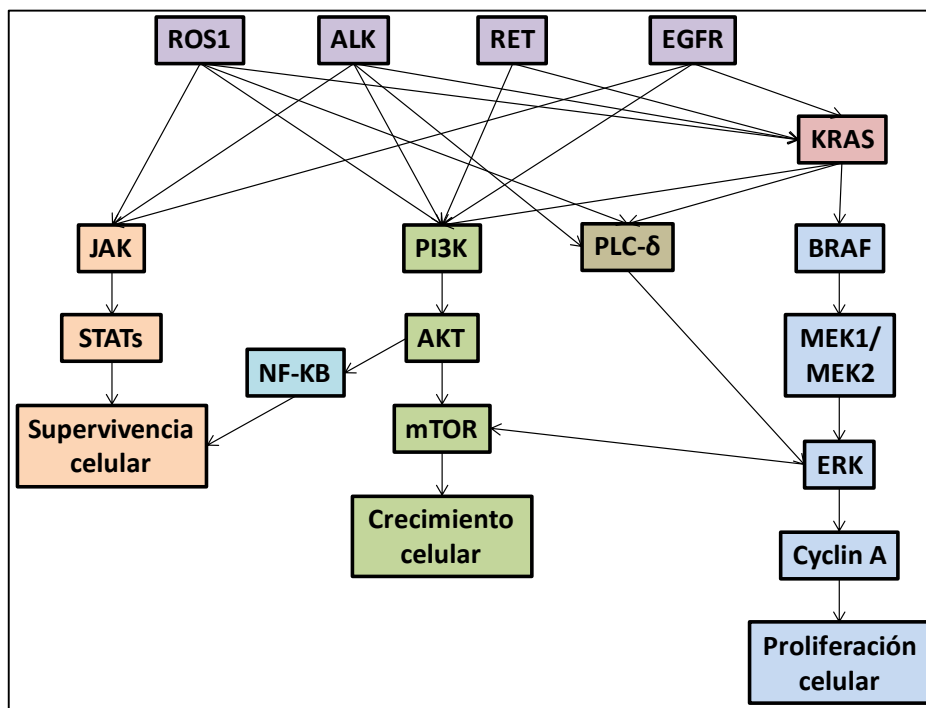


Figura 13: Principales vías de transducción de señal en las que están implicadas los “drivers” más importantes en adenocarcinoma y carcinoma escamoso pulmonar.

A pesar de la investigación desarrollada con el objetivo de bloquear este oncogén, no existen inhibidores de *KRAS* mutado. *MEK* es un gen que se encuentra en un nivel inferior de la cascada de señalización celular de *KRAS*, cuya inhibición se ha presentado como una estrategia prometedora para el tratamiento de pacientes con mutaciones de *KRAS*. Selumetinib, un inhibidor de *MEK*, en combinación con docetaxel da unos resultados de progresión libre de enfermedad (5,3 meses) y de supervivencia (9,4 meses) superiores a los de docetaxel en monoterapia (2,1 meses y 5,2 meses, respectivamente) <sup>38</sup>.

#### 1.1.4.5.2 EGFR

El EGFR es una glicoproteína transmembrana que pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa ERBB o HER. La dimerización del receptor después de la unión del ligando activa varias

vías de transducción de señal, principalmente RAS-RAFMEK-MAPK y PI3K-AKT-mTOR<sup>39</sup>. Se trata de dos vías de gran importancia para el crecimiento y regulación del ciclo celular (Figura 13).

Las mutaciones de EGFR se han descrito en mayor frecuencia en adenocarcinomas de mujeres no fumadoras en comparación con hombres no fumadores; así pues en Europa su frecuencia es del 22% en mujeres frente al 9% en hombres mientras que entre la población asiática este porcentaje aumenta al 60% entre la población femenina frente al 37% en varones<sup>40</sup>. Las más habituales son mutaciones puntuales en la posición 858 (leucina por arginina) del exón 21 y deleciones en marco de lectura en el exón 19, ambas provocan una activación constitutiva del receptor.

Además de las mutaciones comentadas, EGFR presenta otras menos frecuentes, entre las que se encuentran las mutaciones G719X en el exón 18. Se trata de una sustitución de glicina por serina, por citosina o adenina (G719S, G719C o G719A, respectivamente)<sup>41-43</sup>, en el dominio quinasa del receptor. Estas mutaciones puntuales representan el 3% de las mutaciones totales de *EGFR* en CPNM. Con baja frecuencia, inferior al 1%, pueden presentarse de forma concomitante con mutaciones en el exón 19 o 20<sup>42,43</sup>.

### 1.1.4.5.2.1 Inhibidores de primera generación de *EGFR*

El descubrimiento de la importancia de la vía de transducción de señal celular de EGFR ha llevado al desarrollo de distintas terapias anti-EGFR, que incluyen, inhibidores del dominio tirosina quinasa (ITQ) y anticuerpos monoclonales como cetuximab y panitumumab, que se unen al dominio extracelular<sup>44</sup>.

Las mutaciones más frecuentes de EGFR (deleciones del exón 19, la L858R y la L861Q) son sensibles a los ITQ de primera generación. Estos compuestos son pequeñas moléculas orgánicas entre las que destacan gefitinib y erlotinib. Sus estructuras químicas similares están basadas en la estructura de la adenosina del ATP, y tienen su mismo modo de unión a *EGFR*. La afinidad por el ATP del EGFR con mutaciones en los exones 19 y 21 es 50 veces mayor que en el caso del receptor tipo *wt*. De igual manera, la afinidad de gefitinib y erlotinib por EGFR mutado en comparación con EGFR *wt* también es superior. A pesar de esta afinidad selectiva, los ITQ también se pueden unir al *EGFR wt*, provocando efectos secundarios adversos como irritación cutánea y diarrea<sup>45-47</sup>.

El tratamiento en primera línea con inhibidores de EGFR para pacientes con CPNM mutados de EGFR tiene una tasa de respuesta del 50-70% y una progresión libre de enfermedad de 10 a 14 meses, muy superior a las observadas en el caso de la quimioterapia<sup>45</sup>.

Además, tanto gefitinib como erlotinib atraviesan la barrera hematoencefálica por lo que pueden penetrar en el sistema nervioso central. Las metástasis cerebrales son muy comunes en pacientes con CPNM<sup>46,48</sup>.



### 1.1.4.5.2.2 Resistencia a los inhibidores de *EGFR*

- Resistencia primaria

Esta resistencia se da en pacientes que no responden al tratamiento con inhibidores de EGFR, ya que tienen alteraciones en los genes que modulan esta respuesta. Entre estas alteraciones encontramos las mutaciones en *KRAS* (mutuamente excluyentes con las mutaciones de EGFR) y la amplificación o sobreexpresión de MET como las de mayor relevancia <sup>49</sup>. Otras alteraciones causantes de la resistencia primaria, aunque con menor incidencia, son las mutaciones de *PI3KCA*, pérdida de *PTEN*, una baja expresión de *BIM* o la presencia de la mutación T790M pretratamiento <sup>50,51</sup>.

- Resistencia adquirida

A pesar de la buena respuesta inicial a los inhibidores de EGFR, los pacientes mutados para *EGFR* acaban desarrollando resistencia a estos fármacos y progresión a la enfermedad.

En el 50% de los casos, la resistencia adquirida al tratamiento con inhibidores de primera generación se debe a la aparición de la mutación T790M en el exón 20 de EGFR <sup>50-53</sup>. Esta mutación provoca cambios conformacionales que incrementan la afinidad del receptor mutado por el ATP, pero bloquean la unión de gefitinib y erlotinib. Se ha observado que en el doble mutado L858R/T790M la afinidad por gefitinib disminuye 4 veces mientras que la afinidad por el ATP aumenta 28 veces <sup>45</sup>. Además, la T790M incrementa la actividad catalítica de EGFR, favoreciendo la capacidad de crecimiento de estas células.

Otros mecanismos de resistencia adquirida a los inhibidores de EGFR son la amplificación de MET, la sobreexpresión de AXL o la transformación histológica de las células (éstas dejan de presentar un fenotipo epitelial y adquieren uno mesenquimal), entre otros <sup>54</sup>.

### 1.1.4.5.2.3 Inhibidores de segunda generación de *EGFR*

Afatinib tiene una estructura anilinoquinazolínica similar a la de erlotinib y gefitinib capaz de inhibir EGFR, así como otros miembros de su familia (HER2, HER3 y HER4) <sup>55</sup>. A diferencia de los inhibidores de primera generación, afatinib se une irreversiblemente a EGFR mediante la formación de un enlace covalente con la cisteína 797 <sup>56</sup>. Estudios *in vitro* han demostrado que la afinidad contra la mutación L858R y la delección del exón 19 de EGFR es similar a la de erlotinib, mientras que cuando el receptor tiene la mutación T790M el inhibidor de segunda generación tiene una afinidad 100 veces mayor. También es capaz de penetrar en el sistema nervioso central alcanzando una concentración lo suficientemente elevada como para ejercer su efecto inhibitor. En consecuencia, la tasa de respuesta es similar para pacientes con y sin metástasis cerebrales <sup>57</sup>.

Sin embargo, estudios en los que se determinó la actividad de afatinib *in vivo* mostraron que este compuesto no era efectivo contra *EGFR* cuando presentaba la mutación T790M<sup>58</sup>.

Otro inhibidor de segunda generación es dacomitinib que, al igual que afatinib, se une de manera irreversible a *EGFR*. La actividad de dacomitinib es similar a la de afatinib, mientras que

contra la mutación L858R y la delección del exón 19 presenta valores similares a los de gefitinib o erlotinib, estudios *in vivo* han mostrado que esta actividad desaparece cuando está presente la mutación T790M en *EGFR*.

### 1.1.4.5.2.4 Inhibidores de tercera generación de *EGFR*

Se han desarrollado inhibidores de tercera generación contra *EGFR* con la mutación T790M, como rociletinib y osimertinib. El uso clínico de este último ha sido aprobado por la FDA <sup>59</sup>.

Rociletinib, es una pirimidina 2,4-disustituida que se une covalentemente a la C797 de *EGFR*, a través de su grupo meta-acrilamida. Estudios *in vitro* muestran que su selectividad por el *EGFR* con la mutación T790M frente a *EGFR wt* es 22 veces mayor que la de erlotinib, con resultados de actividad de 7 nM para *EGFR* con las mutaciones L858R y la T790M, y 32 nM para *EGFR* con la mutación del exón 19 y la T790M, mientras que en las líneas *EGFR wt* la actividad era superior a 550 nM <sup>60,61</sup>. Durante la fase I/II del ensayo clínico al que se sometió rociletinib, los principales efectos adversos fueron la hiperglicemia, la diarrea, pérdida de apetito, vómito o fatiga <sup>62-65</sup>. En este contexto, en el mes de junio de este mismo año la FDA decidió no aprobar este inhibidor como tratamiento de segunda línea para pacientes con CPNM portadores de la T790M en *EGFR* <sup>62</sup>.

Por otro lado, osimertinib presenta una estructura similar a la de rociletinib. Sin embargo, ninguno de los metabolitos generados inhibe *IGFR1*, por lo que la tasa glucémica del paciente no se ve afectada, mientras que mantiene los valores de actividad conseguidos por rociletinib, 11 nM para *EGFR* con las mutaciones L858R y la T790M, y 27 nM para *EGFR* con la mutación del exón 19 y la T790M <sup>64,66-68</sup>.

Osimertinib ha mostrado eficacia en las fases I/II de distintos ensayos clínicos en pacientes con resistencia adquirida a inhibidores de *EGFR* de primera y segunda generación y ha sido aprobado por la FDA para pacientes con CPNM metastásico portadores de la mutación T790M de *EGFR* <sup>59</sup>.

El tratamiento con inhibidores de tercera generación provoca la aparición de nuevas resistencias por la activación de vías de transducción de señal paralelas, como la amplificación de *MET* y también por la adquisición de resistencia al fármaco en la vía bloqueada, por ejemplo a través de la aparición de la mutación puntual C797S de *EGFR* <sup>69,70</sup>. El desarrollo de resistencias a las terapias a las que se somete a los pacientes hace imprescindible la investigación constante y el desarrollo de nuevos fármacos capaces de inhibirlas.

### 1.1.4.5.2.5 Inhibidores de mutaciones poco frecuentes

Los esfuerzos dirigidos al desarrollo de fármacos contra las mutaciones del exón 18 de *EGFR* han sido muy limitados debido a la baja incidencia de esta alteración.

De manera habitual para estos pacientes se usa el mismo tratamiento que para pacientes con las mutaciones de sensibilidad de los exones 19 y 21 (gefitinib o erlotinib), a pesar de que su tasa de respuesta es inferior al 30% <sup>71</sup>.

Recientemente se ha estudiado la evolución de este grupo de enfermos en tratamiento con afatinib, pero al igual que en el caso de los inhibidores de primera generación los datos

obtenidos no aconsejaban su uso. Finalmente, neratinib, un inhibidor dual de HER2 y EGFR, está en ensayos clínicos para pacientes portadores de esta alteración <sup>72</sup>.

### 1.1.4.5.3 ALK, ROS1, RET y BRAF

ALK es un RTQ altamente conservado que pertenece a los receptores de tirosina quinasa. Al igual que otros receptores, está situado en la membrana celular y está formado por un dominio extracelular de unión con el ligando, un dominio transmembrana y un dominio tirosina quinasa intracelular <sup>73-77</sup>.

La fusión de los genes ALK-EML4 fue descubierta en 2007 por Hiroyuki Mano y colaboradores en Japón y se encuentra en el 3-5% de pacientes con CPNM <sup>75</sup>. Posteriormente se han identificado fusiones con otros genes como KIF5B-ALK, KLC1-ALK y TFG-ALK, menos comunes entre la población, aunque todas ellas son sensibles a ITQs como crizotinib, alectinib y otros <sup>78,79</sup>(Figura 13).

ROS1 es un receptor tirosina quinasa cuya fusión con otros genes es característica de adenocarcinomas de pulmón donde su incidencia es del 1-2% y principalmente ha sido diagnosticada en población joven, femenina y/o no/levemente fumadora <sup>80</sup>.

La fusión más común en este grupo de pacientes es la de ROS1-CD74, aunque también se han detectado fusiones menos habituales con FIG-ROS1, SLC34A2-ROS1, EZR-ROS1, TPM3-ROS1 y SDC4-ROS1, todas ellas sensibles a inhibidores de ROS1. Se trata de una alteración mutuamente excluyente de otras alteraciones activadoras de tumores como *KRAS*, *ALK* y *EGFR* <sup>81</sup>(Figura 13).

RET es un receptor tirosina quinasa cuyo papel como “*driver*” se ha descrito, principalmente, en cáncer de tiroides <sup>82</sup>. En CPNM se han detectado translocaciones de RET con KIF5B y CCD6 en el 1.5% de pacientes, principalmente, mujeres jóvenes y no/levemente fumadoras. Estas alteraciones suelen detectarse en adenocarcinomas pero no en carcinomas escamosos y son mutuamente excluyentes de otras mutaciones oncogénicas activadoras <sup>83-85</sup>(Figura 13).

La actividad tumorigénica de RET se puede suprimir con inhibidores específicos dada la dependencia de las células de esta proteína. Se están llevando a cabo distintos ensayos clínicos que evalúan la actividad de inhibidores de este gen en distintos carcinomas (NCT00244972; NCT00121680; NCT00495872).

BRAF es una serina-treonina quinasa que pertenece a la familia de quinasas RAF. Se encuentra por debajo de *KRAS* en la vía de transducción de señal e interactúa directamente con la cascada de señalización de MEK-ERK. La activación constitutiva de la proteína BRAF, debida a mutaciones puntuales, produce una proliferación celular descontrolada <sup>86</sup>(Figura 13).

Inicialmente, las mutaciones de BRAF se describieron en melanoma maligno donde el 40-60% de los tumores eran portadores de la mutación activadora V600E de BRAF <sup>87</sup>. Posteriormente, mutaciones en esta proteína se detectaron también en cáncer colorrectal, cáncer de tiroides y otros tipos de tumores sólidos, como los pulmonares.

En adenocarcinoma de pulmón la mutación V600E en BRAF aparece entre un 1-5% de casos, aunque también se han detectado otras mutaciones en los exones 11 y 15 <sup>88</sup>.

1.1.4.5.4 *FGFR1*

El FGFR1 pertenece a la familia de receptores de tirosina quinasa FGFR formada por 4 miembros<sup>89</sup>. Se trata de proteínas transmembrana activadoras de la vía celular RAS/RAF/MAPK (Figura 14).

Las amplificaciones de FGFR se han detectado en el 20% de casos de carcinomas escamosos de pulmón, de ellas el 10% corresponden a amplificaciones de FGFR1. En pacientes con adenocarcinomas pulmonares las amplificaciones de FGFR1 se han descrito en un 5% de los casos y la fusión FGFR3-TACC3 en el 3% de estos pacientes<sup>90-93</sup>.

Distintos estudios clínicos realizados, muestran la eficacia de los inhibidores de FGFR en pacientes con amplificaciones y fusiones de estos receptores.

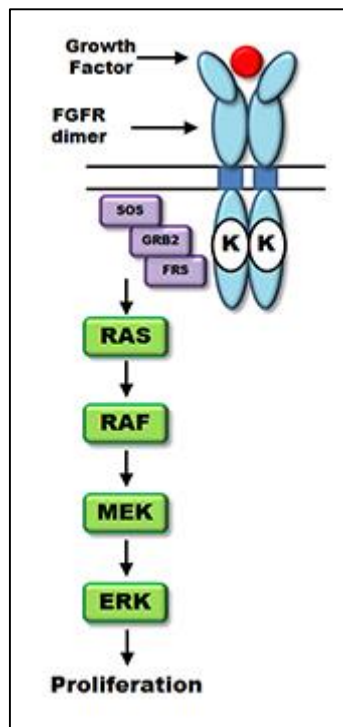


Figura 14: Vía de transducción de señal simplificada de FGFR1.

1.1.4.5.5 *DDR2*

El receptor del dominio discoidina 2 es un receptor tirosina quinasa descubierto en 1990<sup>94,95</sup> y una de cuyas diferencias principales respecto al resto de RTQ consiste en la presencia de un dominio extracelular discoidina (DS)<sup>96</sup>. Además, el ligando que activa la fosforilación de DDR2 es el colágeno I, mientras que en la mayoría de RTQ esta activación se produce por la interacción con un factor de crecimiento, normalmente de origen peptídico<sup>97-99</sup>. La expresión de este receptor es mayor en células de origen mesenquimal como los fibroblastos, miofibroblastos, células del músculo liso y condrocitos de riñón, piel, pulmón, miocardio y tejidos conectivos<sup>94</sup>.

DDR2 presenta una estructura similar a la clásica de los RTQ, formada por tres dominios: extracelular, transmembrana e intracelular, responsable de su actividad enzimática<sup>100</sup>. El DS se encuentra en la región extracelular<sup>101</sup> y la función del dominio transmembrana es la unión del dominio extracelular con el intracelular (Figura 15)<sup>102-104</sup>.

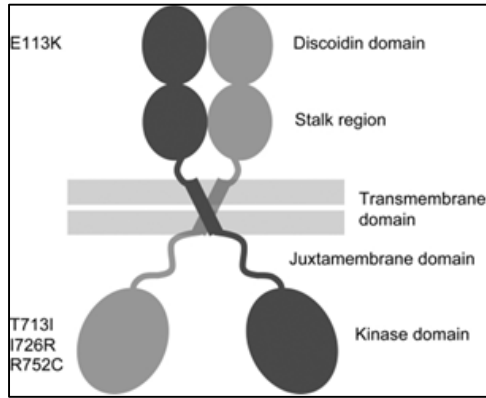


Figura 15: Estructura de un dímero de DDR2 extraída de <sup>105</sup>.

Distintos estudios han demostrado la importancia de DDR2 en procesos celulares fundamentales como la proliferación, supervivencia, diferenciación y adhesión celular. Una regulación incorrecta de este receptor se ha relacionado con distintas patologías, incluyendo fibrosis pulmonar y renal, arterioesclerosis y cáncer<sup>106</sup>.

DDR2 se expresa durante la transición epitelial-mesenquimal (EMT) una transformación celular que está involucrada en distintas etapas del desarrollo embrionario y cancerígeno<sup>107</sup>. Además, se trata de un receptor que se encuentra en la vía de señalización celular de SHP2 que, a su vez, controla la activación de múltiples vías de transducción, entre las que se encuentra la de KRAS<sup>101</sup>(Figura 16).

DDR2 presenta mutaciones con una frecuencia del 2.5–3.8% en carcinomas escamosos de pulmón y del 4% en adenocarcinomas de pulmón. Las alteraciones más habituales son la R105S y la N456S, aunque en menor frecuencia también se han descrito otras como la L239R y la I638F<sup>108</sup>. La sobreexpresión de DDR2 se ha relacionado con una mayor capacidad invasiva y metastásica de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello <sup>109,110</sup>.

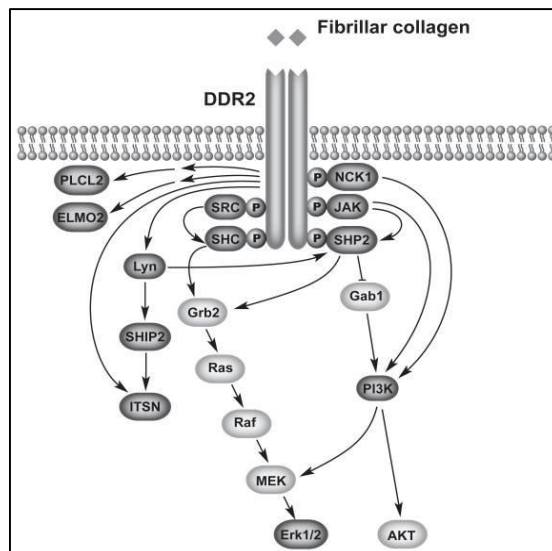


Figura 16: Vía de transducción de señal de DDR2 extraído de <sup>111</sup>.

1.1.4.5.5.1 Inhibidores de DDR2

Dada su relevancia en la progresión cancerígena, *DDR2* constituye un buen candidato como diana antitumoral<sup>106</sup>. Se han estudiado distintas estrategias para el desarrollo de nuevos fármacos inhibidores de este gen (Figura 17).

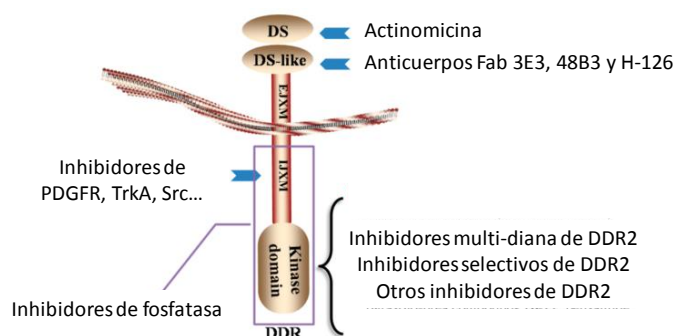


Figura 17: Estrategias para el desarrollo de nuevos inhibidores de DDR2.

Por ejemplo, se ha demostrado que el antibiótico de origen natural actinomicina bloquea eficientemente la interacción DDR2-colágeno I por su unión directa al DS del receptor<sup>112</sup>. Los anticuerpos Fab 3E3, 8b48B3 y H-126 se desarrollaron con el objetivo de interactuar con el DS bloqueando la unión DDR2-colágeno I<sup>113</sup>.

La fosforilación de tirosina situadas en la yuxtamembrana intracelular de DDR2, así como la acumulación de proteínas adaptadoras de señal en esta región celular está regulada por tirosina-quinasas como PDGFR, TrkA, Shc y Src, por lo que compuestos inhibidores de estas proteínas interfieren directamente en la vía de señalización celular de DDR2<sup>114, 115</sup>.

Como en todos los RTQ, la actividad enzimática de DDR2 reside en su dominio quinasa. Por consiguiente, compuestos que interactúen con dicho dominio representan una posible estrategia para la inhibición de las funciones biológicas de DDR2<sup>116</sup>. Este mecanismo de inhibición se ha utilizado en fármacos en uso clínico como gefitinib o erlotinib para inhibir la activación de EGFR<sup>117,118</sup>, ibrutinib para Btk<sup>119</sup>, crizotinib para ALK... (Tabla 3) Debido a las similitudes estructurales en el dominio quinasa, inhibidores de Bcr-Abl como nilotinib y bafetinib, el inhibidor de BRAF sorafenib, el inhibidor de VEGFR pazopanib y el inhibidor de p38 MAPK BIRB796 mostraron efecto inhibidor sobre la fosforilación de DDR2<sup>120,121</sup>.

En este contexto, dasatinib se ha descrito como un inhibidor de DDR2. Inicialmente, se desarrolló como un pan-inhibidor con actividad en Src, BCR/ABL y c-Kit, y fue aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) como alternativa del imatinib y de leucemia linfoblástica aguda positiva para cromosoma Filadelfia<sup>122</sup>. Sin embargo, estudios posteriores en cultivos celulares determinaron una actividad antiproliferativa en el rango nanomolar de dasatinib en líneas portadoras de las mutaciones I638F y L239R de DDR2 (50 nM y 100 nM, respectivamente)<sup>108</sup>. En consecuencia, se iniciaron ensayos clínicos que correlacionaron el estatus mutacional de DDR2 con la respuesta clínica a dasatinib

(NCT01491633 y NCT01514864). No obstante, los efectos adversos al fármaco que presentaron los pacientes obligaron a su detención<sup>123</sup>.

## 1.2 Pirido[2,3-*d*]pirimidinas como inhibidores de proteínas tirosina quinasa

Las moléculas cuyo objetivo sea la inhibición de la fosforilación de un dominio tirosina quinasa deben solucionar los siguientes problemas:

- Falta de potencia de otros fármacos por saturación de sus dianas en el medio celular.
- Toxicidad sobre otras enzimas ATP-dependientes.
- Falta de selectividad sobre dianas específicas por tratarse de regiones muy conservadas.
- Inhibición completa de la autofosforilación de las proteínas quinasas específicas, ya que es el desencadenante de la transducción de señales celulares.
- Biodisponibilidad en condiciones de pH fisiológico.
- No presentar toxicidad ni tampoco ninguno de sus posibles subproductos.
- Propiedades farmacocinéticas adecuadas.

Además, se ha demostrado que si se compara una proteína en forma oncogénica con su forma nativa se observa que la primera mimetiza el estado activado de la segunda, de manera que determinadas mutaciones fijan permanentemente la proteína en su forma activa<sup>124</sup>. Así pues, un inhibidor potente debe fijar la quinasa en una de sus conformaciones inactivas.

En este contexto, la investigación sobre inhibidores del dominio tirosina quinasa se ha centrado en el desarrollo de inhibidores contra el lugar de unión del sustrato o el de unión del ATP, aunque en algunos casos una misma molécula puede inhibir ambos puntos<sup>124</sup>.

La primera familia de compuestos sintetizados como análogos de ATP presentaba una estructura 4-anilinoquinazolina (Figura 18).

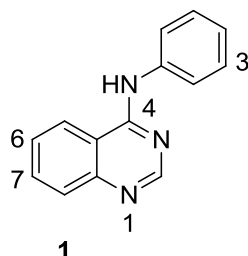


Figura 18: Estructura quinazolínica de inhibidores análogos a ATP.

En este grupo se encuentran fármacos en uso clínico para CPNM como gefitinib o erlotinib. Se trata de agentes inhibidores reversibles competitivos de ATP que interaccionan con los residuos nucleofílicos presentes en el lugar de unión de la ribosa del ATP<sup>125</sup>.

Por otro lado, otra familia de inhibidores competitivos de ATP la forman los sistemas pirimidínicos fusionados con anillos de pirazol, pirrol o pirimidina. Su aparición y posterior desarrollo se debe, principalmente, a Ciba-Geigy y Parke-Davis, conocidos actualmente como Novartis y Pfizer, que desarrollaron los primeros inhibidores pirrolopirimidínicos y piridopirimidínicos (Figura 19)<sup>126, 127</sup>.

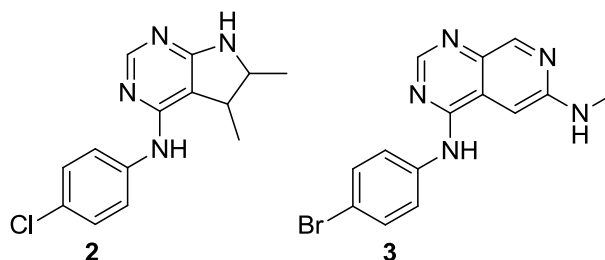


Figura 19: Primeros inhibidores pirrolopirimidínico y piridopirimidínico con potencia relevante.

Estos dos compuestos presentaron valores de actividad de 120 nM y 130 pM frente *EGFR wt in vitro*. Sin embargo, su baja solubilidad en medios fisiológicos no permitió estudios posteriores<sup>126</sup>. Los modos de unión de estas moléculas al RTQ difieren significativamente, en los compuestos piridopirimidínicos sus restos lipófilos penetran en el sitio activo, mientras que en las estructuras pirrolopirimidínicas y pirazolopirimidínicas la interacción con el receptor tiene lugar a través de puentes de hidrógeno en los N pertenecientes a los heterociclos<sup>126</sup>.

Así pues, Parke-Davis desarrolló dos familias adicionales de compuestos con núcleo pirido[2,3-*d*]pirimidínico, que presentaban problemas de solubilidad y un perfil de inhibición demasiado amplio (Figura 20)<sup>127,128</sup>.

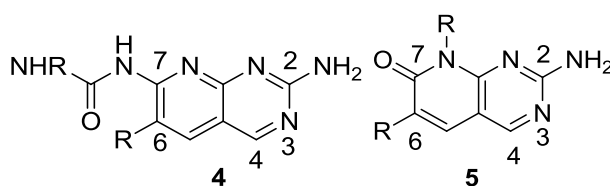


Figura 20: Nuevas familias de pirido[2,3-*d*]pirimidinas.

Sin embargo, de su desarrollo y posterior estudio se obtuvieron conclusiones relevantes:

- Los nitrógenos en N3 y el exocíclico se unen con la proteína quinasa de manera análoga a la adenina.
- Los residuos aromáticos en C6 se introducen en el centro de unión no ocupado por el ATP y es conveniente que tengan un grupo voluminoso que fuerce la rotación. Estos residuos median la potencia y la selectividad.
- Los grupos unidos a C2 se encuentran expuestos al disolvente, ya que quedan situados en la parte más externa de la cavidad de unión. Por ello son recomendables grupos que favorezcan la solubilización del compuesto. Paralelamente, la presencia de grupos aromáticos favorece la interacción hidrofóbica con la enzima, aportando potencia extra. En consecuencia, es imprescindible alcanzar un equilibrio entre ambos factores.

Teniendo presente todas estas implicaciones se sintetizaron los compuestos de la Figura 21. Mientras la primera molécula presentaba una gran selectividad frente a FGFR<sup>127</sup> la segunda resultó ser un compuesto de amplio espectro que no tan solo era capaz de inhibir tirosinas sino también serina/treonina-quinasas<sup>129</sup>. Así pues, se demostró que de un mismo núcleo central (Figura 21) se podían derivar moléculas con propiedades seleccionadas siempre y cuando se encontrase un sustituyente adecuado.



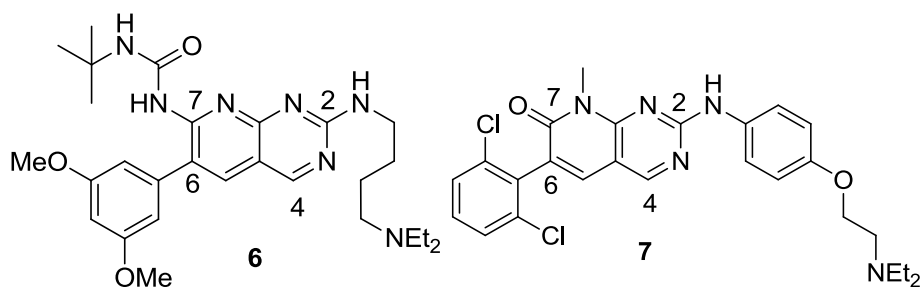


Figura 21: Leads de las nuevas familias pirido[2,3-*d*]pirimidinas.

En este contexto se han estudiado extensamente las posibles modificaciones de la estructura central necesarias con el objetivo de mejorar la potencia, la solubilidad, la penetración celular, la biodisponibilidad y la toxicidad selectiva de estas estructuras.

### 1.2.1 Síntesis heterocíclica en el Grup d'Enginyeria Molecular (GEM)

Los sistemas pirido[2,3-*d*]pirimidínicos (Figura 22) presentan una actividad interesante en tejidos tumorales y proteínas alteradas en los mismos, lo cual los hace potenciales fármacos anticancerígenos. Así pues, fármacos como ibrutinib, gefitinib o erlotinib, cuyo uso clínico está ampliamente extendido, contienen anillos pirimidínicos en su estructura.

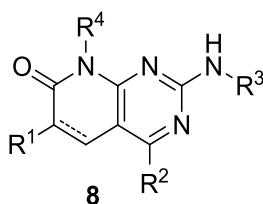


Figura 22: Estructura pirido[2,3-*d*]pirimidinica.

En este sentido el grupo de ingeniería molecular (GEM) posee una amplia experiencia en la síntesis de este tipo de compuestos, para los cuales se han desarrollado distintas estrategias sintéticas en los últimos años, que se resumen en el siguiente esquema (Figura 23).

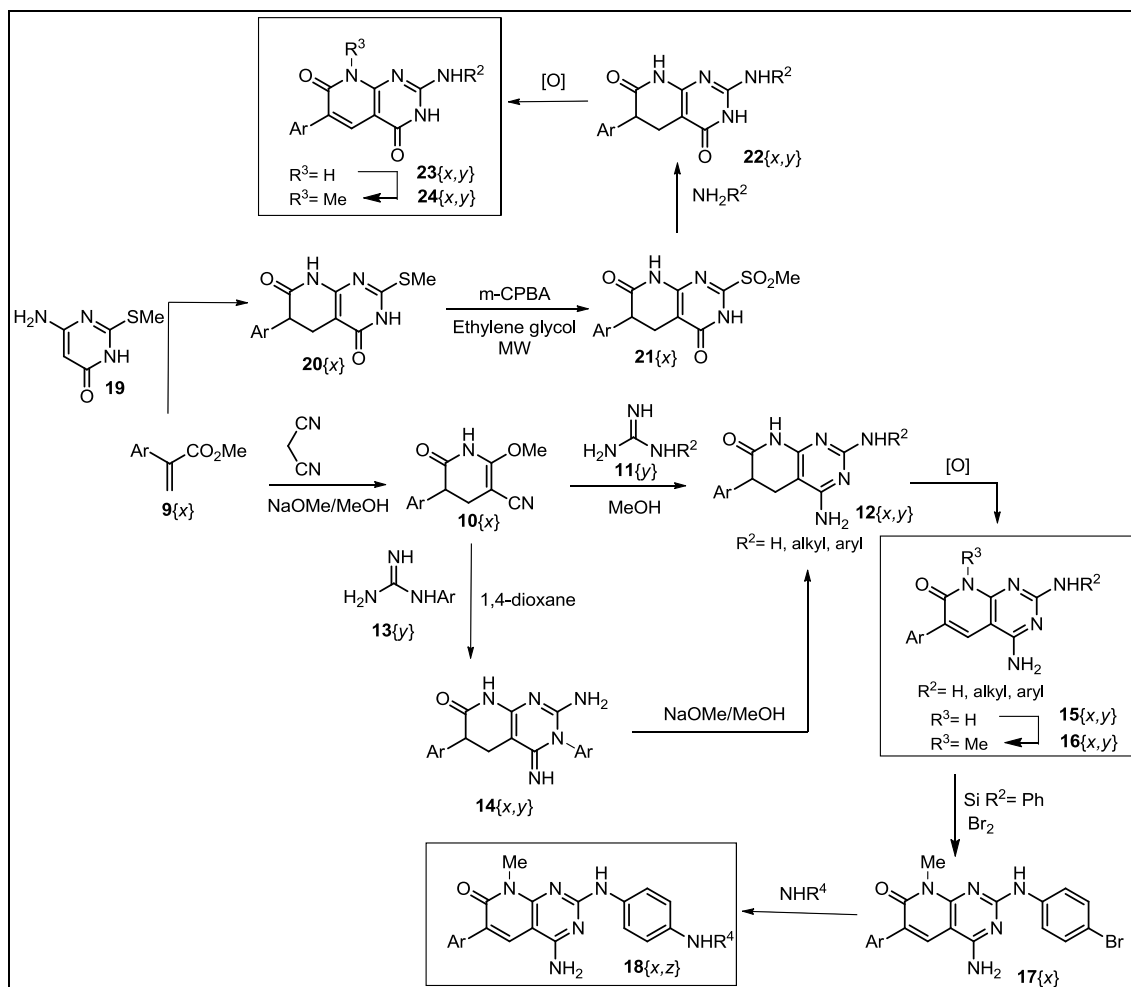


Figura 23: Esquema sintético para la obtención de pirido[2,3-*d*]pirimidinas.

Las 4-amino-5,6-dihidropirido[2,3-*d*]pirimidin-7-(8*H*)-onas (**12**{*x,y*}) se obtienen a partir de ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados **9**{*x*}. El intermedio clave para su formación son los 2-metoxi-6-oxo-1,4,5,6-tetrahydropiridin-3-carbonitrilos (**10**{*x*}), resultado de la reacción de un éster  $\alpha,\beta$ -insaturado **9** con malononitrilo en NaOMe/MeOH. Finalmente, el tratamiento de las piridonas **10**{*x*} con sistemas guanidínicos **11**{*y*} rinde las 4-amino-pirido[2,3-*d*]pirimidinas (**12**{*x,y*})<sup>128</sup>.

Más recientemente, se han desarrollado protocolos de deshidrogenación de 5,6-dihidro[2,3-*d*]pirimidin-7(8*H*)-onas (**12**{*x,y*}) a pirido[2,3-*d*]pirimidin-7(8*H*)-onas<sup>129</sup> (**15**{*x,y*}) y una metodología para la síntesis de 4-amino-5,6-dihidropirido[2,3-*d*]pirimidin-7-(8*H*)-onas 2-arilaminosustituidas, (**12**{*x,y*}), a través de la correspondiente piridopyrimidina 3-arilsustituida **14**{*x,y*}. Esta última se obtiene por reacción de la piridona **10**{*x*} con una arilguanidina **13**{*y*}, en dioxano. El posterior reordenamiento de Dimroth en NaOMe/MeOH de **14**{*x,y*} resulta en la 4-aminopyridopyrimidina **12**{*x,y*} esperada. Finalmente, el uso de yoduro de metilo como sustrato para la sustitución nucleofílica de las estructuras **15**{*x,y*} resulta en las estructuras **16**{*x,y*} en que el nitrógeno lactámico presenta un grupo metilo.

Los rendimientos obtenidos por esta metodología formada por dos pasos sintéticos son superiores, en general, a los obtenidos de la reacción directa entre una piridona **10**{*x*} y una guanidina arilsustituida **11**{*y*}<sup>130</sup>.

Cuando en la posición de C2 del anillo pirimidínico de **16**{x,y} hay un resto fenilamino, es posible proceder a la bromación en la posición *para* de este sustituyente para obtener los sistemas bromados **17**{x}. La posterior reacción de Ullman permite la sustitución del bromo por aminas y alcoholes para rendir términos derivatizados en dicha posición **18**{x,z}.

Con el objetivo de introducir un grupo oxo en la posición C4 de la pirido[2,3-*d*]pirimidina se desarrolló recientemente una nueva estrategia <sup>131-133</sup>. La reacción de ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados **9**{x} con la 6-amino-2-(metiltio)pirimidin-4(3*H*)-ona **19** con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como base en 2-propanol a 170 °C durante 3 horas en calefacción con microondas resulta en los sistemas 4-oxo[2,3-*d*]pirimidínicos (**20**{x,y}) <sup>132,134,135</sup>. La oxidación con *m*-CPBA en etilenglicol bajo irradiación por microondas rinde las sulfonas **21**{x,y}, las cuales por tratamiento posterior con la amina correspondiente rinden las estructuras 4-oxo-5,6-dihidro[2,3-*d*]pirimidin-7(8*H*)-onas, **22**{x,y}, que por oxidación conducen a las moléculas deseadas, **23**{x,y}. La metilación con yoduro de metilo de dichas moléculas rinde la estructura final **24**{x,y}.

Así pues, se consiguen sistemas pirido[2,3-*d*]pirimidínicos sustituidos en C4, ya sea por un grupo amino, **15**{x,y}, o por un hidroxilo en su forma tautomérica, **22**{x,y}, no conseguidos por Parke-Davis en sus estudios <sup>136</sup>.

### 1.2.2 Evaluación biológica preliminar de pirido[2,3-*d*]pirimidinas sintetizadas por el GEM

Tal y como ya se ha comentado anteriormente, inhibidores de tirosina quinasa disponibles, tienen estructuras pirimidínicas. Por este motivo, en 2010, el GEM llevó a cabo evaluaciones biológicas preliminares de algunas de sus moléculas que tenían dicha estructura. Estas evaluaciones *in vitro* fueron realizadas por la empresa Proqinase (www.proqinase.com/; Friburgo, Alemania) frente a diversos receptores tirosina quinasa aislados. Se seleccionaron 10 receptores implicados en diversos procesos tumorales. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Actividad residual de las proteínas seleccionadas después de ser tratadas con los compuestos sintetizados por el GEM. En blanco actividades >80%, en rojo entre el 80 y el 60%, en amarillo entre el 60 y el 40% y en verde inferiores al 20%.

Compuesto	CDK2/ CycA	EGF- R	ERBB2	FGF-R1	GSK3- $\beta$	IGF1- R	PDGFR- $\alpha$	SRC	VEGF- R2	WEE1
IQS 20100713.01	105	47	60	23	102	98	42	16	36	21
IQS 20100713.02	79	9	18	3	92	62	28	1	4	73
IQS 20100713.03	104	6	26	4	86	73	5	1	4	4
IQS 20100713.04	93	68	75	71	82	95	86	52	86	39
IQS 20100713.05	102	13	27	9	103	54	15	1	12	8
IQS 20100713.06	103	24	50	87	98	94	104	100	90	101
IQS 20100713.07	104	63	88	95	103	95	92	61	88	99

## INTRODUCCIÓN

Compuesto	CDK2/ CycA	EGF- R	ERBB2	FGF-R1	GSK3- $\beta$	IGF1- R	PDGFR- $\alpha$	SRC	VEGF- R2	WEE1
IQS 20100713.08	98	77	89	76	92	71	96	90	98	98
IQS 20100713.09	86	34	35	37	95	72	91	68	50	83
IQS 20100713.10	91	54	47	43	100	36	78	57	37	84

Como se puede observar, se obtuvieron resultados interesantes para tres de las moléculas enviadas, ya que la actividad residual en algunas de las proteínas sometidas a estudio era inferior al 20% (verde) (Tabla 5).

Así pues, dada su potencial actividad como inhibidores de tirosina quinasas, se estableció una colaboración con el grupo de la Dra. Dolors Colomer del IDIBAPS ([www.idibaps.org/](http://www.idibaps.org/); Barcelona, España) con el objetivo de desarrollar compuestos con actividad antileucémica.

En este contexto, se sintetizó una quimioteca de compuestos 4-aminopirido[2,3-*d*]pirimidínicos con un resto 2,6-diclorofenil en la posición R<sup>1</sup> del sistema piridopirimidínico (Figura 24), cuya actividad se ensayó en dos líneas celulares de linfoma de manto, la HBL-2 y la Rec-1 (Tabla 6).

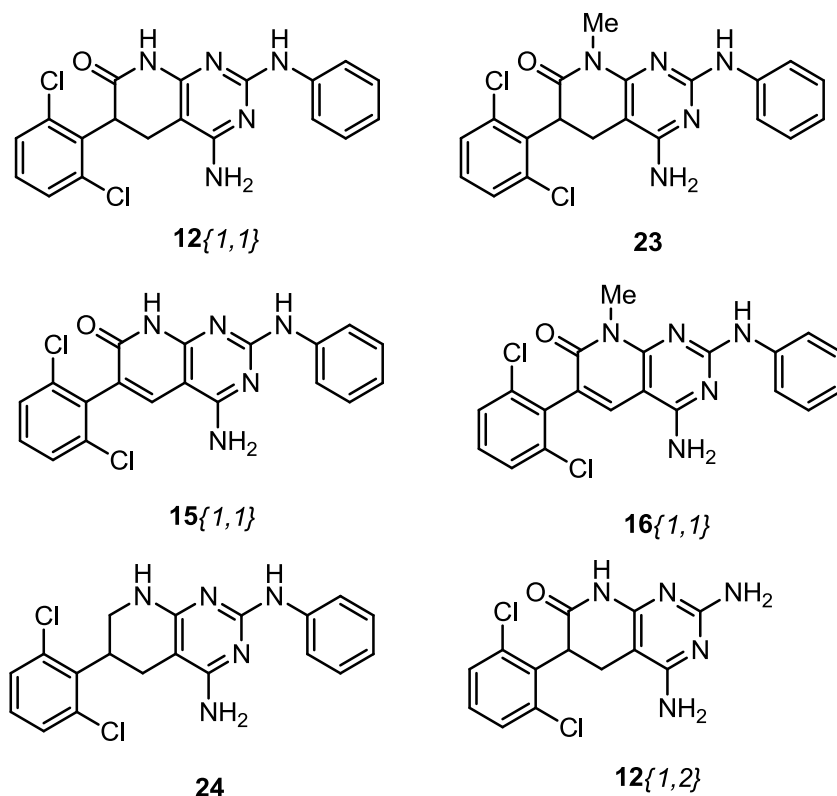


Figura 24: Estructuras de los primeros compuestos seleccionados para ser estudiados en líneas celulares de linfoma de manto.

## INTRODUCCIÓN

Tabla 6:  $GI_{50}$  a 24 y 48 horas de los compuestos **23**, **24**, **16**, **25**, **26** y **27** en líneas celulares de linfoma de manto HBL-2 y Rec-1.

Compuesto	HBL-2		Rec-1	
	$GI_{50}$ at 24h ( $\mu\text{M} \pm \text{SD}$ )	$GI_{50}$ a 48h ( $\mu\text{M} \pm \text{SD}$ )	$GI_{50}$ a 24h ( $\mu\text{M} \pm \text{SD}$ )	$GI_{50}$ a 48h ( $\mu\text{M} \pm \text{SD}$ )
<b>12</b> {1,1}	$12,0 \pm 0,05$	$5,7 \pm 0,01$	> 100	$52,3 \pm 0,03$
<b>15</b> {1,1}	$8,8 \pm 0,02$	> 100	$12,1 \pm 0,01$	> 100
<b>16</b> {1,1}	$1,7 \pm 0,06$	$0,4 \pm 0,04$	$1,8 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,01$
<b>23</b>	> 100	$1,7 \pm 0,1$	$67,2 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,02$
<b>24</b>	$7,5 \pm 0,02$	$2,4 \pm 0,01$	$4,0 \pm 0,02$	$1,3 \pm 0,01$
<b>12</b> {1,2}	> 100	> 100	> 100	> 100

Los resultados obtenidos mostraron la buena actividad de **16**{1,1} (Tabla 6). La especificidad de esta molécula fue evaluada a concentraciones crecientes y 24 horas en células mononucleares de sangre periférica de dos pacientes sanos. Se observó que a las concentraciones a las que **16**{1,1} mostraba actividad en células tumorales en las sanas tan sólo un 3% entraban en apoptosis, demostrando así la especificidad del compuesto por las células malignas.

Uno de los principales problemas de este tipo de estructuras es la baja solubilidad en agua, de manera que se decidió funcionalizar **16**{1,1} por la posición *para* del sustituyente 2-fenilamino (Figura 25)<sup>137</sup>. Este cambio en la estructura de partida debía aportar una mejora en la solubilidad del compuesto sin empeorar su actividad. Tres compuestos nuevos se evaluaron en las líneas celulares anteriores. Solo uno de ellos, el compuesto **18**{1,1} (Tabla 7), dio unos resultados interesantes, aunque ligeramente inferiores a los de **16**{1,1}. Por ello, se decidió continuar su estudio y desarrollo.

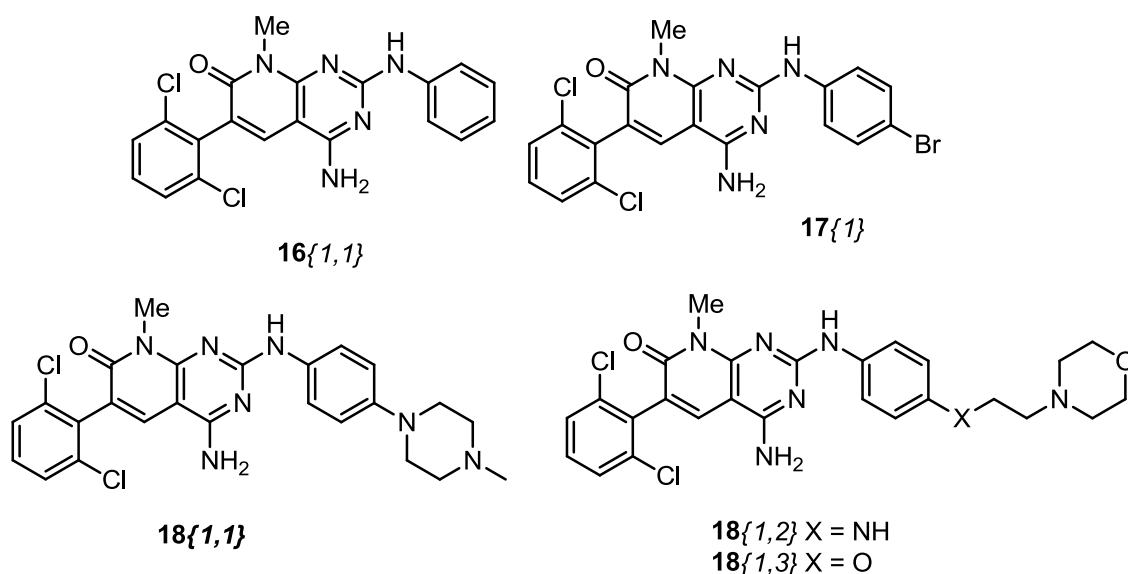


Figura 25: Compuestos derivados de **16**{1,1}.

## INTRODUCCIÓN

Tabla 7:  $GI_{50}$  a 24 y 48 horas de **16{1,1}** y **18{1,1}** en líneas celulares de linfoma de manto HBL-2 y Rec-1.

Compuesto	HBL-2		Rec-1	
	$GI_{50}$ at 24h ( $\mu\text{M} \pm \text{SD}$ )	$GI_{50}$ a 48h ( $\mu\text{M} \pm \text{SD}$ )	$GI_{50}$ a24h ( $\mu\text{M} \pm \text{SD}$ )	$GI_{50}$ a 48h ( $\mu\text{M} \pm \text{SD}$ )
<b>16{1,1}</b>	1,7 $\pm$ 0,06	0,4 $\pm$ 0,04	1,8 $\pm$ 0,02	0,7 $\pm$ 0,01
<b>18{1,1}</b>	4,9 $\pm$ 0,01	2,6 $\pm$ 0,02	3,2 $\pm$ 0,01	3,0 $\pm$ 0,04

Se ensayó el efecto inhibitor de **18{1,1}** en 20 líneas celulares procedentes de linfomas No-Hodgkin, en todas ellas la actividad del compuesto estaba entre 1,3 y 6,9  $\mu\text{M}$  a 24 horas, y entre 1,4 y 7,2  $\mu\text{M}$  a 48 horas.

Finalmente, se comparó la actividad antitumoral de **18{1,1}** con ibrutinib, un inhibidor de Btk cuyo uso está ampliamente extendido, y con R406, un inhibidor de Syk. Los resultados obtenidos mostraron la capacidad del nuevo compuesto para inducir una reducción del 63% en la proliferación de la línea celular Rec-1, dato significativamente mejor que el 31% observado para R406, y el 3% de ibrutinib. Paralelamente, se realizaron los estudios de *western blot* en los que se determinó el efecto de cada uno de los inhibidores sobre la activación de *p*-Syk, *p*-Lyn y *p*-Btk a 6 horas. **18{1,1}** y R406 inhibían la fosforilación de las tres quinasas, mientras que ibrutinib producía una leve disminución de *p*-Lyn y *p*-Btk pero no *p*-Syk (Figura 26). Se determinó el efecto sobre estas tres proteínas ya que su relevancia clínica en linfoma ha sido ampliamente estudiada

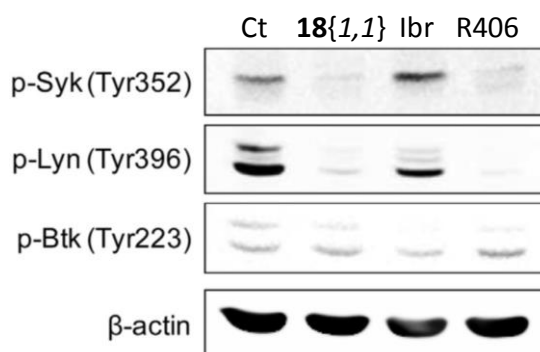


Figura 26: Western blot en la línea celular Rec-1 para comparar el efecto inhibitor de **18{1,1}**, ibrutinib y R406 en la activación de Syk, Lyn y Btk, la dosis utilizada de cada uno de los inhibidores fue de 2,5  $\mu\text{M}$ . Imagen extraída de<sup>137</sup>.

En este contexto, se contactó con el Dr. Rafael Rosell del Instituto Oncológico Rosell con el fin de ampliar los estudios de actividad de los sistemas pirido[2,3-*d*]pirimidínicos a tumores sólidos (concretamente cáncer de pulmón). Como consecuencia, se estableció un convenio de colaboración entre el GEM y Pangaea Oncology S.A. que constituyó la base del presente proyecto de doctorado industrial. Pangaea Oncology S.A. es una empresa cuya misión es generar un nuevo enfoque de la oncología terapéutica basada en modelos personalizados, para incorporarlos a la práctica clínica habitual. Sus estudios están focalizados principalmente en la investigación de carcinomas pulmonares, aunque su creciente expansión ha permitido su ampliación a otras histologías tumorales.



# OBJETIVOS





## 2 Objetivos

El objetivo general de esta Tesis ha sido el desarrollo de inhibidores de quinasas basados en estructuras pirido[2,3-*d*]pirimidínicas, la evaluación de su eficacia en modelos preclínicos de cáncer de pulmón y el estudio de sus mecanismos de acción celulares y moleculares.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto *in vitro* de derivados pirido[2,3-*d*]pirimidínicos sobre el crecimiento de líneas celulares tumorales, particularmente de cáncer de pulmón. Comparar los efectos con los observados en líneas no tumorales
2. Determinar el mecanismo de acción celular y molecular de los derivados con mayor efecto en modelos preclínicos y establecer sus posibles dianas celulares.
3. Diseñar y sintetizar análogos a fin de mejorar las propiedades antitumorales de los compuestos pirido[2,3-*d*]pirimidínicos.
4. Determinar la acción *in vivo* sobre tumores implantados en ratones atímicos del compuesto con mayor efecto en modelos preclínicos.



# MATERIALES Y MÉTODOS



## 3 Materiales y métodos

### 3.1 Materiales

#### 3.1.1 Reactivos

- PBS 1X (LIFE TECHNOLOGIES, Carlsbad, California; Estados Unidos)
- Etanol absoluto (MERCK, Darmstadt; Alemania)
- Agua destilada estéril y aspirógena (B. BRAUN MEDICAL, Terrassa; España)
- RPMI 1640 (LIFE TECHNOLOGIES)
- L-Glutamina/Estrepto/Penicilina (LIFE TECHNOLOGIES)
- FBS (LIFE TECHNOLOGIES)
- Tripsina (LIFE TECHNOLOGIES)
- DMSO (SIGMA-ALDRICH, San Luis, Misuri; Estados Unidos)
- Solución TBE x 10 (LIFE TECHNOLOGIES)
- Agarosa (ECOGEN, Barcelona; España)
- Superladder-low (LIFE TECHNOLOGIES)
- Kit Micoplasma VENOR GEM (MINERVA BIOLABS, Berlin; Alemania)
- MTT (ALFA AESAR, Karlsruhe; Alemania)
- PMSF (SIGMA-ALDRICH)
- Pervanadato sódico (LONZA, Basilea; Suiza)
- Cóctel de inhibidores (ROCHE, Basilea; Suiza)
- Tampón RIPA (CELL SIGNALLING, Danvers, MA; United States)
- Acrilamida:Bisacrilamida al 30% (BIORAD, Hércules, California; Estados Unidos)
- SDS (LONZA)
- Persulfato amónico (BIORAD)
- TEMED (BIORAD)
- Tampón de Running 10x (BIORAD)
- Tampón de Transferencia 10x (BIORAD)
- Odyssey blocking buffer (PBS) (LI-COR, Lincoln, Nebraska; Estados Unidos)
- Metanol (MERCK)
- Mercaptoetanol (BIORAD)
- Tampón de carga de electroforesis (LIFE TECHNOLOGIES)
- Marcador de proteína preteñido (LIFE TECHNOLOGIES)
- Tris (MERCK)
- TBS 10X (BIORAD)
- NaCl (MERCK)
- Tween-20 (SIGMA-ALDRICH)
- BSA (PIERCE, Dallas, Texas; Estados Unidos)
- Tritón X-100 (VWR, Barcelona; España)
- Cytoselect 96-well in Vitro Tumor Sensitivity Assay (Soft Agar Colony Formation) (Cell Biolabs, San Diego, CA; Estados Unidos)

### 3.1.2 Material fungible

- Puntas para pipetas automáticas de 10, 20, 100, 200 y 1000  $\mu$ l. Nucleid Acid and Nuclease Free; Non-Pyrogenic; Certified Pure (SARSTEDT, Nümbrecht; Alemania)
- Pipetas de 1, 2, 5, 10 y 25 mL. QSP Quality Scientific Plastics (SARSTEDT)
- Pipetas Pasteur de plástico (SARSTEDT)
- Pipetas Pasteur de vidrio (SARSTEDT)
- Eppendorfs de 1.5 mL y de 1 mL QSP Quality Scientific Plastics (SARSTEDT)
- Tubos de 15 y 50 mL. QSP Quality Scientific Plastics (SARSTEDT)
- Guantes Quality Standard (DDBIOLAB, Barcelona; España)
- Frascos T-25 y T-75. QSP Quality Scientific Plastics (SARSTEDT)
- Reservorios (VWR)
- Scrappers (SARSTEDT)
- Criotubos (SARSTEDT)
- Cámara de Newbauer (BRAND, Wertheim; Alemania)
- Placas 96 pocillos (SARSTEDT)
- Placas 96 pocillos con Colágeno I (SARSTEDT)
- Parafilm (VWR)
- Membranas PVDF o nitrocelulosa (BIORAD)
- Papel transparente duro y blando (BIORAD)
- Papel de filtro (BIORAD)
- Papel whatman (BIORAD)
- Esponjas (BIORAD)
- Pinzas (VWR)

### 3.1.3 Equipos

- Pipetus (SIGMA-ALDRICH)
- Cabina de seguridad biológica (TELSTAR, Terrassa; España)
- Cabina de flujo laminar (NUAIRE, Plymouth, Minnesota; Estados Unidos)
- Bomba de vacío (NIRCO, Madrid; España)
- Bomba (COMECTA, Barcelona; España)
- Nevera (LIEBHERR, Kirchdorf; Alemania)
- Incubador de CO<sub>2</sub> (NUAIRE y BINDER, Tuttlingen; Alemania)
- Válvulas de presión y bombona de CO<sub>2</sub> (LINDE, Múnich; Alemania)
- Autoclave (JP SELECTA, Barcelona; España)
- Centrífuga (LABNET, Edison, Nueva Jersey; Estados Unidos)
- Congeladores -80°C y -140°C (NUAIRE)
- Termociclador (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, California; Estados Unidos)
- Sistema de documentación de geles (ECOGEN)
- Vortex (HEIDOLPH, Múnich; Alemania)
- Agitadores Orbital (COMECTA)
- Agitadores Orbital (ECOGEN)
- Lector de placas modelo ANTHOS 2020 (BioTek, Winooski; Estados Unidos)

- Centrífuga refrigerada (HERMLE, Wehingen; Alemania)
- Termobloque (baño seco) (GRANT-BIO, Cambridge; Reino Unido)
- Campana extractora de gases (FLORES VALLES, Madrid; España)
- Mini-PROTECAN-Tetra Cell (BIORAD)
- Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIORAD)
- Trans-Blot Turbo Blotting System (BIORAD)
- Fuente de alimentación (ECOGEN)
- Equipo revelado (BIORAD)
- Secuenciador ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- Sequencing Analysis 5.2 Software (Applied Biosystems)

### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Ensayo en proteína quinasa aislada

Para la determinación de la actividad de las proteínas quinasas seleccionadas se empleó el método radiométrico 33PanQinase® Activity Assay. Esta técnica se llevó a cabo por la empresa Proqinase.

Todos los estudios proteicos se realizaron en placas de 96 pocillos en un volumen de reacción de 50  $\mu$ l. La mezcla de reacción empleada fue:

- 10  $\mu$ l de solución de ATP no-radioactivo, en agua.
- 25  $\mu$ l de mezcla de tampón de ensayo con [ $\gamma$ -33P]-ATP.
- 5  $\mu$ l de muestra control en 10% de DMSO.
- 10  $\mu$ l de mezcla de enzima/sustrato.

El tampón de ensayo contenía HEPES 70 mM a un pH=7,5 ajustado con NaOH, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, ortovanadato sódico 3  $\mu$ M, DTT 1,2 mM, ATP (a concentraciones variables en función del valor de la constante aparente de ATP con la respectiva quinasa), [ $\gamma$ -33P]-ATP (aproximadamente 8\*10<sup>5</sup> cpm por pocillo), proteína quinasa (cantidades variables) y sustrato (cantidades variables).

Adicionalmente, los tampones para CAMK1D, CAMK2A, CAMK2B, CAMK2D, CAMK4, CAMKK1, CAMKK2, DAPK2, EEF2K, MYLK, MYLK2 y MYLK3 contenían 1  $\mu$ g/mL Calmodulin y CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM. Igualmente, los tampones de PRKG1 y PRKG2 contenían cGMP 1  $\mu$ M extra.

Todas las proteínas quinasas utilizadas por Proqinase estaban expresadas en células de insectos Sf9 o en *Escherichia Coli* como proteínas recombinantes de fusión de GST o como proteínas His-tagged. Todas las quinasas se generaron a partir de cADNs humano y purificadas por cromatografía de afinidad GSH. La pureza de dichas proteínas se determinó por tinción con SDS-PAGE/Coomassie y su identidad se comprobó por espectrometría de masas.

La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 60 minutos y la reacción se detuvo con 50  $\mu$ l de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2% (v/v). Las placas se aspiraron y se lavaron dos veces con 200  $\mu$ l de 0,9 % (w/v) NaCl. Todos los estudios se hicieron con el sistema robótico BeckmanCoulter Biomek 2000/SL.



La incorporación del <sup>33</sup>Pi (contado como “cpm”) se determinó con el contador Microplate Scintillation (Microbeta, Wallac).

### 3.2.1.1 *Evaluación de los datos*

#### 3.2.1.1.1 *Cálculo de la actividad residual*

Para cada quinasa el valor medio en cpm de los tres pocillos se definió como control negativo (n=3). Este valor reflejaba el valor de unión inespecífica a la placa sin proteína quinasa, pero con la presencia del sustrato. Adicionalmente, para cada quinasa el valor medio en cpm de otros tres pocillos se consideró como control positivo. La diferencia entre estos dos controles de cada enzima se utilizó como el 100% de actividad. El control negativo de cada quinasa se restó del control positivo, así como de los correspondientes valores para los compuestos. Finalmente, el valor de la actividad residual de cada proteína en presencia del compuesto determinado se calculó:

Actividad res. (%) = 100 X [(señal del compuesto – control negativo) / (control positivo– control negativo)]

La actividad residual y las IC<sub>50</sub>s de cada concentración de los compuestos se calcularon utilizando Quattro Workflow V3.1.0 (Quattro Research GmbH, Munich, Germany; [www.quattro-research.com](http://www.quattro-research.com)). El modelo adecuado para la determinación de las IC<sub>50</sub>s fue *Sigmoidal response* (de pendiente variable) con los parámetros fijados a 100% para *top* y a 0% para *bottom*. El método de ajuste utilizado fue un ajuste por mínimos cuadrados.

### 3.2.2 *Cultivo celular*

#### 3.2.2.1 *Mantenimiento de las líneas celulares*

##### 3.2.2.1.1 *Preparación de reactivos*

Suero: antes de usar el suero se incubó a 54°C durante 20 min para inactivarlo. Una vez inactivado, se dejó atemperar, se dividió en alícuotas de 50 mL y se guardaron a -20°C.

L-Glutamina: la disolución de L-glutamina comercial empleada x100 incluía los antibióticos penicilina 100 unidades/mL, estreptomina 100 µg/mL y gentamicina 50 µg/mL. Cuando se recibió, se almacenó la botella a -20°C. Antes de usarla, se descongeló y agitó para disolver la L-glutamina. Se dividió en alícuotas de 5 mL y se guardaron de nuevo a -20°C.

Medio de cultivo: existen distintos medios de cultivo adecuados para diferentes tipos de líneas celulares, en nuestro caso se utilizó RPMI, comercial e incompleto, es decir, con todos los componentes necesarios para el crecimiento celular excepto suero y L-glutamina, tamponado para obtener un pH fisiológico en atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. Se almacenó a 4°C. Antes de empezar a trabajar con el medio se complementó adicionando 50 mL de FBS inactivado y 5 mL de L-glutamina a 0,5 L de RPMI. Se guardó el medio completo a 4°C y se marcó en la botella la fecha de preparación (es estable alrededor de 2 meses).

Tripsina: la tripsina comercial tenía una concentración x10 y se requería una x3, por lo que se hicieron diluciones 1/3. Se dividió la tripsina comercial x10 en alícuotas de 13 mL a las que se adicionaron 30 mL de medio incompleto. De esta manera se obtuvo tripsina con una concentración final x3. La tripsina diluida y alícuotada se guardó a 4°C.

### 3.2.2.1.2 Congelación de células

Para el trabajo con líneas celulares se debía mantener un “stock” congelado de las mismas al que poder recurrir. Asimismo, es conveniente no rebasar un cierto número de pasos con las células en cultivo. Para ello, periódicamente se descartaron los cultivos con los que se estaba trabajando y se descongeló un nuevo vial de la línea (con un nº de pasos significativamente menor). De manera periódica se congeló un vial que sustituyera al vial descongelado, nada más descongelar uno nuevo.

Las células se congelaron en medio completo con un 20% de FBS y un 10% de DMSO. El DMSO es tóxico a temperatura ambiente y las células deben estar el menor tiempo posible en contacto con él antes de la congelación.

El proceso de congelación se realizó en un contenedor de isopropanol que se introducía en el congelador de -80°C. El isopropanol aseguraba que la temperatura descendiera 1°C por minuto, pues un descenso brusco resultaría letal para las células.

1. Se atemperó el contenedor de isopropanol. Se reemplazó el isopropanol si este se había utilizado 5 veces para congelar.
2. Se obtuvo un sedimento de células por tripsinización (líneas unidas al sustrato) o centrifugación (líneas en flotación).
3. Se resuspendió en seco.
4. Se añadió medio de congelación frío; 1,5-2 mL si el sedimento provenía de un T-75 y 1 mL si era de un T-25. Se homogeneizó.
5. Se distribuyeron alícuotas de 1 mL, de la suspensión celular, en viales de congelación. Los viales se rotularon con el nombre de la línea, el nº de pasos y la fecha.
6. Se colocaron los viales en el contenedor de isopropanol, que a continuación se introdujeron en el congelador de -80°C.
7. Al día siguiente, se sacaron los viales del contenedor y se guardaron en su ubicación específica y definitiva en el congelador de -150°C.

### 3.2.2.1.3 Descongelación de células

Las células se congelaron en medio completo con un 20% de FBS y un 10% de DMSO. Este último es tóxico y, durante el proceso de descongelación, las células deben estar el menor tiempo posible en contacto con él.

1. Se calentó (37°C) el medio de cultivo.
2. Se sacó el vial con las células del congelador de -150°C y se descongeló rápidamente en un baño a 37°C.
3. Se transfirieron las células descongeladas a un tubo de 15 mL.

4. Se añadieron 5 o 6 volúmenes de medio de cultivo, primero gota a gota y luego a “golpes” de 0,5 a 1 mL. Se agitó cada vez que se añadía medio. Este proceso era necesario para diluir de manera lenta el DMSO que contenían las células.
5. Se centrifugaba el tubo a 1500 rpm, durante 5 min, a temperatura ambiente.
6. Mientras se centrifugó, se dispensó en los frascos, en que se iban a sembrar, el medio de cultivo necesario (unos 5 mL por T25, 15 mL por T75).
7. Se retiró el sobrenadante del tubo por aspiración.
8. Se resuspendió el sedimento (células) en 1-2 mL de medio de cultivo. Se homogeneizaron las células y se transfirieron a un frasco (T25 o T75 en función del número de células, es decir según el tamaño del sedimento).
9. Se rotuló el frasco con el nombre de la línea, el número de pasos, la fecha y el medio de cultivo.
10. Se comprobó en el microscopio de fluorescencia si las células estaban en buen estado (refringentes).
11. Se mantuvieron en el incubador a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.2.1.4 *Mantenimiento de los cultivos*

Los cultivos celulares se mantuvieron en el incubador de CO<sub>2</sub>, a una temperatura (37°C), un porcentaje de CO<sub>2</sub> del 5% y una humedad relativa adecuadas para el crecimiento de las células. Era necesario tener en cuenta que:

- Los cultivos se observaban al microscopio un mínimo de dos días a la semana, no consecutivos.
- El medio de cultivo se cambiaba un mínimo de una vez a la semana. También si se veía muy sucio o si viraba a amarillo. Esto último indicaba un cambio de pH, pues el color del medio se debe al rojo fenol, un indicador de pH.
- Si las células estaban confluentes o se aproximaban a la confluencia, se debían tripsinizar.
- Cuando se observaban los cultivos al microscopio, se comprobaba también que no estuviera contaminados. Los tres tipos más habituales de contaminación son:
  - Hongos: Aparecen como largos filamentos (las hifas) refringentes.
  - Levaduras: En forma de esferas, más o menos alargadas, refringentes y más pequeñas que las células, y que pueden formar cadenas.
  - Bacterias: Pequeños puntos esféricos (opacos) o bastoncillos, con movimiento propio o browniano. Si su número es muy grande, forma una especie de “arenilla” que cubre las células.
  - Micoplasmas: son parásitos intracelulares que carecen de pared celular, por lo que no son sensibles a los antibióticos que bloquean la síntesis de la pared celular, como la penicilina u otros antibióticos betalactámicos.

En caso de contaminación de los cultivos se eliminó y se limpió el incubador inmediatamente. A excepción de la contaminación por micoplasmas, en este caso se eliminó el cultivo celular, el medio, el PBS y la tripsina en uso en ese momento, se limpió el incubador con espray desinfectante de micoplasmas.

3.2.2.1.5 Test de micoplasmas

Los micoplasmas son microorganismos que no provocan cambios observables a simple vista o al microscopio, pero afectan a los cultivos celulares. Su determinación se basa en la realización de una PCR por secuencias comunes.

Se realizó el test para la determinación de micoplasmas mensualmente y también a todas las líneas celulares que se cultivaron por primera vez en el laboratorio.

1. Se recogió 1 mL de medio de un cultivo al 80% de confluencia (mínimo).
2. Se calentó durante 5 minutos a 95°C.
3. Se centrifugó 5 seg a velocidad máxima.
4. Se preparó la "master mix" (los volúmenes están indicados en µl) (Tabla 8).

Tabla 8: Volúmenes de reactivo necesarios para la preparación de la "master mix" para la determinación de micoplasmas.

	<b>1x</b>
Buffer 10 x	2,5
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1
Primer/Nucleot Mix	2,5
Taq	0,2
H <sub>2</sub> O	14,3
	20,5

5. Se distribuyeron 20 µl de master mix por tubo.
6. Se añadieron 5 µl de la muestra previamente tratada (por duplicado) de manera que el volumen final de la reacción es de 25 µl.
7. En un tubo (control de PCR, NTC) se puso agua en vez de muestra.
8. En otro tubo se añadió el control positivo (Cpos).
9. Se agitaron y centrifugaron los tubos brevemente en minifuga.
10. Se realizó la PCR:
 

95°C	5 min	}	45 ciclos
95°C	30 seg		
57°C	30 seg		
72°C	30 seg		
72°C	5 min		
4°C	∞		
11. Posteriormente, se corrió un gel de agarosa al 2% cargando 15 µL de muestra.
12. En el caso de aparición de una doble banda existe contaminación por micoplasmas. Mientras que si se observa una única banda no hay presencia de estos microorganismos (Figura 27).

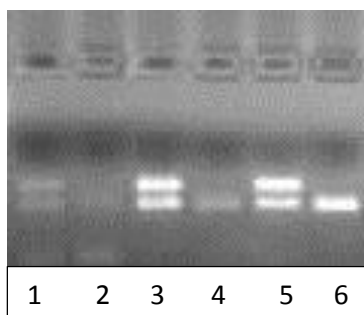


Figura 27: Imagen de un gel de agarosa en el que las líneas celulares de los carriles 3 y 5 tenían contaminación por micoplasmas.

### 3.2.2.1.6 Cambio de medio

Para llevar a cabo el cambio de medio fue necesario tener en cuenta cómo crecen las líneas celulares, adheridas o en suspensión.

Cuando las células crecen adheridas al sustrato:

1. Se atemperó el medio completo a 37°C.
2. Se sacó el frasco del incubador.
3. Se aspiró el medio antiguo con pipeta Pasteur estéril conectada a bomba de vacío. Para ello, se puso el frasco de cultivo en posición vertical.
4. Se adicionó de forma estéril el nuevo medio (5 mL por T25 y 15 mL por T-75).
5. Se comprobó en microscopio de fluorescencia si las células estaban en buen estado (refringentes).

Cuando las células crecían en grupos en flotación:

1. Se atemperó el medio completo a 37°C.
2. Se sacó el frasco del incubador.
3. Se transfirió el cultivo (medio con las células en flotación) a un tubo de 15 o 50 mL.
4. Se centrifugó el tubo a 1500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
5. Mientras se centrifugaba, se dispensó en los frascos, en que se iban a sembrar, el medio de cultivo necesario (5 mL por T25 y 15 mL por T-75).
6. Se aspiró el medio antiguo con pipeta Pasteur estéril conectada a bomba de vacío.
7. Se resuspendió el sedimento (células) en 2 mL de medio de cultivo mientras se golpeaba la base del tubo. Se homogeneizaron las células y se transfirieron a los frascos.
8. Se rotuló el frasco con el nombre de la línea, la fecha y un paso más de cultivo.
9. Se comprobó en microscopio de fluorescencia si las células estaban en buen estado (refringentes).

### 3.2.2.1.7 Tripsinización y siembra de células

Para llevar a cabo la tripsinización y siembra de células fue necesario tener en cuenta cómo crecían las líneas celulares, adheridas o en suspensión.

En el caso de líneas que formaban grupos en flotación:

- Este tipo de células no se tripsinizan.
1. Cuando su densidad era muy elevada, se comprobó al microscopio y se hizo una resiembra.
  2. Para ello, se dispensó en los frascos que se iban a sembrar, el medio de cultivo necesario (5 mL por T25 y 15 mL por T-75).
  3. Se añadió 1 mL de medio con células de frasco antiguo al nuevo.

En el caso de células que crecían adheridas al sustrato había que tener presente que:

- Se debían tripsinizar y resembrar preferentemente cuando el frasco de cultivo estuviera cerca de alcanzar la confluencia. No era conveniente esperar más, pues hay líneas celulares que mueren rápidamente si confluyen. Era asimismo aconsejable dejar pasar un mínimo de 48 h entre una tripsinización y la siguiente.
- Algunas líneas celulares eran de crecimiento rápido, otras de crecimiento más lento; y eso determinó el número máximo de frascos que se podían sembrar a partir de uno, el llamado "split".
- No era conveniente diluir las líneas mucho más allá de lo recomendado puesto que, si el número de células inicial de un cultivo era muy bajo podían morir.

Para tripsinizar un cultivo:

1. Se atemperó a 37°C la tripsina, el medio de cultivo completo y el PBS.
2. Se sacó el frasco del incubador y se comprobó el buen estado de las células al microscopio invertido.
3. Se retiró el medio de cultivo por aspiración.
4. Se añadieron 2 mL (para T25) o 5 mL (T75) de PBS y se agitaron para que el tampón lavase toda la monocapa de células.
5. Se retiró el PBS por aspiración.
6. Se añadió 1 mL (para T25) o 3 mL (T75) de tripsina. Se agitó para que la tripsina cubriera toda la monocapa de células.
7. Se devolvió el frasco al incubador. Cada 1-2 minutos se comprobó si las células estaban desenganchadas. Para ello, se dieron unos golpes secos a la base del frasco y se miró a simple vista o al microscopio invertido. No se mantuvieron las células en contacto con la tripsina más tiempo del imprescindible.
8. Mientras las células se desenganchaban, se dispensó medio de cultivo completo en un tubo de 15 mL (el volumen de medio debía de ser el doble que el de tripsina empleada).
9. Una vez desprendidas las células, se transfirieron al tubo con medio de cultivo y se agitaron. La tripsina se inactivó al entrar en contacto con los inhibidores presentes en el FBS que lleva el medio completo.
10. Se centrifugó el tubo a 1500 rpm durante 5 min, a temperatura ambiente.
11. Mientras se centrifugaba, se dispensaron en los frascos, en que se iban a sembrar, el medio de cultivo necesario (5 mL para T25 y 15 mL para T-75). Al rotularlos, se añadió un paso más de cultivo.

12. Se resuspendió el sedimento (células) en 5 mL de medio de cultivo, golpeando la base del tubo.
13. Se homogeneizaron las células y se transfirió la cantidad necesaria a los frascos.
14. Se comprobó en el microscopio de fluorescencia si las células estaban en buen estado (refringentes). Al día siguiente, se verificó que se habían adherido al sustrato.

### 3.2.2.1.8 Recuento celular

Para ello se empleó un portaobjetos especial y la llamada cámara de Neubauer, que tiene dos áreas para contar células. Un área consta de cuatro campos, cada uno de ellos formado por 4x4 cuadrados. Los campos están separados por una serie de líneas paralelas en cruz. Asimismo, para distinguir las células vivas de las muertas se empleó el colorante conocido como azul de tripano, que sólo penetra en las muertas, tiñéndolas de azul.

- En el caso de células que crecían adheridas al sustrato previo al recuento era necesario tripsinizarlas.
  - En el caso de células que crecían en flotación, se centrifugaban, se resuspendían y luego se homogeneizaban bien en medio de cultivo.
1. Una vez homogeneizadas, se tomaron 10  $\mu$ l de la suspensión de células y se transfirieron a un eppendorf. En ocasiones era necesario diluir las células para poder realizar el recuento. La dilución dependía de la densidad estimada y solía estar entre 1/10 y 1/100.
  2. Se añadieron 10  $\mu$ l de disolución de azul de tripano y se mezclaron bien.
  3. Se tomó la cámara de Neubauer, se colocó un cubre en el centro de la cara superior, de que llevaba los relieves, de manera que tapase las dos áreas.
  4. Se pipetearon 10  $\mu$ l de la mezcla entre el cubre y la cámara, de forma que se extendieran por una de las áreas.
  5. Se puso la cámara bajo el microscopio. Se localizó el área y cada uno de sus cuatro campos (que contienen 4x4 cuadrados).
  6. Se contó el número de células vivas en cada uno de los cuatro campos, que debía estar entre 20 y 200, de lo contrario se hacía una nueva dilución. Asimismo, en ningún campo el número de células debía desviarse más de un 25%. Si la desviación era mayor se ignoraba ese campo o se repetía el recuento.
  7. Se obtuvo la media aritmética de células por campo. Se multiplicó por 2 (factor de dilución) y por  $10^4$ . El número resultante era la densidad de células (número de células por mL) en la suspensión.

Nota:

El "2" proviene de la dilución 1:2 de las células al mezclarlas con el azul de tripano.

El " $10^4$ " era una característica de la cámara de Neubauer. En efecto, al añadir 10  $\mu$ l de disolución entre la cámara y el cubre, en cada campo se recuenta un volumen de 0,1  $\mu$ l. Para pasar a células por mL hay que multiplicar por  $10^4$ .

### 3.2.3 Estudios de viabilidad celular

#### 3.2.3.1 *Determinación del número de células inicial en los ensayos de proliferación*

La recta patrón se obtuvo sembrando en una placa cantidades crecientes de células, por sextuplicado. Se incubaron 72 horas y se revelaron, se dibujó la gráfica número de células-absorbencia a 492 nm.

La gráfica tenía una parte lineal seguida de una zona de saturación. En el diseño de los ensayos de MTT no se usó un número de células más allá del límite de saturación del ensayo.

1. En una placa de 96 pocillos se pusieron 50  $\mu$ L de medio de cultivo por pocillo.
2. Se hizo un recuento de la línea celular con la que se iba a trabajar.
3. Se sembraron 51500 células por pocillo en la primera columna y se homogeneizó.
4. Se transfirieron 50  $\mu$ L de esta primera columna a la siguiente.
5. Se repitió el proceso sucesivamente hasta llegar a la última columna.
6. Se rellenaron los pocillos con 50  $\mu$ L de medio.
7. Se incubaron 72 horas, ya que es el tiempo al que se realizarían los estudios posteriores.
8. Se revelaron de acuerdo con lo descrito en el apartado 3.2.3.5.

#### 3.2.3.2 *Preparación de las drogas*

Las drogas se recibieron liofilizadas, se resuspendieron en DMSO a 50 mM y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

A partir de esta disolución madre se prepararon las diluciones a adicionar en las placas con las células. Se hizo un banco de diluciones en medio de cultivo que cubriera el rango en el que se encontraba la  $IC_{50}$  del compuesto. Si no poseíamos este dato, se preparó un banco de diluciones entre 0,1  $\mu$ M y 50  $\mu$ M.

Para determinar el efecto de la combinación de dos compuestos, de acuerdo con el método de Chou-Talalay <sup>142</sup>, las células se sometieron a dosis múltiples de las  $IC_{50}$  de cada uno de los fármacos: 0,13, 0,25, 0,5, 0,63, 0,75, 0,88, 1, 1,5 y 3 de las  $IC_{50}$ .

#### 3.2.3.3 *Preparación de las células*

Para la preparación de la placa era necesario conocer el número de células:

1. Se calculó el volumen final necesario (50  $\mu$ L por pocillo, había 60 pocillos por placa, los pocillos de los extremos de la placa se rellenaron con PBS).
2. Se calculó el volumen necesario de células para obtener la cantidad final necesaria y se añadió medio de cultivo hasta llegar al volumen final.
3. Con la pipeta multicanal se pusieron 50  $\mu$ L de esta mezcla por pocillo (en las placas habituales para los experimentos en monocapa o en placas con Colágeno I para los estudios de Colágeno I).



4. En el caso de células con crecimiento en monocapa, se incubaron toda la noche y se añadió la droga al día siguiente (24h). Para células en suspensión, ambos procesos se realizaron el mismo día.

#### 3.2.3.4 *Desarrollo de la técnica*

1. Se añadió el medio con droga a doble concentración en 50  $\mu$ L.
2. Se incubaron las células con la droga 72 horas.
3. Se revelaron de acuerdo con lo descrito en el apartado 3.2.3.5.
4. Se determinó la IC<sub>50</sub> de acuerdo con el método de los dobles recíprocos. Este método representa gráficamente el log<sub>10</sub> de (1/viabilidad)-1 frente al logaritmo de la concentración de compuesto. En drogas con comportamiento sigmoidal se obtuvo una recta cuyo punto de corte con el eje de abscisas indica la IC<sub>50</sub> (Figura 28).

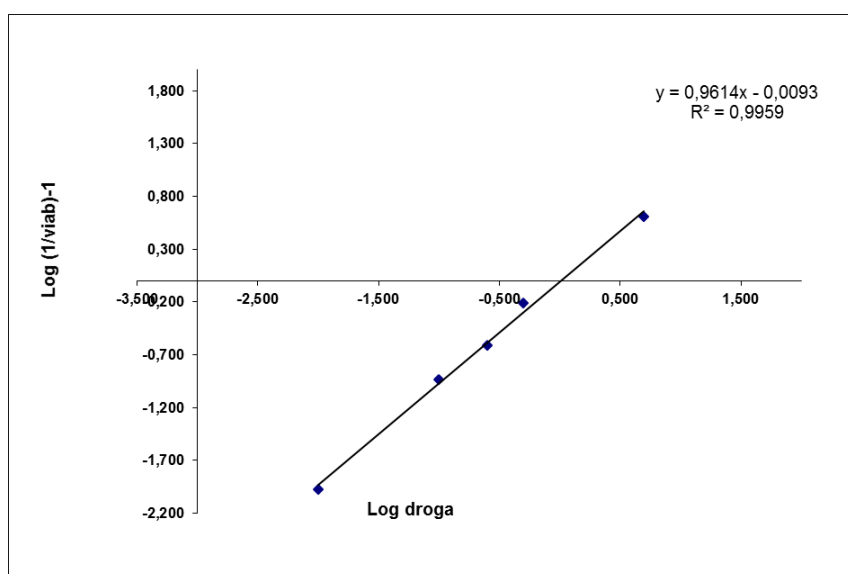


Figura 28: Representación gráfica del método de los dobles recíprocos para la obtención de la IC<sub>50</sub>.

#### 3.2.3.5 *Revelado por MTT*

1. Se calculó la cantidad de MTT necesaria (5,5 mg de MTT por placa).
2. Se resuspendió en 2 mL de PBS por placa (concentración final 2,75 mg MTT/mL).
3. Se añadieron 30  $\mu$ L de disolución de MTT por pocillo. Los pocillos sin células se utilizaron como blancos.
4. Se incubaron de 30 minutos a 1.30 h (células adheridas) o de 2 a 4 h (células en suspensión) a 37°C y en 5% de CO<sub>2</sub>. Se formó un precipitado de color violáceo en el interior de las células, visible a simple vista.
5. (células adheridas) Se retiró el medio por decantación golpeando suavemente la placa sobre un papel absorbente.
6. Se añadieron 100  $\mu$ L de DMSO y se agitó dando golpecitos a la placa.
7. (células en suspensión) Se añadieron, sin retirar el medio, 100  $\mu$ L de isopropanol-ácido clorhídrico (24:1). Se pipetearon hasta obtener una disolución homogénea.
8. En ambos casos, se leyó la absorbancia a 492 nm en el lector de ELISA según lo descrito en el apartado 3.2.3.5: Revelado por MTT.

### 3.2.4 Agar blando

Estos ensayos se realizaron con el uso del kit Cytoselect 96-well in Vitro Tumor Sensitivity Assay (Cell Biolabs).

#### 3.2.4.1 Preparación de la capa base de Agar

1. Se calentó el 10X Cytoselect Agar Matrix Solution a 90-95°C en un baño de agua durante 30 minutos.
2. Se transfirió el 10X Cytoselect Agar Matrix Solution a un baño a 37°C durante 20 minutos y se mantuvo hasta que se necesitó.
3. Se calentó el 2X DMEM/20% FBS medium en un baño de agua a 37°C. Se dejó atemperar 30 minutos.
4. De acuerdo con la tabla inferior se preparó el volumen necesario de la capa base de la matriz de Agar en la secuencia indicada (Tabla 9):
  - a) En un tubo estéril, se dispuso el volumen de 2X DMEM/20% FBS medium apropiado.
  - b) Se añadió el volumen correspondiente de agua estéril.
  - c) Se adicionó el volumen correspondiente de 10X Cytoselect Agar Matrix Solution.
  - d) Se homogeneizó.

Tabla 9: Volúmenes de los reactivos necesarios para la preparación de la capa base de la matriz de Agar.

2X DMEM/20% FBS medium (mL)	Agua estéril (mL)	10X Cytoselect Agar Matrix Solution (mL)	Volumen total de capa base de la matriz de Agar (mL)	# de pocillos utilizados de una placa de 96 pocillos (50 µ/pocillo)
2,5	2	0,5	5	100
1,25	1	0,25	2,5	50
0,5	0,4	0,1	1	20

5. Se mantuvo la capa base de la matriz de Agar a 37°C para evitar que gelificase.
6. Se dispusieron 50 µL/pocillo de capa base de la matriz de Agar.
7. Se puso la placa a 4°C durante 30 minutos para permitir que la capa base de la matriz de Agar solidificase.

#### 3.2.4.2 Adición de la capa de Agar-Células en suspensión

1. Se calentó el 10X Cytoselect Agar Matrix Solution a 90-95°C en un baño de agua durante 30 min.
2. Se transfirió el 10X Cytoselect Agar Matrix Solution a un baño a 37°C durante 20 minutos y se mantuvo hasta que se necesitó.
3. Se calentó el 2X DMEM/20% FBS medium y el Cytoselect Matrix Diluent en un baño de agua a 37°C. Se dejó atemperar 30 minutos.
4. Se sembraron y se resuspendieron las células en medio a una densidad de 0,1-1x10<sup>6</sup> células/mL. Se mantuvo la suspensión en un baño de agua a 37°C.
5. De acuerdo con la tabla inferior se preparó el volumen necesario de la capa de Agar-Células en suspensión en la secuencia indicada (Tabla 10):
  - a) En un tubo estéril, se dispuso el volumen de 2X DMEM/20% FBS medium apropiado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- b) Se añadió el volumen correspondiente de Cytoselect Matrix Diluent.
- c) Se adicionó el volumen correspondiente de 10X Cytoselect Agar Matrix Solution.
- d) Se añadió el volumen correspondiente de la suspensión celular.
- e) Se homogeneizó.

Tabla 10: Volúmenes de los reactivos necesarios para la preparación de la capa de Agar-Células.

2X DMEM/20% FBS medium (mL)	Cytoselect Matrix Diluent (mL)	10X Cytoselect Agar Matrix Solution (mL)	Suspensión celular (mL)	Volumen total de capa base de la matriz de Agar (mL)	# de pocillos utilizados de una placa de 96 pocillos (50 µ/pocillo)
3,5	2,75	0,75	0,5	7,5	100
1,75	1,375	0,375	0,25	3,75	50
0,875	0,688	0,188	0,125	1,875	25

6. Se mantuvo la capa de Agar-Células en suspensión a 37°C para evitar que gelificase.
7. Se dispusieron 75 µL/pocillo de capa de Agar-Células en suspensión.
8. Se puso la placa a 4°C durante 20 minutos para permitir que la capa base de la matriz de Agar solidificase.
9. Se dejó atemperar la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos.
10. Se adicionaron 50 µL/pocillo de medio con el compuesto a ensayar disuelto a la concentración deseada.
11. Se incubaron las células durante 6-8 días a 37°C y al 5% de CO<sub>2</sub>. Se examinó la formación de colonias con el microscopio diariamente.

### 3.2.4.3 Cuantificación del crecimiento celular

1. Se añadieron 125 µL/pocillo de 1X Matrix Solubilization Buffer.
2. Se pipeteó el volumen completo de cada pocillo 10-12 veces para solubilizar la matriz de Agar completamente.
3. Se añadieron 20 µL/pocillo de solución de MTT. Se pipeteó cada pocillo 7-10 veces para asegurar una mezcla homogénea.
4. Se incubó la placa 2-4 horas, según la línea celular, a 37°C y al 5% de CO<sub>2</sub>.
5. Se transfirió todo el volumen a un eppendorf.
6. Se centrifugó 5 minutos a 14000 rpm.
7. Se descartó el sobrenadante dejando las células cristalizadas al fondo del eppendorf.
8. Se resuspendió el sedimento celular en 80 µL de DMSO, que se transfirió a una placa de 96 pocillos.
9. Se leyó con el lector de placas a 492 nm.

### 3.2.4.4 Generación de líneas resistentes

1. Se seleccionó la línea celular y el fármaco contra el que se quería generar la resistencia.
2. Se determinó la IC<sub>50</sub> del fármaco en esta línea.
3. Se sembró un T75 y cuando tenía una confluencia del 75% se adicionó el fármaco a una concentración ligeramente superior a su IC<sub>50</sub>.

4. Se incrementó progresivamente la concentración de fármaco.

### 3.2.4.5 *Citometría de flujo*

Para conocer como actuaban los distintos compuestos en el ciclo celular de las líneas sometidas a estudio se realizaron los estudios de citometría de flujo. La preparación de los cultivos celulares con los tratamientos correspondientes es igual que en los estudios de *Western blot*.

1. Se tripsinizaron las células.
2. Se recogieron los pellets con  $1 \times 10^6$  células totales.
3. Se lavaron con 1 mL de PBS.
4. Se centrifugaron a 1250 rpm durante 5 min.
5. Se resuspendieron las células en 200  $\mu$ L de PBS frío.
6. Se añadieron 1,8 mL de etanol al 70% gota a gota y agitación constante en vórtex.
7. Se fijaron las células del sedimento en etanol al 70% durante toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
8. Se centrifugaron durante 5 minutos a 1250 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$ .
9. Se lavó el pellet con 200  $\mu$ L de PBS.
10. Se resuspendió el pellet en 250  $\mu$ L de PBS frío.
11. Se adicionaron 1,25  $\mu$ L de ARNsA A.
12. Se incubó 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ .
13. Se añadieron 20  $\mu$ L de yoduro de propidio.
14. Se incubó 15 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ .
15. Se mantuvo en la oscuridad y a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis por FACS.

### 3.2.5 *Western blot*

#### 3.2.5.1 *Tratamientos de western blot*

1. Se sembraron los T25 necesarios para el tratamiento, el número de células se eligió para que al día siguiente el cultivo estuviera a un 70-80% de confluencia, se incubaron toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$  y al 5% de  $\text{CO}_2$ .
2. Se lavaron dos veces con PBS y se incubaron toda la noche con medio de cultivo al 0% de FBS.
3. Se prepararon los tratamientos:
  - 3.1. Medio al 0% de FBS.
  - 3.2. Medio al 10% de FBS o con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de EGF.
  - 3.3. Medio al 0% de FBS con el inhibidor a su  $\text{IC}_{50}$ .
  - 3.4. Medio al 10% de FBS o con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de EGF y con el inhibidor a su  $\text{IC}_{50}$ .
  - 3.5.
4. Los tratamientos se incubaron 10 minutos.
5. Los cultivos celulares se lavaron dos veces con PBS y se adicionaron los tratamientos correspondientes.
6. Los cultivos celulares con los tratamientos se incubaron el tiempo requerido por cada estudio, entre 10 minutos y 24 horas según el experimento.

3.2.5.2 *Lisado celular*

1. Se lavó el cultivo celular dos veces con PBS frío y se puso sobre hielo.
2. Se añadieron 250 µl de tampón de lisis completo.
3. Se rascaron las células con un “cell scrapper” y se recogieron con una pipeta. Cuando no se obtenía un buen lisado celular, porque quedaba un líquido muy viscoso, se adicionaban otros 200 µl de tampón de lisis completo.
4. Se pasaron las células a través de una jeringa de insulina y se transfirieron a un eppendorf.
5. Se centrifugaron 15 minutos a 14000 rpm y 4°C para eliminar los restos particulados.
6. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo eppendorf y se descartó el sedimento.
7. Se determinó la concentración de proteínas por Bradford, ver apartado 3.2.4.3.
8. Se guardó el extracto a -80°C.

3.2.5.3 *Determinación de la concentración de proteínas*

Para la determinación de la concentración proteica por el método Bradford se realizó una curva estándar siguiendo el cuadro adjunto (Tabla 11).

- Estándares de BSA

*Tabla 11: Volúmenes y concentraciones de BSA requeridos para la realización del Bradford.*

Vial	Diluyente (tampón de lisis)	Volumen BSA [µL]	[BSA] final [µg/mL]
<b>A</b>	---	300 Stock	2000
<b>B</b>	125	375 Stock	1500
<b>C</b>	325	325 Stock	1000
<b>D</b>	175	175 dil B	750
<b>E</b>	325	325 dil C	500
<b>F</b>	325	325 dil E	250
<b>G</b>	325	325 dil F	125
<b>H</b>	400	100 dil G	25

Por otro lado, previo al inicio de la prueba, se preparó el WORKING REAGENT (WR) y se preservó de la luz. Para la preparación del reactivo se tuvo presente:

- Número de muestras

- Número de estándares (siempre eran 9)

(9 estándares + X muestras) \* 2 réplicas \* 200 µL = Y mL a preparar de WR

Se prepararon volúmenes múltiplos de 7 mL (x = 137 µL reactivo B + 6863 µL reactivo A)

\* A y B se referían a dos reactivos comerciales del kit BCA PIERCE

Una vez preparado el WR, se pasó a preparar la placa:

1. Se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de muestra o de estándares en cada uno de los pocillos.
2. Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de WR por pocillo.
3. Se envolvió la placa en papel de aluminio y se incubó durante 30 minutos a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ .
4. Se eliminaron las posibles burbujas formadas.
5. Se leyó la placa con el lector ELISA a 620 nm.
6. Se realizaron los cálculos apropiados para tener entre 20 y 50  $\mu\text{g}$  de proteína por muestra. Si los valores eran inferiores a 20  $\mu\text{g}$  se repitió la obtención del extracto.
7. Una vez cuantificadas, se determinó la muestra con la concentración menor y se igualaron el resto de concentraciones a ésta. Era necesario que todas las muestras tuvieran la misma concentración para iniciar el proceso.

### 3.2.5.4 *Immunoprecipitación*

Puesto que no había anticuerpo comercial disponible que permitiera la determinación de DDR2 fosforilado, se detectó por inmunoprecipitación de la proteína total, seguido por el *western blot* y revelado con el anticuerpo anti *p*-tirosina.

1. Se usaron 100  $\mu\text{g}$  de proteína total.
2. Se añadió tampón de lisis hasta tener un volumen final de 1 mL.
3. Se añadió 20  $\mu\text{L}$  del anticuerpo de DDR2.
4. Se incubó 1 hora a 4°C en agitación.
5. Se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de Protein A/G PLUS-Agarose.
6. Se incubó toda la noche a 4°C en agitación.
7. Se centrifugó 5 minutos a 4°C y 2500 rpm.
8. Se descartó el sobrenadante y se añadió 1 mL de tampón de lisis.
9. Se repitió la centrifugación y se descartó el sobrenadante.
10. Se repitió el proceso 4 veces más y en la última adición de tampón de lisis sólo se añadieron 40  $\mu\text{L}$ .
11. Se realizó el *western blot* o se guardaron los extractos obtenidos a -80°C.

## 3.2.5.5 SDS-PAGE

1. Se preparó el gel inferior (gel separador) con un porcentaje de acrilamida del 10% (Tabla 12):

Tabla 12: Volúmenes de los reactivos necesarios para la preparación de un gel separador al 10% de acrilamida.

Reactivo (1 gel)	10%
Agua	3,2 mL
Acrilamida:Bisacrilamida, 30%	2,67 mL
Tris 1,5 M; pH 8,8	2 mL
SDS 10%	80 $\mu$ l
Persulfato amónico 15%*	54 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

\*Preparar al momento a partir del persulfato amónico sólido

2. Se dejó polimerizar durante 20 minutos.
3. Una vez polimerizado se preparó el gel superior (gel concentrador) (Tabla 13):

Tabla 13: Volúmenes requeridos de los reactivos necesarios para la preparación de un gel concentrador.

Reactivo	1 gel
Agua	1,95 mL
Acrilamida:Bisacrilamida, 30%	0,3 mL
Tris 0,5 M; pH 6,8	0,75 mL
SDS 10%	30 $\mu$ l
Persulfato amónico, 15%*	30 $\mu$ l
TEMED	3 $\mu$ l
Volumen final (por gel)	3 mL

\*Preparar al momento a partir del persulfato amónico sólido

4. Se dejó polimerizar durante 20 minutos.
5. Se montó el gel en una cubeta y se añadió Tampón Running 1x.
6. Se limpiaron los pocillos con una micropipeta de 200  $\mu$ L y se corroboró que estaban en buen estado para la adición de la muestra.
7. Se tomaron los volúmenes de las muestras correspondientes, determinados previamente según la descrito en el apartado 3.2.4.3: Determinación de la concentración de proteínas.
8. Cada muestra se enRASó con tampón de lisado celular a un volumen de 50  $\mu$ L, en el caso de usar geles con peines de 10 pocillos.
9. A cada muestra, se le añadieron 12,5  $\mu$ L de tampón de carga de electroforesis 4x, se atemperaron y se adicionó un 5% de 2-mercaptoetanol.
10. Se hirvieron las muestras durante 5 minutos a 100°C.
11. En el primer pocillo se cargaron 10  $\mu$ l de marcador de proteína preteñido. En el resto, se cargaron 10  $\mu$ l de cada una de las muestras.

12. Se dejaron correr las muestras durante los 20 primeros minutos a 90 mV y después se subió el voltaje a 110 mV.

### 3.2.5.6 *Transferencia*

1. Mientras corría el gel se preparó 1 L de tampón de transferencia 1x y se guardó a 4°C.
2. Cuando acabaron de correr las muestras en el gel, éste se sacó de la cubeta y se sumergió en tampón de transferencia durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación.
3. Se recortó la membrana donde se iba a hacer la transferencia y se activó 1 minuto con metanol. A continuación, se sumergió en tampón de transferencia.
4. Los papeles de filtro y las esponjitas se empaparon con tampón de transferencia.
5. Se preparó en una bandeja con tampón de transferencia el bocadillo de Western (en ningún momento se dejó secar ningún de componente). Orden a seguir:
  - Cara negra del soporte de plástico.
  - Esponjita.
  - 2 papeles de filtro.
  - Gel.
  - Membrana.
  - 2 papeles de filtro.
  - Esponjita.
  - Cara transparente del soporte de plástico.
6. Se pasó el rodillo después de poner los dos papeles de filtro para eliminar burbujas.
7. Se cerró el bocadillo
8. Se puso el bocadillo en la cubeta de transferencia y el bloque de hielo, la cara negra mirando al lado negro (polo negativo) y la transparente al rojo (polo positivo). Se llenó la cubeta con tampón de transferencia.
9. Se puso la cubeta de transferencia en una caja aislante llena de hielo.
10. Se conectó la transferencia a 110 mV. Se dejó conectada entre 2 y 4 horas en función del tamaño de las proteínas a transferir (si tenían mayor peso molecular requirieron más tiempo).

### 3.2.5.7 *Incubación con anticuerpos*

1. Acabada la transferencia, se sumergió la membrana en tampón TBS-T x1 en agitación durante 10 minutos.
2. Se descartó el TBS-T y se añadió el *odyssey blocking buffer (PBS)*. Se dejó bloqueando 1 hora.
3. Cuando fue necesario incubar la membrana con distintos anticuerpos, ésta se cortó en bandas donde se encontraba la proteína que se quería estudiar. Para ello se utilizó como referencia el marcador preteñido de peso molecular.
4. Se eliminó el *odyssey blocking buffer (PBS)* anterior y se añadió *odyssey blocking buffer (PBS)* mezclado con la dilución apropiada del anticuerpo primario. La cubeta se tapó con parafilm para evitar la evaporación del tampón, se puso 4°C con agitación y se dejó incubar toda la noche. La cantidad de tampón debía ser la mínima suficiente para que



la membrana no se quedara seca pero no excesiva ya que, si no, aumentaba el ruido de fondo en el revelado final.

Los anticuerpos estudiados se describen en la tabla inferior (Tabla 14):

Tabla 14: Anticuerpos primarios utilizados.

Diana celular	Origen	Dilución	Empresa proveedora
<b>EGFR TOTAL</b>	Conejo	1/1000	Cell Signalling
<b>P-EGFR (Y895)</b>	Conejo	1/1000	Cell Signalling
<b>STAT3 TOTAL</b>	Ratón	1/1000	Cell Signalling
<b>P-STAT3 (Y705)</b>	Conejo	1/2000	Cell Signalling
<b>ERK 1,2 TOTAL</b>	Conejo	1/1000	Cell Signalling
<b>P-ERK 1,2 (Thr202/Y204)</b>	Conejo	1/1000	Cell Signalling
<b>AKT TOTAL</b>	Conejo	1/1000	Cell Signalling
<b>P-AKT (Ser473)</b>	Conejo	1/1000	Cell Signalling
<b>DDR2</b>	Conejo	1/1000	Santa Cruz Biotechnology Inc.
<b>P-TYR</b>	Conejo	1/1000	Santa Cruz Biotechnology Inc.

5. Se lavó la membrana con TBS-T x1 abundantemente una vez durante 15 minutos y cuatro veces más durante 5 minutos cada una. Todo a temperatura ambiente.
6. Se incubó la membrana con el anticuerpo secundario durante 1 hora. La dilución del anticuerpo secundario se hizo en *odyssey blocking buffer (PBS)* y era 1:2000 (Tabla 15).

Tabla 15: Anticuerpos secundarios utilizados.

Anticuerpo secundario	Origen	Dilución	Empresa proveedora
<b>Anti-conejo</b>	Conejo	1/2000	Cell Signalling
<b>Anti-ratón</b>	Ratón	1/2000	Cell Signalling

7. Se lavó la membrana con TBS-T x1 abundantemente una vez durante 15 minutos y cuatro veces más durante 5 minutos cada una.
8. Se preparó a temperatura ambiente en una caja negra una mezcla de 2 mL de disolución 1 y 2 mL de disolución 2 por membrana (ECL).

### 3.2.5.8 *Revelado*

1. Después del último lavado, se incubó la membrana con ECL diluido dentro de la caja negra durante 1 minuto, bajo agitación y asegurando que la disolución cubría completamente la membrana.
2. Se sacó la membrana de la cubeta y se secó en papel de filtro completamente limpio (el reactivo y la cubeta se reutilizaron para revelados posteriores en el mismo día).
3. Se dispuso la membrana sobre el papel transparente duro.
4. Se revelaron las membranas con el equipo de revelado.

3.2.6 Análisis de las mutaciones de *DDR2*

Se leyó la concentración de ADN de un pellet celular y se realizó una dilución de trabajo que oscilara alrededor de 5 ng/μL.

3.2.6.1 *PCR (para secuenciación posterior)*

1. Se preparó el “master mix” de la siguiente manera (los volúmenes están indicados en μL) (Tabla 16):

Tabla 16: Volúmenes necesarios para la preparación de la “master mix”.

	<b>DDR2</b>
	1x
<b>Buffer 10 x</b>	2,5
<b>MgCl<sub>2</sub> 25 mM</b>	1,5
<b>dNTPs</b>	0,6
<b>Primer DDR2_16F_directo (10 μM)</b>	0,5
<b>Primer DDR2_16R_directo (10 μM)</b>	0,5
<b>Hot Start Taq Plus</b>	0,2
<b>H<sub>2</sub>O</b>	17,2
	23

2. Se distribuyeron 23 μL de master mix por tubo.
3. Se añadieron 2 μL de extracto diluido de manera que el volumen final fuera de 25 μL.
4. Se añadieron los controles:
  - En un tubo (NTC) se puso agua en vez de ADN.
  - En otro tubo se añadió el control de extracción (Cext).
  - En un tercer tubo se añadió como control de amplificación el control *wt* (Cwt).
5. Se agitaron y centrifugaron los tubos brevemente en minifuga.
6. Se corrió la PCR (Tabla 17):

Tabla 17: Condiciones de la PCR.

95 °C	5 min	45 ciclos
95 °C	30 seg	
59 °C	30 seg	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	
RT	∞	

3.2.6.2 *Electroforesis en gel de agarosa*

Los productos de PCR del apartado anterior se separaron según el tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa utilizando el sistema en seco E-GEL i-base™ (INVITROGEN).

1. Se encajó el gel prefabricado (Precast Agarose HT-1gel) en el equipo.
2. Se cargaron 10 μl de las muestras y 10 μl de marcador de peso molecular.

3. Se ejecutó la carrera usando el programa E-Gel double comb o E-Gel 0.8-2%.
4. Una vez finalizada la carrera, se examinó en el transiluminador bajo luz UV. Para ello, se encendió el aparato de captura de imágenes y la lámpara UV.
5. Se guardó la imagen ("save").

3.2.6.3 *Tratamiento con EXO/SAP*

1. Se transfirieron 2 µL de Exo/Sap a un nuevo tubo.
2. Se añadieron 5 µL del producto de la PCR.
3. Cuando fue necesario se dió un pulso de centrifuga.
4. Se incubaron 20 min a 37°C, 15 min a 85°C e ∞ a 4°C. Este ADN se usó para la PCR de secuenciación.

3.2.6.4 *PCR de secuenciación*

1. Se preparó el "master mix" de la siguiente manera (los volúmenes están indicados en µL) (Tabla 18):

*Tabla 18: volúmenes necesarios para la preparación de "master mix" para la PCR de secuencia.*

Componente	1 muestra	2	3	6	7	8	10
<b>Tampón x 5</b>	2	4	6	12	14	16	20
<b>BigDye 3.1</b>	4	8	12	24	28	32	40
<b>Primer 1 µM FF (según gen a secuenciar)</b>	3,2	6,4	9,6	19,2	22,4	25,6	32
<b>Agua (para PCR)</b>	7,8	15,6	23,4	46,8	54,6	62,4	78

2. Se distribuyeron 17 µL de master mix por tubo.
3. Se añadieron entre 1-4 µL del producto de PCR (según la intensidad de la banda del gel de agarosa). El volumen final de la reacción fue de 20 µL.
4. Se agitaron y centrifugaron los tubos brevemente en minifuga.
5. Se corrió la PCR (Tabla 19):

*Tabla 19: Condiciones de la PCR de secuencia.*

95 °C	5 min	30 ciclos
95 °C	10 seg	
50 °C	5 seg	
60 °C	4 min	
4 °C	∞	

6. Se precipitó el ADN añadiéndolo a los 20 µL de PCR:
  - 2 µL de AcNa 3 M.
  - 2 µL de EDTA 125 mM.
  - 50 µL de etanol absoluto (a temperatura ambiente).
7. Se mantuvo 10-15 min a temperatura ambiente.
8. Se centrifugó durante 15-25 min a 14000 ± 200 rpm y temperatura ambiente.
9. Se retiró el sobrenadante con micropipeta.

10. Se lavó el sedimento con 190  $\mu$ L de etanol 70%.
11. Se centrifugó durante 5 min a  $14000 \pm 200$  rpm y temperatura ambiente.
12. Se retiró el sobrenadante con micropipeta.
13. Se secó a  $95^{\circ}\text{C}$  (en máquina de PCR) mínimo 2 min.
14. Se añadieron 20  $\mu$ L de formamida y se resuspendieron. Si la banda de PCR era débil, la resuspensión se hizo en 10  $\mu$ L de formamida.
15. Se introdujo en el secuenciador.

### 3.2.7 Estudios en animales

Los estudios en animales se llevaron a cabo por la empresa Crown Bioscience (<http://www.crownbio.com> ; EEUU).

### 3.2.8 Cultivo celular

Las células tumorales de pulmón humano A549 se mantuvieron como cultivo monocapa en F12K de Ham suplementado con FBS al 10% a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera con  $\text{CO}_2$  al 5%. Las células tumorales se subcultivaron rutinariamente 2 veces por semana por dilución. Las células que crecieron en una fase de crecimiento exponencial se recogieron y se contaron para la inoculación del tumor.

#### 3.2.8.1 Inoculación Tumoral

Cada ratón se inoculó subcutáneamente en el flanco derecho con células tumorales A549 ( $5 \times 10^6$ ) en 0,1 ml de PBS. Los tratamientos se iniciaron cuando el tamaño medio del tumor alcanzó aproximadamente  $149 \text{ mm}^3$ . La administración del compuesto y el número de animales en cada grupo se muestra en la Tabla 20. La fecha de inoculación de células tumorales se denotó como día 0.

Tabla 20: Diseño del estudio.

Grupo	N	Tratamiento	Dosis	Dosis aproximada en mg/kg	Vía de administración	Horario
1	8	Vehículo	----	----	p.o	BID X 3 semanas
2	8	PB1	0,5 mg/ratón	25 mg/kg	p.o	BID X 3 semanas
3	8	PB1	1 mg/ratón	50 mg/kg	p.o	BID X 3 semanas

#### 3.2.8.2 Asignación de grupo

Antes del comienzo del tratamiento, todos los animales fueron pesados y los volúmenes tumorales fueron medidos. Dado que el volumen tumoral podía afectar a la eficacia, los ratones fueron asignados en grupos usando el diseño de bloques al azar basado en el volumen del tumor, esto aseguraba que todos los grupos tenían líneas de base comparables. Primero los animales experimentales se dividieron en bloques homogéneos según el volumen inicial del tumor. En segundo lugar, dentro de cada bloque, se realizó una asignación aleatoria de cada animal a un tratamiento. Utilizando el diseño de bloques al azar para asignar animales de experimentación, se aseguró que cada animal tenía la misma probabilidad de ser asignado a cualquier grupo de tratamiento, minimizando el error sistemático.

### 3.2.8.3 *Formulación*

El vehículo usado fue 60/40 Labrasol/Transcutol (v/v).

### 3.2.8.4 *Observación y recopilación de datos*

Después de la inoculación de células tumorales, se verificó diariamente la morbilidad y mortalidad de los animales y se controlaron los animales para detectar cualquier efecto del crecimiento del tumor y tratamientos sobre el comportamiento normal tales como movilidad, estimación visual del consumo de alimentos y agua, ganancia / pérdida de peso corporal (los pesos corporales se midieron dos veces por semana), ceguera, sordera y cualquier otro efecto anormal. La muerte y los signos clínicos observados se registraron sobre la base del número de animales dentro de cada subconjunto. Los volúmenes de los tumores se midieron dos veces por semana en dos dimensiones, el volumen se expresó en mm<sup>3</sup> usando la fórmula:  $V = 0,5 a \times b^2$  donde a y b son el diámetro, largo y corto, del tumor, respectivamente. La última medición se realizó 24 h después de la última dosis. Los procedimientos completos de dosificación, así como la medición del tumor y del peso corporal se realizaron en una cabina de flujo laminar.

### 3.2.8.5 *Finalización*

Los ratones 30 y 5 en el grupo 1 murieron el día 28 y el día 33 después de la inoculación, respectivamente, con problemas intestinales.

El ratón 12 en el grupo 3 y el ratón 31 en el grupo 2 murieron el día 34 y el día 35 post inoculación, respectivamente, después de la recolección de sangre.

El resto de ratones se sacrificaron el día 36 post inoculación.

### 3.2.8.6 *Análisis estadístico*

El análisis estadístico de la diferencia en el volumen de tumores entre los grupos se realizó con los datos obtenidos al día 35 después de la inoculación del tumor.

El análisis estadístico de la diferencia en el peso del tumor entre los grupos se realizó con los datos obtenidos al día 36 después de la inoculación del tumor.

En primer lugar, la prueba de Levene se realizó para verificar la igualdad de varianzas de los datos entre los grupos (nivel de significación:  $P < 0,05$ ). Bajo varianzas iguales, se utilizó la prueba t de Student para ver si dos grupos eran iguales. Bajo variaciones desiguales, se usó la prueba t de Welch.

Todos los datos se analizaron en SPSS (Statistical Product and Service Solutions) versión 18.0 (IBM, Armonk, NY, EE.UU.). Los valores de P se redondearon a tres decimales, con la excepción de aquellos valores de P inferiores a 0,001 que se declararon como  $P < 0,001$ . Todas las pruebas fueron de dos caras. Se consideró  $P < 0,05$  para ser estadísticamente significativa.

### 3.2.9 *Bioanálisis de las muestras de ratones para los estudios de metabolismo*

1. Se adicionaron 20 µL de plasma de cada una de las muestras en los pocillos de una placa de 96 pocillos.
2. Se adicionaron 200 µL de una disolución que contenía 200 ng/mL de tolbutamida y 200 ng/mL de propranolol.
3. Se vortió.
4. Se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

5. Se transfirieron 150  $\mu$ L del sobrenadante a los pocillos de una placa de 96 pocillos.
6. Se vorteo durante 10 minutos.
7. Se inyectaron 10  $\mu$ L en LC/MS/MS.

Las condiciones de estudio se resumen en la Tabla 21 y Tabla 22.

*Tabla 21: Procedimiento de preparación de la formulación.*

Grupo	Número de animales / Especie / Sexo	Ayunado/ Alimentado	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Volumen dosis (ml/kg)	Concentración formulación (mg/ml)	Tipo de muestra	Puntos de tiempo (h)
IV	3 ratones ICR masculino	Alimentado	PB1	10	10	1	Plasma	0.0833, 0.25, 0.5, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h
PO	3 ratones ICR masculino	Alimentado	PB1	50	10	5	Plasma	0.25, 0.5, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h
IV	3 ratones ICR masculino	Alimentado	C69	2	10	0,2	Plasma	0.0833, 0.25, 0.5, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h
PO	3 ratones ICR masculino	Alimentado	C69	50	10	5	Plasma	0.25, 0.5, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h

*Tabla 22: Preparación de la formulación a utilizar.*

Preparación de la formulación							
Grupo	Compuesto	Cantidad de compuesto (forma de sal) (mg)	Salt Factor	Cantidad de compuesto (no forma de sal) (mg)	Reactivo	Volumen (mL)	Estatus formulación
IV	PB1	1,92	1	1,92	DMSO:(Solutol :EtOH=1:1):20 %HP-B-CD=1:1:6	1,920	Solución transparente
PO	PB1	5,36	1	5,36	60%Labrasol/40%Transcutol HP	1,07	Solución transparente
IV	C69	0,42	1	0,42	DMSO:(EtOH: Solutol=1:1):20 % HP-B-CD=1:1:6	2,100	Solución transparente
PO	C69	4,61	1	4,61	Labrasol:Trans cutol HP=60:40	0,92	Solución transparente



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN





## 4 Resultados y discusión

### 4.1 Selección inicial de compuestos pirido[2,3-*d*]pirimidínicos para ser testados frente a quinasas relacionadas con tumores sólidos

Como inicio de la colaboración entre el GEM del IQS y Pangaea Oncology S.A. se realizó una selección de 60 compuestos procedentes de quimiotecas pertenecientes a dicho grupo de investigación. La selección se realizó maximizando la diversidad estructural de dichos compuestos, en particular se eligieron estructuras pirido[2,3-*d*]pirimidínicas con variedad de sustituyentes R1, R2, R3 y R4 y diversos grados de insaturación en el anillo piridónico (Figura 29).

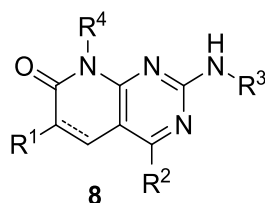


Figura 29: Estructura pirido[2,3-*d*]pirimidínica.

A continuación, se determinó en la empresa Proqinase por métodos radiométricos (3.2.1) la actividad residual de 24 quinasas, tipo *wt* o con mutaciones seleccionadas en función de su relevancia clínica (Tabla 23), en presencia de 10  $\mu$ M de cada uno de los 60 compuestos.

Tabla 23: Tirosinas quinasas seleccionadas y su relevancia clínica.

Alteración genética	Relevancia clínica
ALK C1156Y (GST-HIS-tag)	Resistencia a crizotinib en ADC de pulmón
ALK F1174L (GST-HIS-tag)	Resistencia a crizotinib en ADC de pulmón
ALK F1174S (GST-HIS-tag)	Resistencia a crizotinib en ADC de pulmón
ALK L1196M (GST-HIS-tag)	Resistencia a crizotinib en ADC de pulmón
ALK R1275Q (GST-HIS-tag)	Resistencia a crizotinib en ADC de pulmón
ALK <i>wt</i> (GST-HIS-tag)	Alteraciones en ADC de pulmón
AXL	Su sobreexpresión es un mecanismo de resistencia a inhibidores de <i>EGFR</i> de primera generación
DDR2	Sobreexpresión en SCC y mutaciones en ADC de pulmón
EGF-R (L858R)	Sensibilidad a inhibidores de <i>EGFR</i>
EGF-R (T790M)	Resistencia a inhibidores de <i>EGFR</i> de primera generación
EGF-R (T790M/L858R)	Resistencia a inhibidores de <i>EGFR</i> de primera generación
EPHA2	Melanomas con <i>BRAF</i> mutado
ERBB2	Sobreexpresión en carcinomas de mama
FGF-R1 <i>wt</i>	Sobreexpresión en SCC
FGF-R2	Alteraciones en cáncer de mama
FGF-R3 <i>wt</i>	Sobreexpresión en cáncer de vejiga, mieloma múltiple y cáncer de cuello uterino
FGF-R4	Sobreexpresión en cáncer de ovario y de mama

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Alteración genética	Relevancia clínica
IGF1-R	Resistencia a los inhibidores de tirosinas quinasas en carcinomas de pulmón, próstata y mama
MET wt	Resistencia a los inhibidores de <i>EGFR</i>
RET wt	Alteraciones en ADC de pulmón
ROS	Alteraciones en ADC de pulmón
VEGF-R1	Diana antiangiogénica
VEGF-R2	Sobreexpresión en cáncer de vejiga y mama
VEGF-R3	Sobreexpresión en cáncer de ovario y mama

Una actividad residual baja indicaba una fuerte inhibición de la proteína quinasa por el compuesto mientras que una actividad residual cercana al 100% indicaba que el compuesto no presentaba afinidad por la quinasa.

Para la mayoría de compuestos, la actividad residual de las quinasas estudiadas a 10  $\mu$ M resultaba superior al 20%, indicando una baja afinidad. Por ello, se consideró que dichos compuestos no tenían potencial como candidatos a fármacos antitumorales. Sin embargo, en otros se observó una actividad residual inferior al 20% frente a ciertas quinasas. Se seleccionaron 16 de estos compuestos (Tabla 24 y Tabla 25) para continuar sus estudios en líneas celulares y determinar su actividad antiproliferativa.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 24: Actividad residual de los compuestos seleccionados en las proteínas quinasas estudiadas. Rojo, actividad residual de la proteína con el compuesto concreto está entre el 60 y el 80%, amarillo, entre el 20 y el 60% y, verde, inferior al 20%.

Compuesto	ALK C1156Y (GST-HIS-tag)	ALK F1174L (GST-HIS-tag)	ALK F1174S (GST-HIS-tag)	ALK L1196M (GST-HIS-tag)	ALK R1275Q (GST-HIS-tag)	ALK wt (GST-HIS-tag)	AXL	FGF-R1 wt	FGF- R2	FGF- R3 wt	FGF- R4
C1	10	10	14	4	4	4	25	13	9	30	20
C2	13	10	14	7	7	9	32	11	9	34	28
C4	31	27	34	23	38	35	53	48	33	56	50
C7	28	25	36	19	18	19	51	31	24	38	54
C8	13	15	22	7	9	10	32	22	9	35	28
C9	51	71	76	47	46	99	74	8	4	8	32
C10	10	6	11	3	4	4	23	12	3	31	20
C11	29	24	26	14	14	11	53	15	10	46	36
C12	12	14	23	9	9	6	41	14	13	37	34
C13	23	28	25	22	18	18	40	-2	0	8	26
C14	36	60	65	46	70	106	90	46	30	19	40
C15	12	12	20	8	8	8	33	18	11	17	30
C16	32	36	44	38	25	31	62	37	37	53	65
C17	19	17	16	11	9	7	39	16	18	36	36
C18	47	58	58	33	51	69	52	1	1	2	10
C19	14	14	22	10	10	9	39	18	10	41	30

Compuesto	DDR2	EPHA2	ERBB2	EGF-R L858R	EGF-R T790M	EGF-R T790M/L858R	IGF1- R	MET wt	RET wt	ROS	VEGF- R1	VEGF- R2	VEGF- R3
C1	72	18	40	36	30	31	8	52	26	53	24	9	46
C2	24	7	41	21	31	22	15	51	23	41	39	18	40
C4	66	39	69	56	49	47	32	69	83	92	57	48	66
C7	1	4	37	16	37	29	24	73	43	77	56	39	66
C8	97	24	54	51	42	36	16	75	33	64	31	17	52
C9	0	0	50	12	31	34	79	45	3	76	19	3	29
C10	73	19	34	43	30	34	6	47	23	70	19	8	40
C11	80	9	54	42	39	31	15	65	45	58	40	29	67
C12	73	15	51	43	37	25	16	60	36	66	49	26	57
C13	0	0	40	14	36	31	21	62	2	62	15	2	32
C14	4	0	84	19	56	55	44	78	14	95	31	8	53
C15	83	27	46	40	35	37	15	66	35	51	45	11	56
C16	2	6	41	14	48	29	36	85	65	90	66	63	86
C17	72	24	53	47	40	35	23	55	35	61	49	33	69
C18	-1	1	46	15	30	28	47	39	1	54	13	2	20
C19	98	21	49	38	39	31	12	77	37	78	37	18	51

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 25: Compuestos seleccionados.

Compuesto	Quinasa frente a la que presentaba selectividad en el ensayo en Proqinase.
C1	ALK, EPHA2, FGFR1, FGFR2, IGF1R y VEGFR2.
C2	ALK, EPHA2, FGFR1, FGFR2, IGF1R y VEGFR2.
C4	No presenta actividad en ninguna de las proteínas estudiadas y se utilizó como control negativo.
C7	ALK, DDR2, EGFR (L858R) y EPHA2.
C8	ALK, FGFR2, IGF1R y VEGFR2.
C9	DDR2, EGFR (L858R), EPHA2, ERBB4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, RET, VEGFR1 y VEGFR2.
C10	ALK, EPHA2, FGFR1, FGFR2, FGFR4, IGF1R, VEGFR1 y VEGFR2.
C11	ALK, EPHA2, FGFR1, FGFR2 y IGF1R.
C12	ALK, EPHA2, FGFR1, FGFR2 y IGF1R.
C13	ALK, DDR2, EGFR (L858R), EPHA2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, RET, VEGFR1 y VEGFR2.
C14	DDR2, EGFR (L858R), EPHA2, FGFR3, RET y VEGFR2.
C15	ALK, FGFR1, FGFR2, FGFR3, IGF1R y VEGFR2.
C16	DDR2, EGFR (L858R) y EPHA2.
C17	ALK, FGFR1 y FGFR2.
C18	DDR2, EGFR (L858R), EPHA2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, RET, VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3.
C19	ALK, FGFR1, FGFR2, IGF1R y VEGFR2.

En la Tabla 26 se muestran las estructuras de los compuestos seleccionados para continuar sus estudios *in vitro*.

Tabla 26: Estructuras seleccionadas por sus buenos datos en proteína aislada.

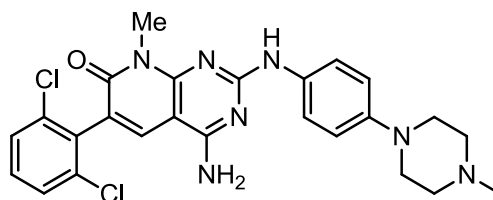
Estructura	Compuesto	Estructura	Compuesto
	C1		C12
	C2		C13
	C4		C14

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estructura	Compuesto	Estructura	Compuesto
	C7		C15
	C8		C16
	C9		C17
	C10		C18
	C11		C19

Además de estos compuestos, se incluyeron 3 cuya actividad en proteína aislada no había sido determinada inicialmente. Los motivos de su inclusión fueron:

- C3: se trataba de un compuesto con resultados de actividad interesantes en líneas celulares de linfoma No-Hodgkin<sup>137</sup>(Figura 30).



**18{1,1} / C3**

*Figura 30: Estructura de C3.*

- C5: los primeros datos de actividad residual en proteína aislada mostraron la importancia de las sustituciones en C2 y C4 del anillo pirido[2,3-*d*]pirimidínico (Tabla 20). El compuesto C1 sustituido en C4 y el compuesto C2 sustituido en C2 mostraron los mejores valores de actividad en proteína aislada, principalmente para ALK. Por este

motivo se desarrolló una ruta sintética que permitiera la sustitución en ambas posiciones. Una de las moléculas obtenidas por esta metodología se incluyó en los ensayos *in vitro* (Figura 31).

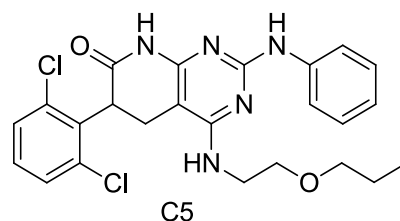


Figura 31: Estructura de C5.

- C6: como resultados de la elevada actividad de C1 en las proteínas seleccionadas, se incluyó un análogo de C1 para los estudios *in vitro*. La principal diferencia era la ausencia del grupo metilo en el N lactámico del anillo pirido (Figura 32).

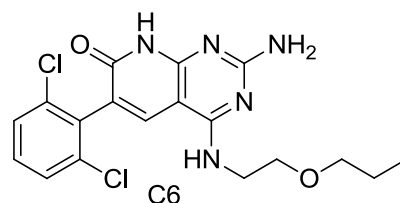


Figura 32: estructura de C6.

## 4.2 Actividad antiproliferativa

En primer lugar, se determinó si la presencia de las moléculas seleccionadas en el medio de cultivo producía algún efecto sobre el crecimiento *in vitro* de diferentes líneas celulares tumorales, ya que una actividad inhibidora en proteína aislada no implica necesariamente un buen efecto antiproliferativo. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de proliferación con MTT (3.2.3) en 6 líneas celulares.

Se seleccionó un panel con líneas celulares representativas de CPNM, que incluían alteraciones genéticas de relevancia clínica en pacientes con CPNM (Tabla 21). Se añadió una línea celular colorrectal portadora de una mutación interesante en CPNM, la mutación G719S de *EGFR*, ya que no existía una línea celular pulmonar con esta alteración genética (Tabla 27). Además, se incluyó una línea celular no tumoral.

Tabla 27: Origen y principal alteración genética de las líneas celulares en las que se testaron los distintos compuestos.

Línea celular	Origen	Principal alteración genética
HCC78	Adenocarcinoma de pulmón	<i>ROS1-SLC34A2</i>
H3122	Adenocarcinoma de pulmón	<i>ALK-EML4</i> (v1)
H1975	Adenocarcinoma de pulmón	Mutaciones L858R y T790M en <i>EGFR</i>
A549	Adenocarcinoma de pulmón	<i>KRAS</i> (G12S)
SW48	Adenocarcinoma colorrectal	G719S en el exón 18 de <i>EGFR</i>
HACAT	Queratinocitos	No tumorales

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un buen fármaco antitumoral debe presentar toxicidad selectiva, es decir, debe inhibir la proliferación celular de las células tumorales sin inhibir la proliferación de las células no tumorales o, por lo menos, debe presentar mayor actividad antiproliferativa en las células tumorales que en las no tumorales. La inclusión de una línea no tumoral (HACAT) en el panel inicial de líneas celulares, permitió estimar la toxicidad selectiva de cada uno de los compuestos sometidos a estudio y la diversidad genética de las líneas celulares seleccionadas permitió determinar la toxicidad selectiva de cada uno de los compuestos para actuar en células tumorales con una alteración genética determinada (Tabla 28).

*Tabla 28: IC<sub>50</sub> de las moléculas testadas en las distintas líneas celulares. En verde aparecen los compuestos con actividades inferiores a 5 µM, y en amarillo aquellos con actividades entre 5 y 10 µM.*

Número	IC <sub>50</sub> (HCC78)	IC <sub>50</sub> (H3122)	IC <sub>50</sub> (H1975)	IC <sub>50</sub> (A549)	IC <sub>50</sub> (SW48)	IC <sub>50</sub> (HACAT)
C1	> 50 µM	> 50 µM	-	-	-	
C2	> 50 µM	> 50 µM	-	-	-	
C3/PB2	> 50 µM	> 50 µM	17,5 µM	-	-	
C4	> 50 µM	> 50 µM	-	-	-	
C5	> 50 µM	> 50 µM	-	-	-	
C6	> 50 µM	> 50 µM	-	-	-	
C7	1,5 µM	5 µM	5,4 µM	2,35 µM	-	> 50 µM
C8	> 50 µM	> 50 µM	-	-	-	
C9	> 50 µM	> 50 µM	-	-	-	
C10	> 50 µM	39,1 µM	-	-	-	
C11	> 50 µM	> 50 µM	-	-	-	
C12	7,4 µM	9,7 µM	-	-	-	
C13	1,6 µM	24,6 µM	-	-	-	
C14	> 50 µM	27,1 µM	-	-	-	
C15	> 50 µM	> 50 µM	-	-	-	
*C16	0,92 µM	2,07 µM	2,6 µM	0,43 µM	0,75 µM	> 50 µM
C17	> 50 µM	> 50 µM	-	-	-	
C18	1,16 µM	1,57 µM	-	0,95 µM	-	2,6 µM
C19	> 50 µM	> 50 µM	-	-	-	

\*C16 pasó a denominarse PB1, en el resto del documento se refiere a este compuesto como PB1.



C7, C16 y C18 resultaron ser los únicos compuestos con actividad antiproliferativa significativa en las líneas estudiadas, ya que todas las  $IC_{50}$  estaban en el rango  $\mu M$  (Tabla 28). Especialmente interesante eran los resultados de actividades obtenidos para C16, ya que en las líneas HCC78, A549 y SW48 tenía una actividad inferior a  $1 \mu M$  (Tabla 28). Tanto C7 como C16 presentaron además toxicidad selectiva por las líneas celulares tumorales respecto la no tumoral. Sin embargo, para C18 la actividad del compuesto en células tumorales y no tumorales resultaba muy similar, motivo por el cual se descartó para continuar los estudios con C16 (Tabla 28).

C16, cuya denominación se cambió a PB1 como acrónimo de Pangaea Oncology S.A. compuesto 1, se seleccionó como *Hit compound* avanzado y, en consecuencia, se estudiaron con más detalle sus propiedades y efectos en modelos preclínicos a fin de realizar un proceso *Hit-to-Lead*.

### 4.3 PB1

El compuesto 4-amino-6-(2,6-diclorofenil)-8-metil-2-(fenilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ona, PB1, es una molécula orgánica relativamente pequeña, de peso molecular 412,272 g/mol, que satisface las reglas del cinco de Lipinsky:

- No contiene más de cinco donadores de enlaces por puentes de hidrógeno.
- No contiene más de diez aceptores de enlaces por puentes de hidrógeno.
- Posee un peso molecular inferior a 500 g/mol.

Además, posee un coeficiente de reparto octanol-agua ( $\log P$ ) inferior a 5.

La ruta sintética diseñada para su obtención está compuesta de 10 etapas claramente diferenciadas, en ninguna de las cuales intervienen metales pesados. Se trata de una síntesis muy optimizada con un rendimiento del 66%, una temperatura máxima de  $140^{\circ}C$  en dos de las etapas y en el resto a temperatura ambiente o  $100^{\circ}C$  y presión ambiental en la mayor parte de la ruta a excepción de dos pasos en que se requiere el uso de microondas (Figura 33).

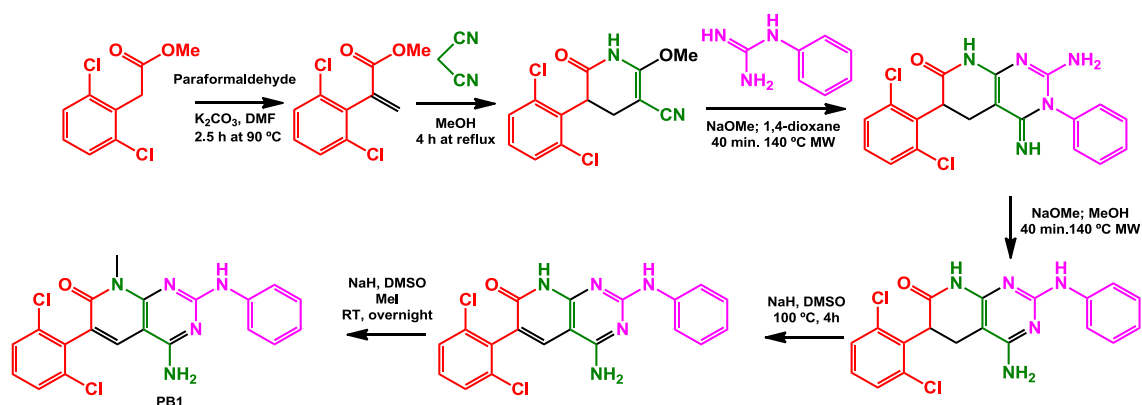


Figura 33: Esquema sintético de PB1.

#### 4.3.1 Actividad sobre proteína purificada en 374 quinasas del quinoma humano

La afinidad de PB1 por 374 quinasas se evaluó mediante un ensayo sobre proteína purificada similar al descrito en el apartado 3.2.1 y llevado a cabo por la empresa Proqinase. Se utilizaron dos concentraciones de PB1 ( $0,5$  y  $10 \mu M$ ).

En la Tabla 29 se detallan las quinasas que presentaban una actividad residual inferior al 50% a una concentración 0,5  $\mu$ M de PB1.

Tabla 29: Quinoma de PB1 a 0,5 y 10  $\mu$ M.

Proteína Quinasa	Tipo de Quinasa	PB1 (0,5 $\mu$ M)	PB1 (10 $\mu$ M)
CSF1-R	TK	9	17
DDR2 wt	TK	10	4
DDR2 N456S	TK	10	6
EGF-R d746-750	TK	28	10
EGF-R G719C	TK	29	6
EGF-R L861Q	TK	36	8
EGF-R G719S	TK	39	3
EGF-R d747-752/P753S	TK	47	15
EGF-R wt	TK	47	16
EGF-R L858R	TK	49	10

CSF1-R es un gen implicado en el control de la producción, diferenciación y función de macrófagos. A pesar de presentar los mejores datos en proteína aislada a 0,5  $\mu$ M, se desconoce su papel en cáncer, motivo por el cual no se continuó su estudio.

Además, PB1 presentaba una actividad antiproliferativa contra las proteínas DDR2 (wt y N456S) y varias formas mutadas de EGFR (d746-750, G719X y L861Q). Ambas quinasas están implicadas en procesos tumorales (Tabla 23) y se han descrito mutaciones somáticas de DDR2 y particularmente de EGFR con relevancia clínica en cáncer.

#### 4.3.2 Actividad antitumoral de PB1 sobre células en cultivo

##### 4.3.2.1 Actividad antiproliferativa frente a líneas tumorales de diversos orígenes

Se determinó la IC<sub>50</sub> de PB1 frente un panel de 50 líneas tumorales el 50% de las cuales eran de origen pulmonar, el resto incluía varios tipos de neoplasias y alteraciones moleculares. La actividad de PB1 estaba en el rango micromolar y las líneas en las que presentaba una menor IC<sub>50</sub> pertenecían a tres grupos (Figura 34 y Tabla 55):

1. Líneas procedentes de carcinomas escamosos de pulmón, en las que PB1 presentaba IC<sub>50</sub> entre 50 nM y 500 nM. De estas líneas, aquellas con mutaciones de DDR2 resultaron ser las más sensibles a PB1, con IC<sub>50</sub> entre 50 nM y 350 nM.
2. Líneas de adenocarcinomas pulmonares con mutaciones de KRAS (A549 y Calu6).
3. La línea de adenocarcinoma colorrectal anteriormente citada (SW48), con una mutación en el exón 18 de EGFR.

Además, se determinó la actividad antiproliferativa de PB1 en 4 líneas celulares no tumorales de orígenes distintos y en ninguno de los casos se obtuvo un efecto antiproliferativo significativo (Tabla 30).

Tabla 30: Toxicidad de PB1 en células no tumorales.

Líneas celulares	Histología	PB1 IC <sub>50</sub> (uM)
Gingival	Fibroblastos	>50
Fibroblastos de próstata	Miofibroblastos	>50
HF	Fibroblastos	>50

Los ensayos en líneas celulares confirmaron los resultados obtenidos en proteína aislada donde se observaba la inhibición de *DDR2*, *wt* y mutado, y la inhibición de *EGFR* con la mutación G719S. No obstante, la baja actividad residual de *EGFR* con mutaciones en el exón 19 en presencia de PB1 no se confirmó en los ensayos de cultivo celular, por lo que no se continuó su estudio.

En consecuencia, aunque el objetivo inicial era desarrollar inhibidores de alteraciones en *ALK*, *ROS1*, *EGFR* y *KRAS*, se decidió dirigir los estudios hacia *DDR2* y las mutaciones puntuales del exón 18 de *EGFR*, así como continuar los análisis en *KRAS*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

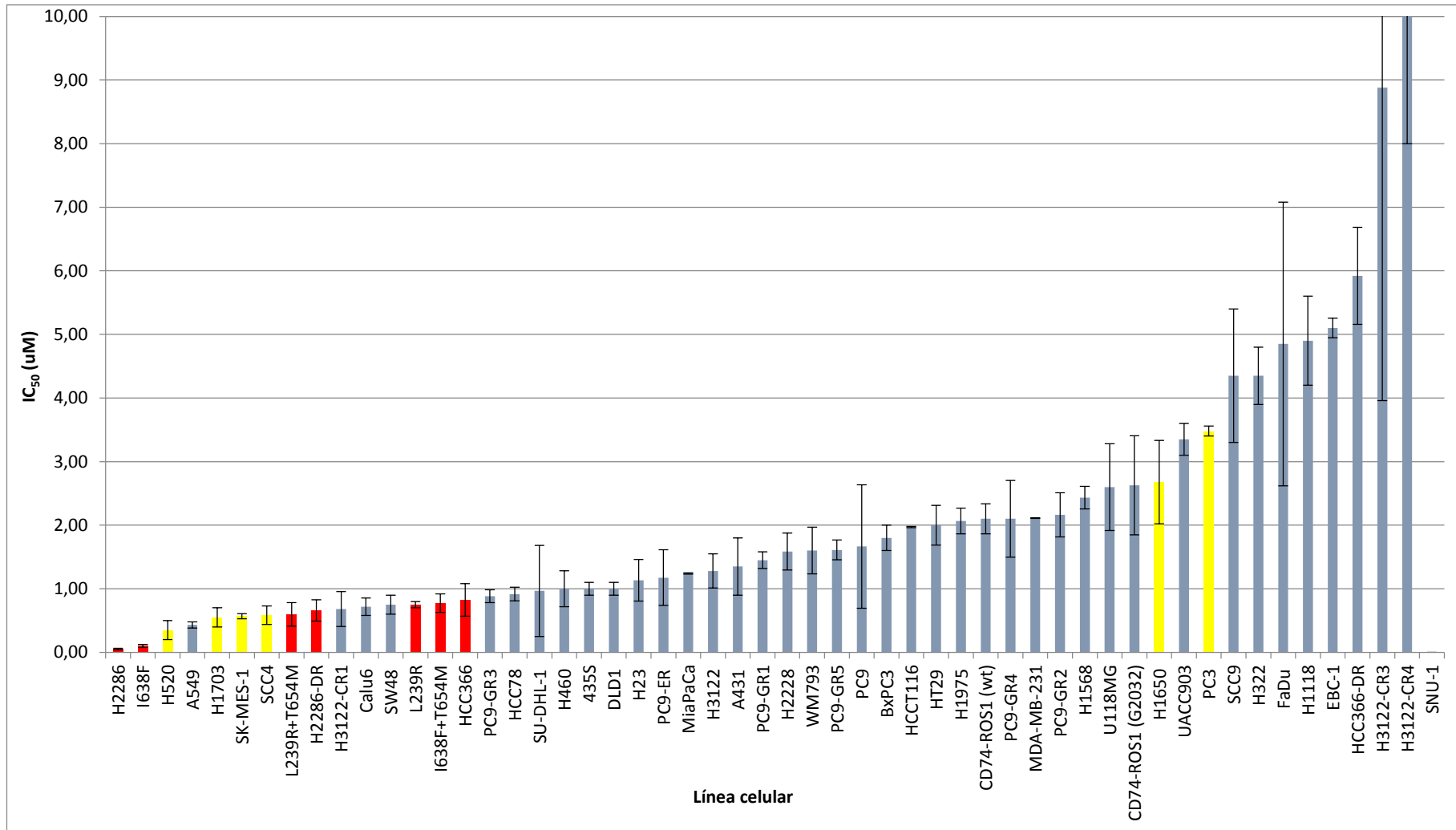


Figura 34: IC<sub>50</sub> frente un panel de líneas tumorales de distintos orígenes.

4.3.2.2 *Estudios para determinar la actividad de PB1 en DDR2*

Como consecuencia de los resultados obtenidos en proteína aislada y en los primeros ensayos de viabilidad celular en el panel de líneas celulares tumorales, donde se observó una gran sensibilidad a PB1 de las líneas con alteraciones de *DDR2*, se decidió ampliar los estudios de interacción de PB1 con este receptor.

4.3.2.2.1 *Viabilidad celular en monocapa*

En primer lugar, se determinó la sensibilidad a PB1 de un panel de líneas de cabeza y cuello y carcinoma escamoso de pulmón con sobreexpresión o mutaciones puntuales de *DDR2* (Tabla 31).

Tabla 31: Líneas celulares con alteraciones en *DDR2*.

Línea celular	Clasificación histológica	Alteración genética
H1703	Carcinoma escamoso pulmonar	DDR2 <i>wt</i>
H2286	Carcinoma escamoso pulmonar	I638F de DDR2
H2286-DR	Carcinoma escamoso pulmonar	I638F de DDR2
H520	Carcinoma escamoso pulmonar	DDR2 <i>wt</i>
SK-MES-1	Carcinoma escamoso pulmonar	DDR2 <i>wt</i>
HCC366	Carcinoma adenoescamoso pulmonar	L239R de DDR2
HCC366-DR	Carcinoma adenoescamoso pulmonar	L239R de DDR2
SCC4	Carcinoma escamoso de lengua	DDR2 <i>wt</i>
SCC-9	Carcinoma escamoso de lengua	DDR2 <i>wt</i>
A431	Carcinoma escamoso de piel	DDR2 <i>wt</i>
FaDu	Carcinoma escamoso de faringe	DDR2 <i>wt</i>
NIH3T3 (I638F)	Fibroblastos transfectados	I638F en DDR2
NIH3T3 (I638F+T654M)	Fibroblastos transfectados	I638F y T654M en DDR2
NIH3T3 (L239R)	Fibroblastos transfectados	L239R en DDR2
NIH3T3 (L239R+T654M)	Fibroblastos transfectados	L239R y T654M en DDR2

4.3.2.2.1.1 *Actividad antiproliferativa de PB1 en ensayos MTT*

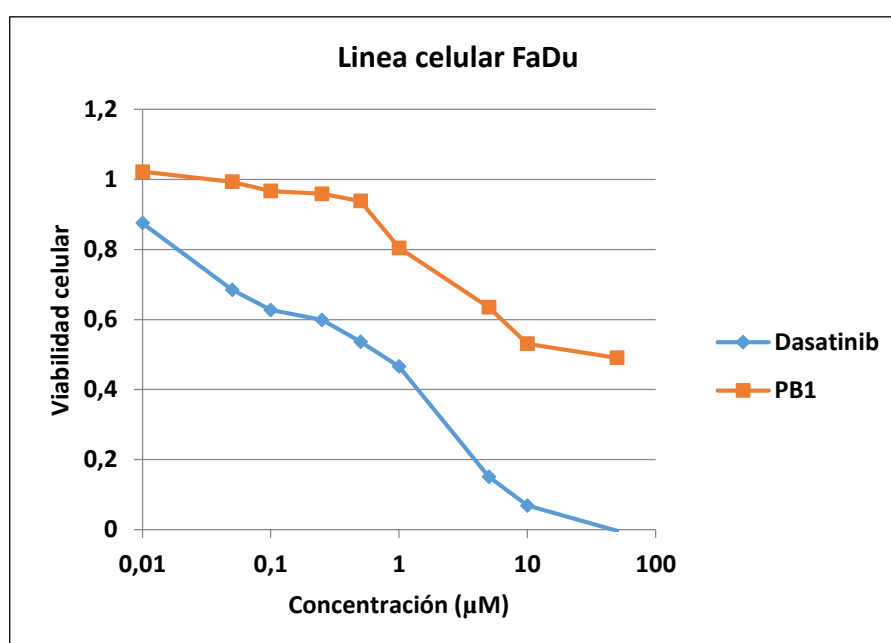
Se decidió comparar la actividad de PB1 con dasatinib en las líneas celulares con alteraciones de *DDR2*. Las principales dianas celulares de dasatinib son BCR/ABL, SRC y c-Kit, y su uso en linfoma mieloide crónica y en leucemia linfoblástica positiva para el cromosoma Filadelfia está aprobado por la FDA. Sin embargo, estudios recientes muestran la actividad de este compuesto en tumores portadores de alteraciones en *DDR2*<sup>143,144</sup> propias de carcinomas escamosos de pulmón, motivo por el cual se utilizó como fármaco comparativo con PB1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 32: IC<sub>50</sub> de dasatinib y PB1 en una selección de líneas de carcinoma escamoso con DDR2 wt.

Compuesto	IC <sub>50</sub> en FaDu (μM)	IC <sub>50</sub> en SCC9 (μM)	IC <sub>50</sub> en SCC4 (μM)	IC <sub>50</sub> en SK-MES-1 (μM)	IC <sub>50</sub> en H1703 (μM)	IC <sub>50</sub> en H520 (μM)
Dasatinib	0,690 ± 0,261	0,150 ± 0,090	0,074 ± 0,023	0,040 ± 0,035	0,010 ± 0,015	0,160 ± 0,075
PB1	4,850 ± 0,231	4,350 ± 1,056	0,580 ± 0,150	0,570 ± 0,040	0,550 ± 0,156	0,350 ± 0,151
Prueba T Student	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

La actividad de dasatinib era significativamente superior a la de PB1 en las líneas procedentes de carcinomas escamosos de cabeza y cuello con sobreexpresión de DDR2 (SCC4, SCC9 y FaDu) y de origen pulmonar (SK-MES-1, H1703 y H520) (Tabla 32 y Figura 35). Incluso a dosis de 50 μM de los inhibidores, la viabilidad celular en estas líneas resultó ser muy inferior para dasatinib (<10%) en comparación con PB1 (entre 20% y 49%).



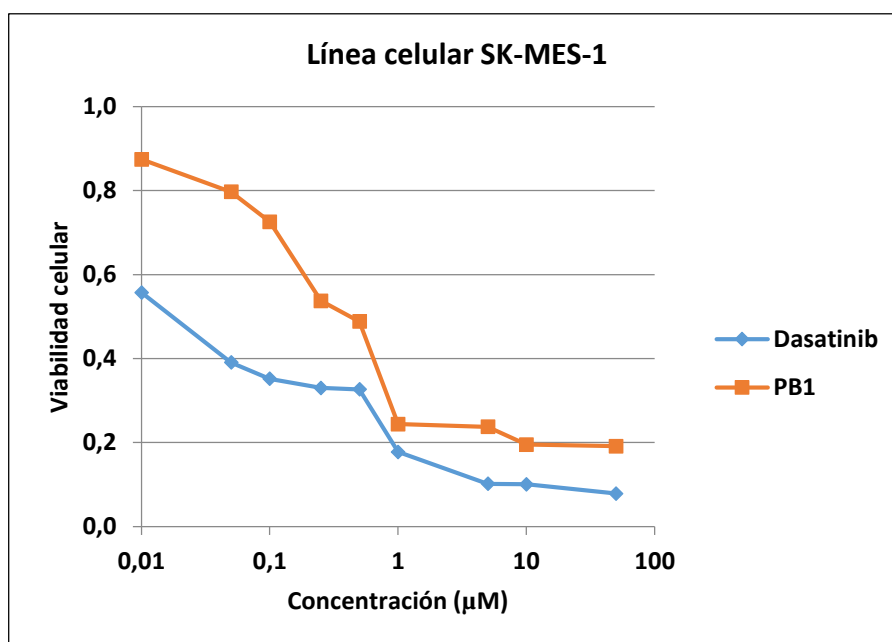


Figura 35: Gráficas comparativas de la actividad antiproliferativa de PB1 y dasatinib en la línea celular FaDu (gráfica superior) y la línea celular SK-MES-1 (gráfica inferior). Los ejes están en escala logarítmica de base 10.

En el caso de las líneas con la mutación I638F de *DDR2*, tanto dasatinib como PB1 presentaban  $IC_{50}$  entre 50 y 100 nM. Por el contrario, en las líneas celulares con la mutación L239R de *DDR2* se observaron valores de actividad significativamente mejores para dasatinib que para PB1 (Tabla 33).

Tabla 33:  $IC_{50}$  de dasatinib y PB1 en una selección de líneas de carcinoma escamoso con mutaciones de *DDR2*.

Compuesto	$IC_{50}$ en H2286 (μM)	$IC_{50}$ en HCC366 (μM)	$IC_{50}$ en NIH3T3 (I638F) (μM)	$IC_{50}$ en NIH3T3 (L239R) (μM)
Dasatinib	0,020 ± 0,009	0,070 ± 0,021	0,044 ± 0,008	0,074 ± 0,026
PB1	0,050 ± 0,010	0,830 ± 0,150	0,100 ± 0,020	0,750 ± 0,050
Prueba T Student	0,1	<0,05	0,09	<0,05

Finalmente, se consideró interesante el estudio de PB1 en líneas con resistencia adquirida a dasatinib. Con este objetivo se estableció una colaboración con el grupo del profesor Martin Sos de la universidad de Colonia (Alemania), que habían generado fibroblastos transfectados con resistencia a dicho fármaco. En concreto, se trataba de dos líneas celulares resistentes, cada una de las cuales tenía una de las mutaciones de sensibilidad a dasatinib junto a una de resistencia al fármaco (Tabla 34).

Tabla 34: Características genéticas de los fibroblastos transfectados.

Líneas celular	Mutación sensible a dasatinib	Mutación resistente a dasatinib
NIH3T3 (I638F+T654M)	I638F	T654M
NIH3T3 (L239R+T654M)	L239R	T654M

En contra de lo esperado, ninguna de dichas líneas presentaba resistencia a dasatinib, observándose  $IC_{50}$  alrededor de 50 nM (Tabla 35). De la misma manera, PB1 mostró valores de

actividad parecidos a los observados en líneas sensibles al inhibidor. Así pues, en las condiciones de estudio no se trataba de fibroblastos resistentes a dasatinib, por lo que se decidió analizarlas en un cultivo de agar blando (ver apartado 3.2.4 y Figura 37).

Tabla 35: IC<sub>50</sub> de dasatinib y PB1 en líneas con la mutación T654M de DDR2.

Compuesto	IC <sub>50</sub> en NIH3T3 (I638F+T654M) (μM)	IC <sub>50</sub> en NIH3T3 (L239R+T654M) (μM)
Dasatinib	0,049 ± 0,014	0,059 ± 0,019
PB1	0,770 ± 0,140	0,600 ± 0,190
Prueba T Student	<0,05	<0,05

#### 4.3.2.2.1.2 Actividad antiproliferativa de PB1 en presencia de colágeno I

Una matriz extracelular es una entidad estructuralmente compleja que rodea y soporta las células que se encuentran en los tejidos donde las células crecen, se desplazan y se diferencian, manteniendo un íntimo contacto con ésta, cuya composición influye en los procesos celulares. La formación de la matriz extracelular implica la asociación física de tres clases de macromoléculas:

- Proteínas estructurales fibrosas, como las de colágeno y las elastinas.
- Glucoproteínas de adhesión, que comprenden a la fibronectina y la laminina.
- Un gel de proteoglicanos y hialuronanos.

En nuestro estudio las células se cultivaron en una matriz extracelular de colágeno I. Este entorno, aunque no idéntico a la matriz extracelular, se asemeja más al que se puede encontrar en el interior tumoral que los cultivos en monocapa habituales sobre plástico.

Se seleccionaron dos líneas representativas con alteraciones de *DDR2* para determinar la actividad antiproliferativa de PB1 en presencia de colágeno I, una con sobreexpresión de *DDR2 wt* (H520) y una portadora de la mutación I638F de *DDR2* (H2286). En el caso de la mutación puntual, se escogió ésta en lugar de la L239R ya que se trataba de una mutación activadora, mientras que la función de la alteración L239R de *DDR2* no está definida.

En el caso de la línea H2286 se empeoró significativamente la actividad obtenida en los estudios en MTT, mientras que para las células con *DDR2 wt* se mantuvo la actividad antiproliferativa (Tabla 36).

Tabla 36: Comparación de la actividad antiproliferativa de PB1 en presencia Colágeno I y en MTT en líneas con alteraciones en *DDR2*.

Línea celular	H2286	H520
IC <sub>50</sub> en presencia de Colágeno I (μM)	0,34	0,28
IC <sub>50</sub> en MTT (μM)	0,05	0,35
Prueba T student	<0,05	0,08

#### 4.3.2.2.2 Actividad antiproliferativa de PB1 en agar blando

Los ensayos de formación de colonias tienen como objetivo evaluar la capacidad de las células para dividirse y formar colonias después de haber sido expuestas a un tratamiento, en nuestro



caso después de haber sido sometidas a la acción de un fármaco. La complejidad de los sistemas sometidos a estudio aumenta respecto a los estudios en monocapa, ya que las células forman estructuras tridimensionales más similares a las que se dan en el interior tumoral.

Se estudiaron 4 líneas celulares:

- Dos líneas con alteraciones de *DDR2*, las mismas que se habían seleccionado para los estudios en presencia de colágeno I.
- Las dos líneas procedentes de fibroblastos transfectados, portadoras de la mutación de resistencia a dasatinib T654M de *DDR2*: la NIH3T3 (I638F y T654M) y la NIH3T3 (L239R y T654M).

Debido a la mayor complejidad de la técnica respecto a los ensayos en monocapa, los experimentos se llevaron a cabo a tres concentraciones distintas de PB1 y dasatinib.

En la línea celular H520, PB1 muestra un valor de actividad muy superior, alrededor de 5  $\mu\text{M}$  (Figura 36), al obtenido en los estudios en monocapa de MTT y colágeno I, donde las  $\text{IC}_{50}$  eran de 0,35 y 0,28  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Para la línea H2286 la actividad antiproliferativa de PB1 continua siendo inferior a 0,5  $\mu\text{M}$  (Figura 36) sin alcanzar el rango nM que se obtuvo en MTT (50 nM).

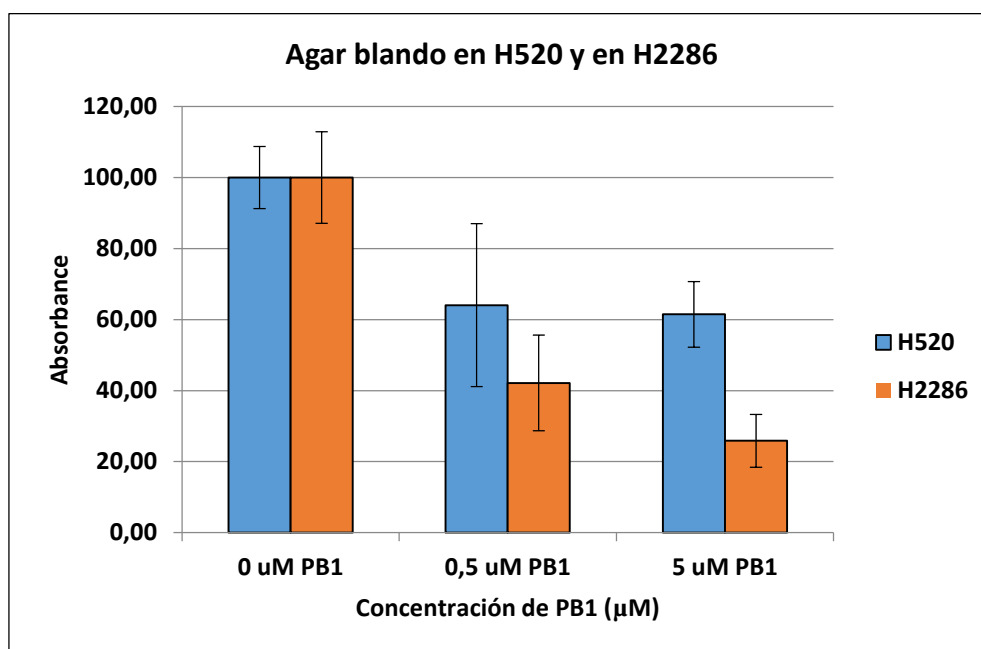


Figura 36: Actividad antiproliferativa de PB1 en agar blando en dos líneas características de *DDR2*.

Respecto los fibroblastos transfectados, los datos obtenidos mostraron como las células eran resistentes a dasatinib en este tipo de ensayo, ya que a una concentración 0,5  $\mu\text{M}$  de inhibidor la viabilidad celular fue superior al 80% (Figura 37). PB1 resultó ser activo en una de las líneas celulares, la portadora de las mutaciones L239R y T654M de *DDR2*, con una actividad antiproliferativa inferior a 0,1  $\mu\text{M}$ . No obstante, en la línea con las mutaciones I638F y T654M de *DDR2* a 0,5  $\mu\text{M}$  más del 60% de las células permanecían viables (Figura 37), mientras que a esta concentración de compuesto en los estudios de MTT el porcentaje de células viables era inferior al 50%.

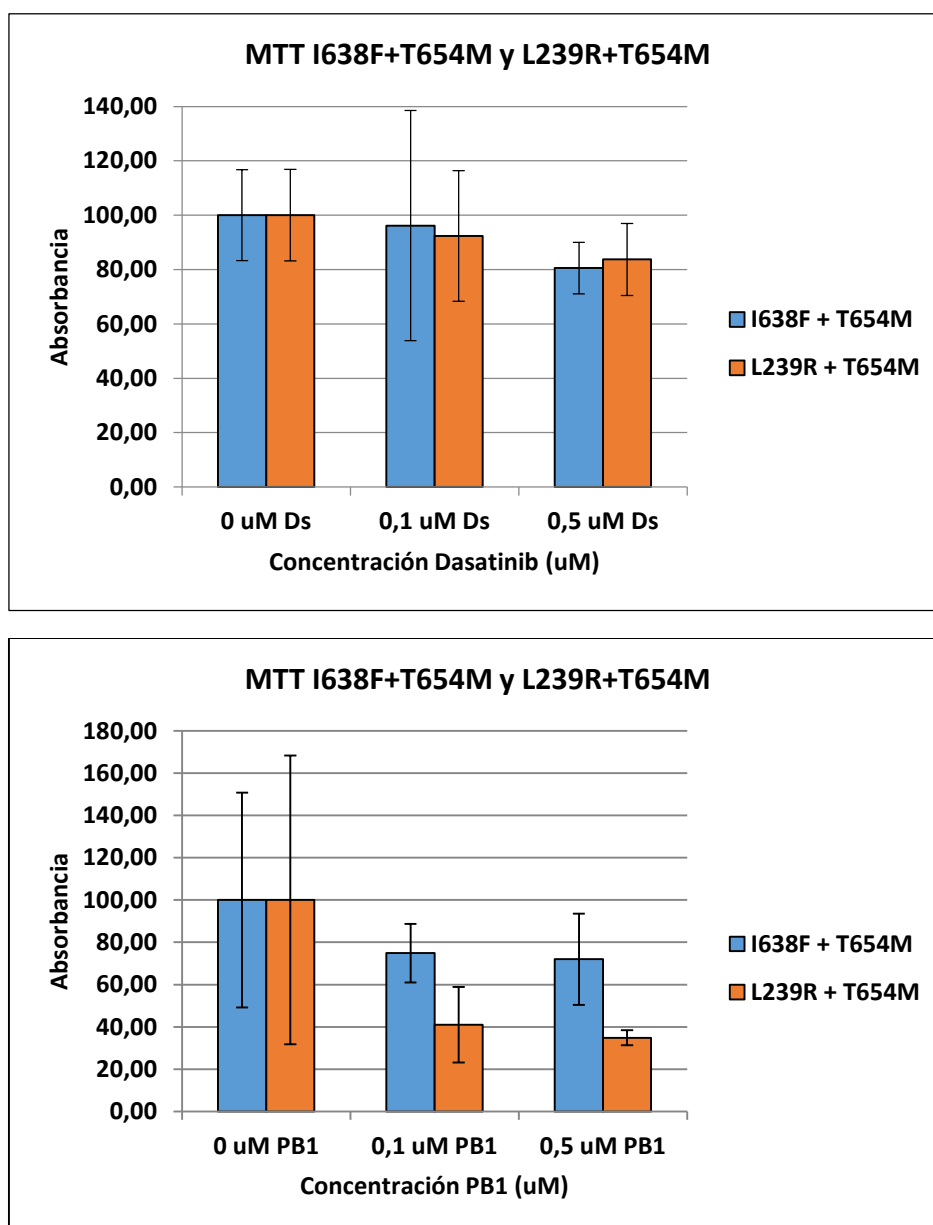


Figura 37: Actividad antiproliferativa en agar de dasatinib y PB1 en los fibroblastos transfectados resistentes a dasatinib.

#### 4.3.2.2.3 Líneas resistentes a dasatinib

Después de los resultados obtenidos con los fibroblastos transfectados con la mutación T654M en *DDR2* en los que sólo se observó resistencia a dasatinib en los estudios de formación de colonias, se establecieron en el laboratorio líneas resistentes al inhibidor.

##### 4.3.2.2.3.1 Generación de líneas resistentes a dasatinib

Se seleccionaron las líneas H2286 y HCC366, portadoras de mutaciones sensibles a dasatinib en las que la actividad del inhibidor era inferior a 100 nM.

Las células se sometieron a un tratamiento con dasatinib a una concentración similar a su  $IC_{50}$ , 20 nM para la línea H2286 Y 70 nM para la línea HCC366. Posteriormente, se incrementó la concentración de inhibidor hasta generar líneas resistentes en las cuales a 2  $\mu$ M la viabilidad celular era total.

En ambos casos se observaron cambios morfológicos significativos. Las células H2286 resistentes a dasatinib (H2286-DR) eran células de mayor tamaño y con más tendencia a formar agregados que la línea parental sensible al inhibidor y presentaban un crecimiento notablemente más lento que el de las H2286 sensibles al inhibidor (Figura 38).

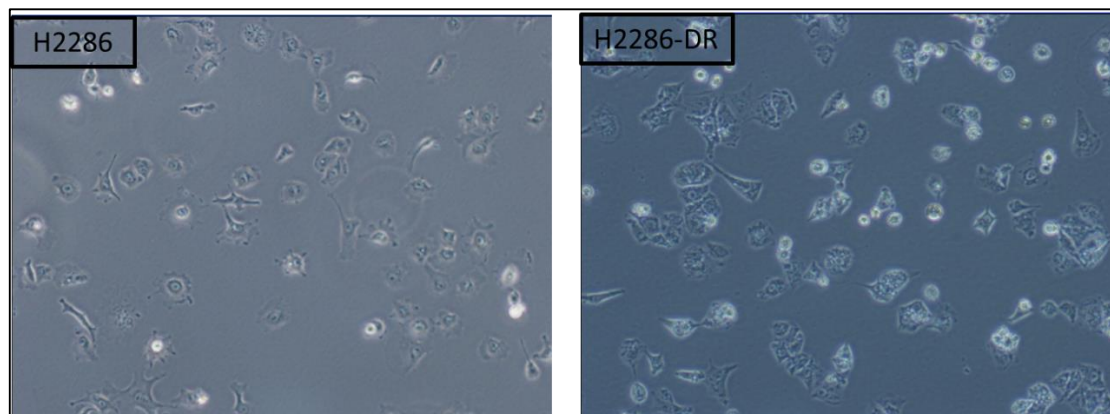


Figura 38: Imágenes de la línea H2286 sensible a dasatinib y de la H2286-DR resistentes a dasatinib.

En el caso de la línea celular HCC366 resistente a dasatinib (HCC366-DR) los cambios observados eran similares a los de la línea H2286. También en este caso, las células resistentes eran de mayor tamaño, su crecimiento era más lento y tenían más tendencia a formar agregados. Además, presentaban formas más alargadas que las HCC366 parentales (Figura 39).

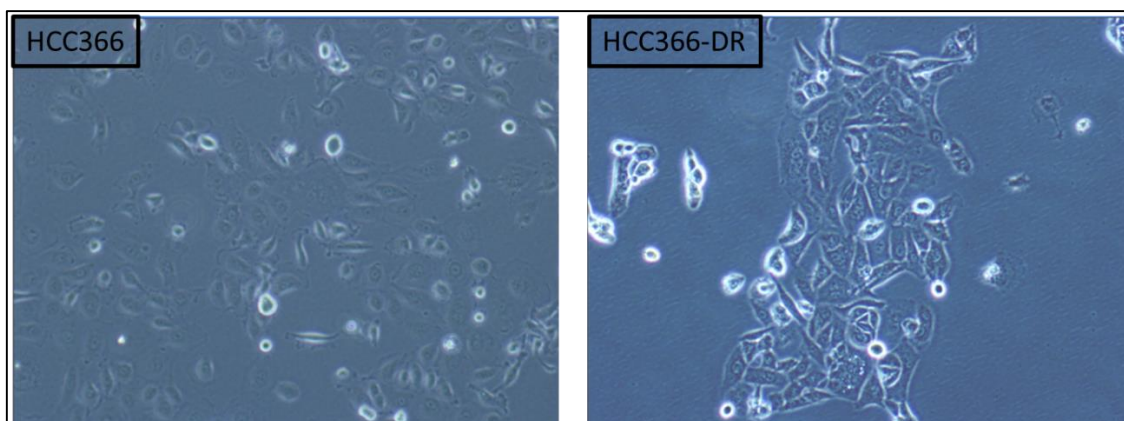


Figura 39: Imágenes de la línea HCC366 sensible a dasatinib y de la HCC366-DR resistentes a dasatinib.

#### 4.3.2.2.3.2 Secuenciación de las líneas resistentes a dasatinib

Se decidió secuenciar las líneas generadas resistentes a dasatinib con dos objetivos:

- Confirmar si mantenían la mutación en *DDR2* de sensibilidad a dasatinib, la I638F en el caso de las H2286 y la L239R en las HCC366.
- Estudiar la posible aparición de la mutación de T654M en *DDR2*, que confiere resistencia a dasatinib.

En ambos casos se corroboró el mantenimiento de las mutaciones sensibles a dasatinib, I638F y L239R (Figura 40). Sin embargo, en ninguna de las líneas resistentes se observó la mutación T654M. Así pues, las líneas habían adquirido resistencia a dasatinib mediante un mecanismo distinto a dicha alteración genética.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

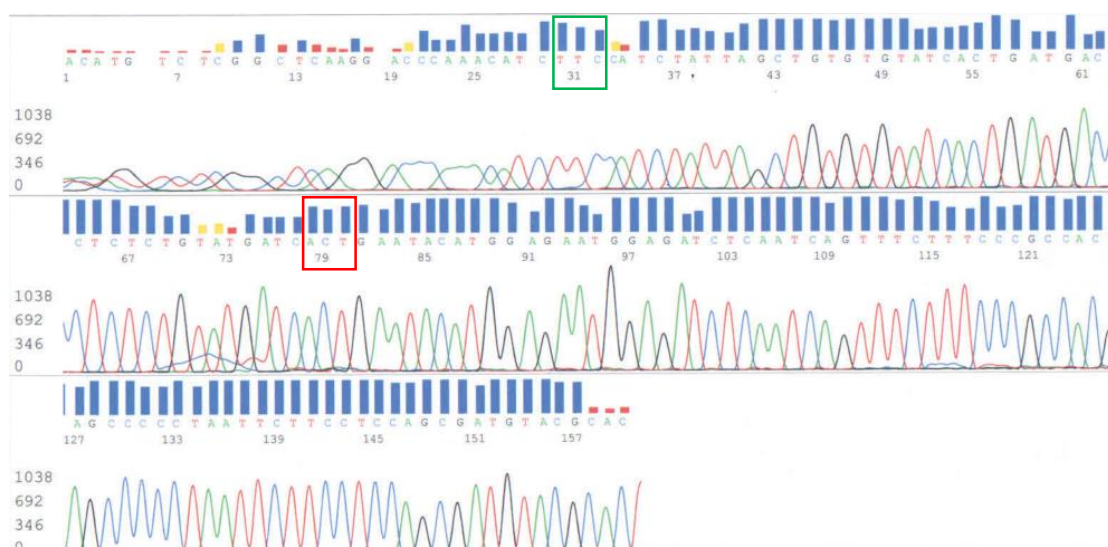


Figura 40: Secuencia de la línea H2286. En verde la mutación I638F en que hay un cambio de una adenina por una timina y en rojo la posición en que debería estar la mutación de resistencia a dasatinib, T654M, en que se cambia una citosina y una timina por una timina y una guanidina.

### 4.3.2.2.3.3 Actividad antiproliferativa en las líneas resistentes a dasatinib

Aunque las  $IC_{50}$  de PB1 eran superiores respecto a las líneas parentales, el compuesto continuaba teniendo valores de actividad inferiores a  $1 \mu M$  en las H2286-DR y de  $5,92 \mu M$  para la línea HCC366-DR. En cambio, dasatinib no presentaba actividad antiproliferativa (Tabla 37).

Tabla 37: Actividad antiproliferativa de dasatinib y PB1 en las líneas H2286, H2286-DR, HCC366 y HCC366-DR.

Compuesto	$IC_{50}$ en H2286 ( $\mu M$ )	$IC_{50}$ en H2286-DR ( $\mu M$ )	$IC_{50}$ en HCC366 ( $\mu M$ )	$IC_{50}$ en HCC366-DR ( $\mu M$ )
Dasatinib	0,020	>50,000	0,070	>50,000
PB1	0,050	0,660	0,830	5,920
Prueba T student	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

### 4.3.2.3 Estudios para determinar la actividad de PB1 en líneas portadoras de mutaciones en KRAS

Después de los resultados obtenidos en el estudio de viabilidad celular en un amplio panel de líneas celulares, donde se observó que PB1 presentaba  $IC_{50}$  entre  $0,4 \mu M$  y  $1,1 \mu M$  para líneas portadoras de mutaciones de *KRAS* (4.3.2), se decidió ampliar los análisis en estas líneas celulares.

#### 4.3.2.3.1 Comparación de la actividad anti proliferativa de PB1 con otros fármacos

Se realizó un estudio de viabilidad celular comparativo en las cinco líneas portadoras de mutaciones de *KRAS* comentadas anteriormente (Tabla 38) entre PB1, paclitaxel y selumetinib.

Paclitaxel es un fármaco quimioterapéutico cuyo uso está ampliamente extendido en pacientes con este tipo de alteraciones genéticas, para las cuales no existen fármacos dirigidos. Sin embargo, sus importantes efectos secundarios, como consecuencia de su baja selectividad, unidos a las bajas tasas de respuesta y supervivencia de los pacientes hacen imprescindible el desarrollo de tratamientos más efectivos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por su parte, selumetinib es un inhibidor de *MEK*. Tal y como ya se ha comentado en el apartado 1.1.4.5.1, inhibidores de este gen se presentan como potenciales fármacos para pacientes portadores de mutaciones en *KRAS* <sup>38</sup>.

En todas las líneas sometidas a estudios en monocapa de MTT, PB1 presentó  $IC_{50}$  inferiores a 1,2  $\mu M$  mientras que selumetinib presentó valores superiores, con  $IC_{50}$  por encima de 5  $\mu M$ . Tan solo la actividad antiproliferativa de selumetinib en la línea Calu6, 0,34  $\mu M$ , fue significativamente mejor que la de PB1, 1,00  $\mu M$  (Tabla 38).

En cuanto a la comparativa con paclitaxel, las diferencias entre PB1 y el agente quimioterapéutico no difieren de manera significativa en 3 de las líneas estudiadas (H460, DLD-1 y H23). En cuanto a A549 y Calu6, en la primera PB1 tiene una actividad antiproliferativa de 0,43  $\mu M$  frente a 3,13  $\mu M$  de paclitaxel; mientras que en la segunda se da la situación opuesta, el agente quimioterapéutico tiene una  $IC_{50}$  de 30 nM y PB1 de 1  $\mu M$  (Tabla 38).

*Tabla 38:  $IC_{50}$  de PB1, selumetinib y paclitaxel en líneas portadoras de mutaciones en *KRAS*.*

Línea celular	$IC_{50}$ de PB1 ( $\mu M$ )	$IC_{50}$ de selumetinib ( $\mu M$ )	Prueba T student	$IC_{50}$ de paclitaxel ( $\mu M$ )	Prueba T student
A549	0,430	3,48	<0,05	3,13	<0,05
Calu6	1,00	0,34	<0,05	0,03	<0,05
H460	0,72	6,52	<0,05	1,26	0,09
DLD1	1,00	5,76	<0,05	1,35	0,06
H23	1,13	5,63	<0,05	1,98	0,06

### 4.3.2.3.2 Actividad antiproliferativa de PB1 en presencia de colágeno I

Se seleccionaron las dos líneas celulares, la A549 con la mutación G12S y la H23 con la mutación G12C de *KRAS*.

En ninguno de los casos estudiados los resultados obtenidos en los ensayos de colágeno I difieren significativamente de los obtenidos en MTT (Tabla 39).

*Tabla 39:  $IC_{50}$  de PB1 en los estudios de MTT y en presencia de colágeno en dos líneas portadoras de mutaciones de *KRAS*.*

Línea celular	A549	H23
$IC_{50}$ de PB1 en MTT ( $\mu M$ )	0,43	1,13
$IC_{50}$ de PB1 en colágeno I ( $\mu M$ )	0,61	0,83
Prueba T student	0,07	0,06

### 4.3.2.3.3 Actividad antiproliferativa de PB1 en agar blando

En el caso del agar blando la actividad antiproliferativa de PB1, en las líneas A549 y H23, empeoraba respecto los estudios en monocapa de MTT. Aunque no se pudo determinar la  $IC_{50}$  de PB1, ya que tan solo se utilizaron 3 concentraciones de compuesto, se observó que en ambas líneas estos valores se encontraban entre 0,5  $\mu M$  y 5  $\mu M$  (Figura 41).

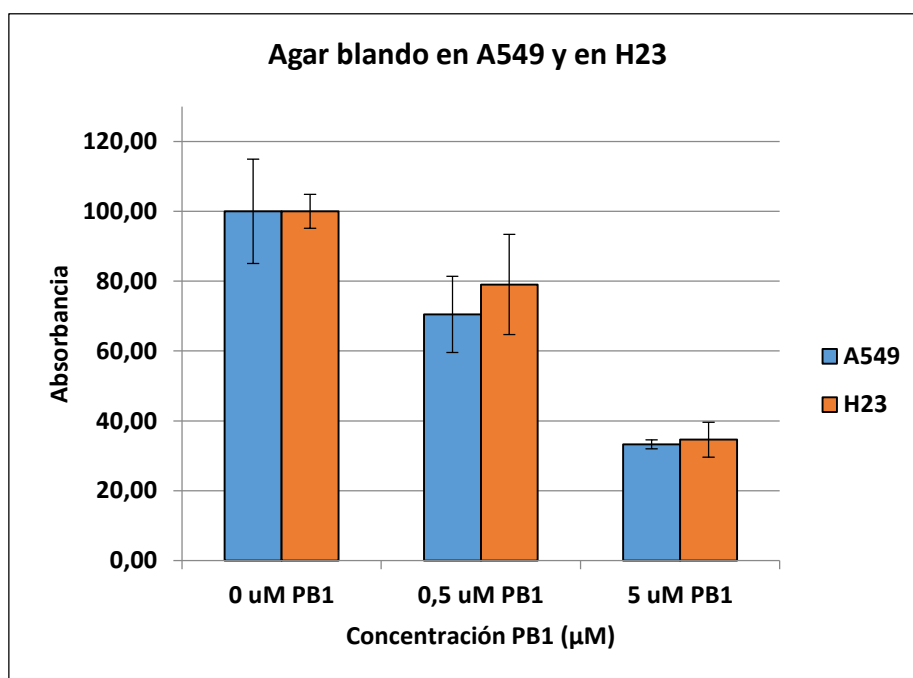


Figura 41: Actividad antiproliferativa de PB1 en agar blando en las líneas portadoras de mutaciones de KRAS.

#### 4.3.2.4 Estudios de viabilidad celular en la línea celular SW48

Solo se conoce una línea celular con mutación en el exón 18 de *EGFR* (G719S), la SW48, de origen colorrectal. Como ya se ha comentado, a pesar de no tratarse de células pulmonares, se decidió utilizar esta línea para estudiar el comportamiento de PB1 y distintos inhibidores de tirosina quinasa frente a dicha mutación.

Se comparó la actividad de gefitinib, dacomitinib, afatinib y PB1 en la línea celular SW48. La actividad antiproliferativa de PB1 era significativamente mejor que la del resto de inhibidores estudiados, con una  $IC_{50}$  de 0,75  $\mu$ M mientras que gefitinib, afatinib y dacomintinib presentaron valores de actividad entre 1,5  $\mu$ M y 5  $\mu$ M (Figura 42).

Tal y como se ha comentado anteriormente (1.1.4.5.2), gefitinib es uno de los fármacos de elección para el tratamiento en primera línea para pacientes con CPNM con alteraciones en los exones 19 y 21 de *EGFR*. Dada la ausencia de inhibidores específicos para pacientes con mutaciones en el exón 18 de este gen, también son tratados con gefitinib o fármacos similares como dacomitinib, afatinib o erlotinib. Sin embargo, las tasas de respuesta son muy inferiores a las obtenidas en pacientes con mutaciones en los exones 19 y 21. Así pues, los datos preclínicos de PB1 muestran su posible uso como tratamiento para pacientes portadores de la mutación G719S del exón 18 de *EGFR*.

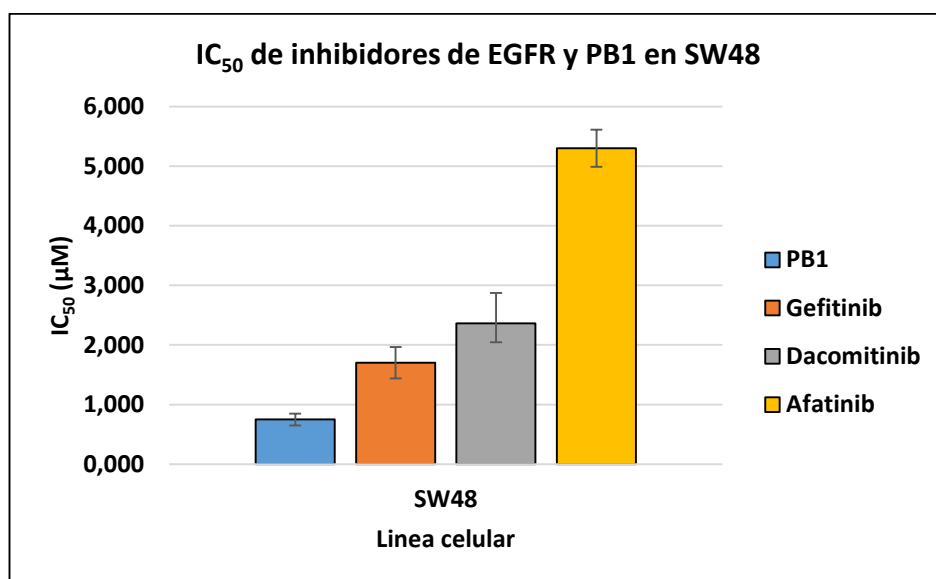


Figura 42: Comparación de las IC<sub>50</sub> de distintos inhibidores de EGFR con PB1 en SW48.

#### 4.3.2.5 Estudios de viabilidad celular en líneas celulares portadoras de mutaciones de EGFR en los exones 19, 20 y 21

Los estudios en proteína aislada mostraron una actividad residual de EGFR en presencia 10 µM de PB1 inferior al 50% cuando el gen presentaba las mutaciones L858R y L861Q del exón 21 o deleciones en el exón 19. Por este motivo, pese a que los resultados iniciales en cultivo celular no eran favorables, se decidió estudiar la actividad antiproliferativa de PB1 en un panel más amplio de líneas celulares portadoras de estas alteraciones sensibles a los inhibidores de EGFR (PC9 y 11-18) y con resistencia primaria (H1975 y H1650).

En las células sensibles, la actividad de PB1 era significativamente superior a la de los inhibidores específicos de EGFR de primera, segunda y tercera generación (gefitinib, afatinib, dacomitinib o AZD9291) (Tabla 40). Se obtuvo una IC<sub>50</sub> para PB1 superior a 1 µM, mientras que para los inhibidores sometidos a estudio se obtuvieron valores sensiblemente inferiores, entre 3 nM y 200 nM.

Tabla 40: Valores de actividad de distintos inhibidores de EGFR y de PB1 en líneas portadoras de mutaciones sensibles de EGFR.

Compuesto	IC <sub>50</sub> 11-18 (µM)	IC <sub>50</sub> PC9 (µM)
PB1	4,900	1,670
Gefitinib	0,052	0,039
Prueba T student	<0,05	<0,05
Dacomitinib	0,020	0,013
Prueba T student	<0,05	<0,05
Afatinib	0,740	0,003
Prueba T student	<0,05	<0,05
AZD9291	0,035 <sup>145</sup>	0,165
Prueba T student	-----	<0,05

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las líneas celulares con resistencia primaria, H1650 y H1975, PB1 también presentó IC<sub>50</sub> superiores a las de los inhibidores de segunda y tercera generación (Tabla 41).

Tabla 41: Valores de actividad de distintos inhibidores de EGFR y de PB1 en líneas con resistencia primaria de EGFR.

Compuesto	IC <sub>50</sub> H1975 (μM)	IC <sub>50</sub> H1650 (μM)
PB1	2,070	2,900
Gefitinib	11,000	13,700
Prueba T student	<0,05	<0,05
Dacomitinib	0,335 <sup>145</sup>	1,600
Prueba T student	-----	0,08
Afatinib	0,001	1,750
Prueba T student	<0,05	0,12
AZD9291	0,230	>0,250 <sup>145</sup>
Prueba T student	<0,05	-----

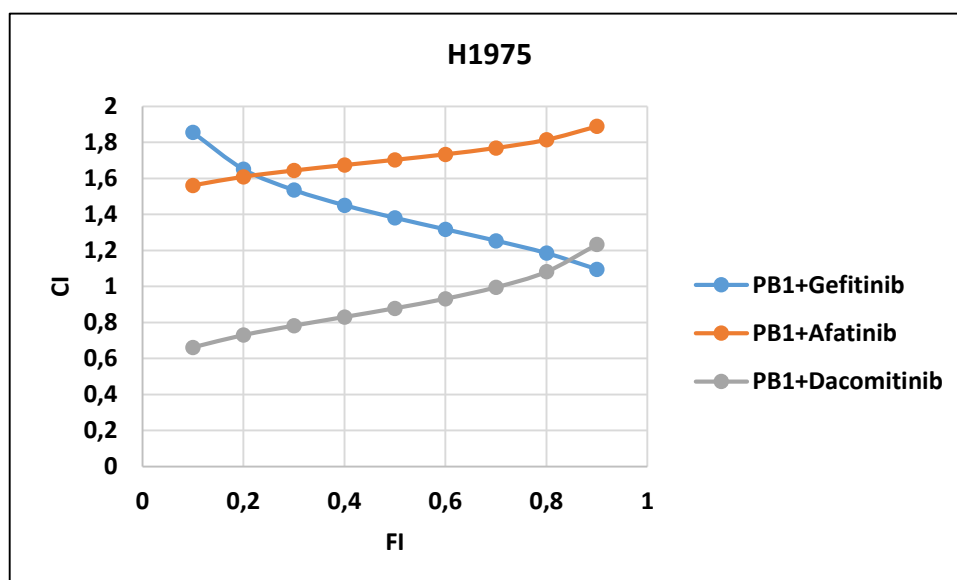
Así pues, a pesar de los resultados obtenidos en proteína aislada, PB1 presentó valores de actividad antiproliferativa superiores a los inhibidores de primera generación, en las líneas con mutaciones sensibles a los ITQ, y a los inhibidores de segunda y tercera generación, en las líneas con resistencia primaria. Por ello, se descartó su uso en estas alteraciones genéticas.

### 4.3.2.6 Combinación de PB1 con otros inhibidores de proteínas quinasas

Se realizaron experimentos de combinación de PB1 con otros ITQ a fin de determinar la naturaleza de la interacción y, en particular, si existía sinergia en alguno de los casos.

#### 4.3.2.6.1 Combinación de PB1 con inhibidores de EGFR

Se estudió el efecto de la combinación de PB1 con inhibidores de EGFR en líneas con resistencia primaria por el método de Chou-Talalay <sup>142</sup>. En todos los casos se observó un efecto aditivo o moderadamente antagónico con un índice de combinación superior a 1 (Figura 43, Figura 67- Figura 86).





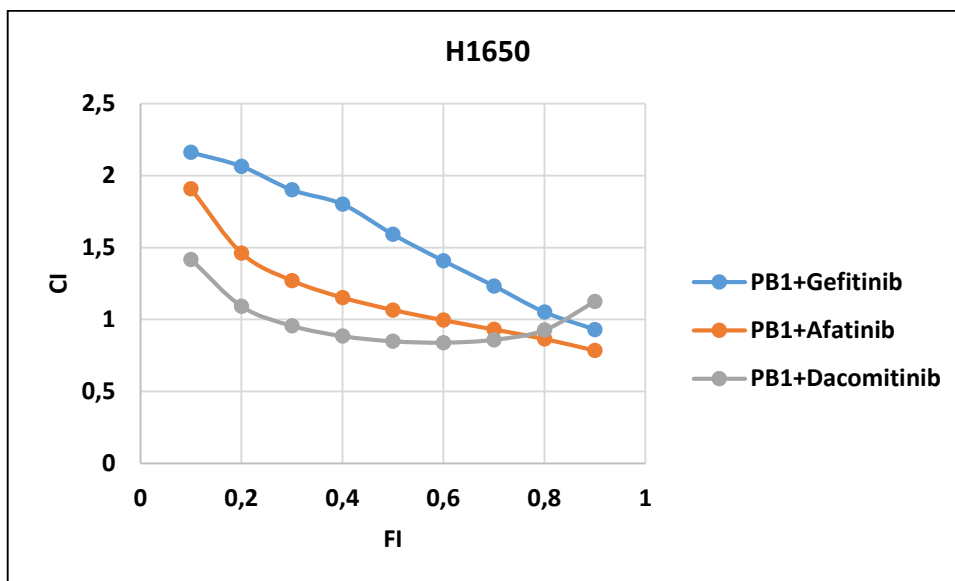


Figura 43: Índices de combinación de PB1 con inhibidores de EGFR en células con resistencia primaria a estos inhibidores, H1975 (gráfica superior) y H1650 (gráfica inferior).

#### 4.3.2.6.2 Combinación de PB1 con ITQ en líneas con mutaciones de KRAS

Se estudió el efecto de la combinación de PB1 con dos inhibidores, selumetinib y BGB324, en la línea celular A549, portadora de la mutación G12S de *KRAS*. Se eligió esta línea por la buena actividad de PB1, con una  $IC_{50}$  de 0,43  $\mu$ M.

Selumetinib es un inhibidor de *MEK*, tal y como ya se ha comentado (1.1.4.5.1). En cuanto a BGB324 se trata de un inhibidor de *AXL*, la sobreexpresión de este gen se ha descrito en células con alteraciones de *KRAS*.

Se observó un ligero efecto ligeramente sinérgico de la combinación de PB1 con selumetinib (Figura 44 y Figura 87-Figura 90), mientras que la combinación con BGB324 resultó ser aditiva (Figura 44, Figura 87 y Figura 91-Figura 93).

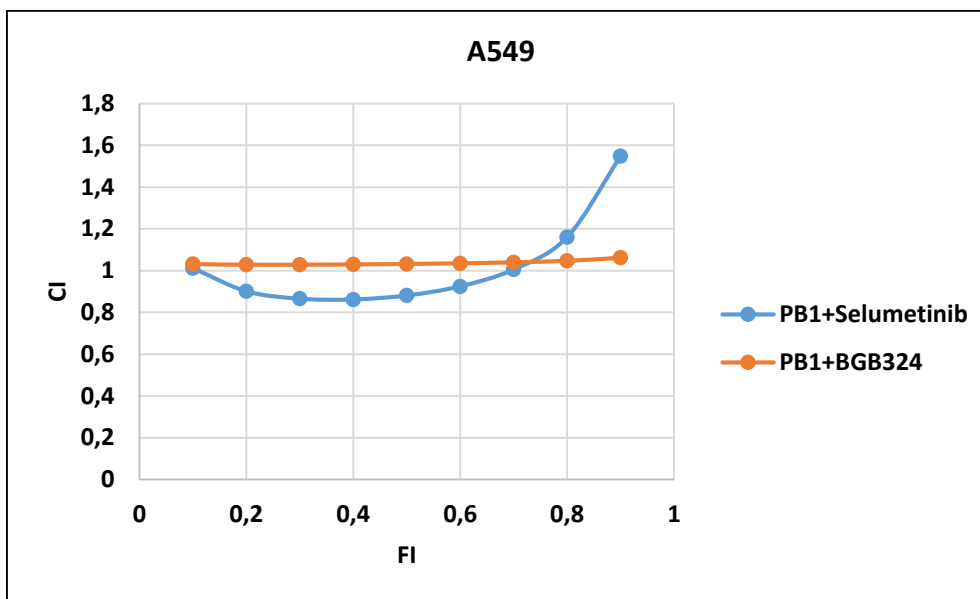


Figura 44: Índices de combinación de PB1 con selumetinib y BGB324 en la línea celular A549. Valores determinados en la  $IC_{50}$  del inhibidor.

#### 4.3.3 Estudio del mecanismo de acción de PB1

Los datos obtenidos en los estudios de viabilidad indicaban que las proteínas más relevantes en la actividad antitumoral de PB1 eran *DDR2* (*wt* y mutado) y *EGFR* con la mutación G719X. Se ampliaron los estudios alrededor de estas dos proteínas, con el objetivo de determinar el mecanismo de acción de PB1.

##### 4.3.3.1.1 Efectos de PB1 sobre la activación de *DDR2*

###### 4.3.3.1.1.1 Inducción de *DDR2*

*DDR2* es un receptor de membrana cuya actividad es inducida, entre otros ligandos, por la unión de colágeno I.

En un estudio preliminar realizado en la línea celular A549, portadora de la mutación G12S de *KRAS*, se comparó la activación de *DDR2* con un 10% de FBS y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de colágeno I a 10 minutos de tratamiento. Dado el mal funcionamiento del anticuerpo comercial contra la fosforilación de *DDR2* se llevó a cabo la inmunoprecipitación del receptor. Tal y como se muestra en la Figura 45, la activación del receptor es superior en el tratamiento con FBS que con el colágeno I. Por este motivo, se decidió utilizar un 10% de FBS en los estudios posteriores.

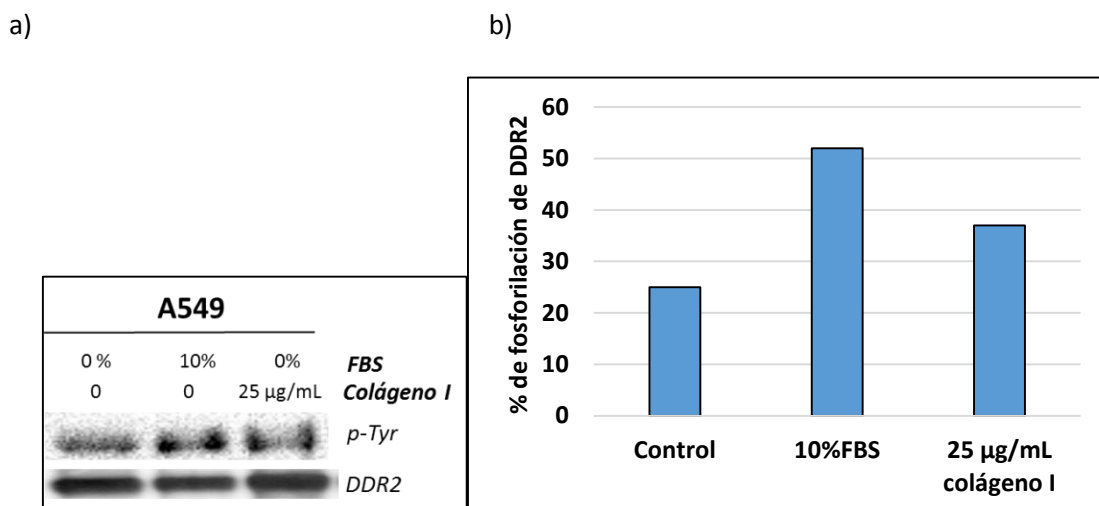


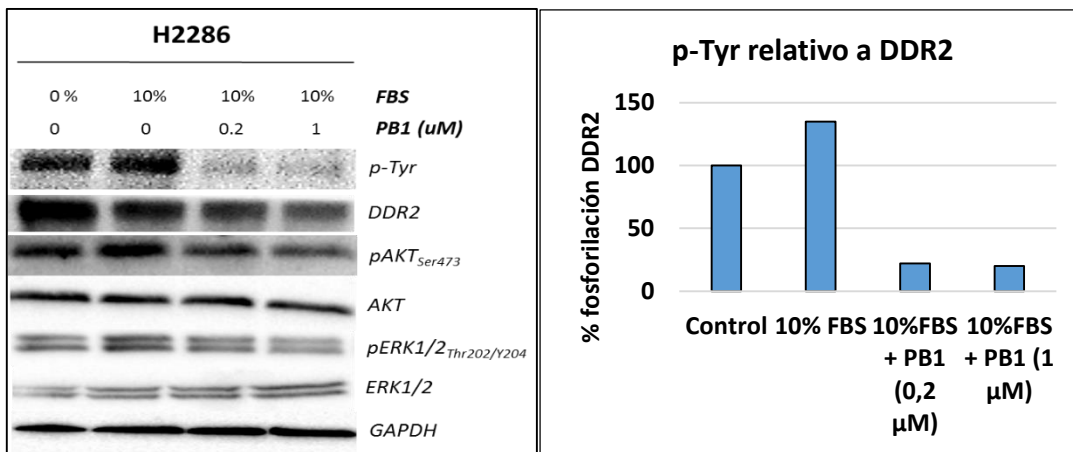
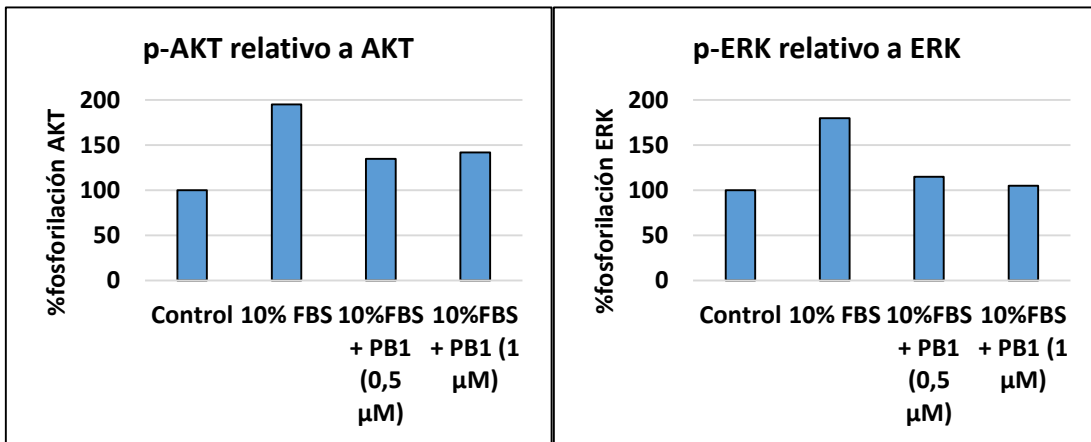
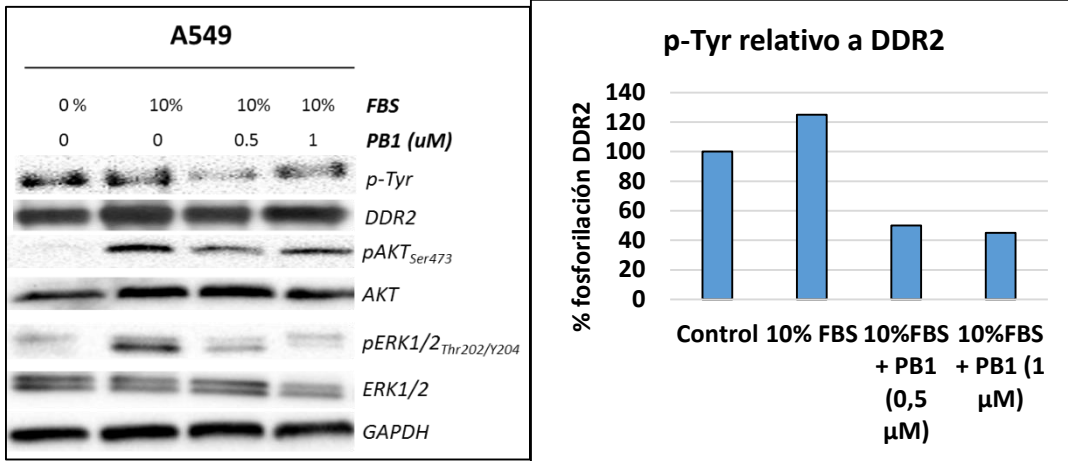
Figura 45: Western blot de la línea celular A549 con un 10% de FBS y 25 g/mL colágeno I. a) Imagen de la p-Tyr y de DDR2; b) Cuantificación de la p-Tyr respecto DDR2 total.

#### 4.3.3.1.1.2 Estudios de DDR2 en presencia de PB1

Se realizaron estudios de *western blot* para determinar el efecto de PB1 en la activación de DDR2 y dos proteínas involucradas en la vía de transducción de DDR2, AKT y ERK. Los estudios se realizaron a 24 horas y las líneas celulares sometidas a estudio fueron A549, H2286 y SCC4.

En A549 y H2286 PB1 presentaba una buena actividad antiproliferativa y la inhibición de la fosforilación de DDR2 se observó a bajas concentraciones del compuesto, 0,5 y 0,2 µM, respectivamente. En la línea celular SCC4 el efecto se observó a 1,5 µM, la IC<sub>50</sub> de PB1 en estas células era superior (Figura 46).

Respecto a ERK y AKT, en la línea A549 se observó una fuerte inhibición de la fosforilación de ERK y una ligera inhibición de AKT a la IC<sub>50</sub> de PB1 (0,5 µM), que se correlacionó con la inhibición observada en DDR2. En el caso de H2286, la inhibición de AKT resultó superior a la de ERK, pero en ninguno de los dos casos esta inhibición se correlacionó con la de DDR2. El bloqueo de la fosforilación de ERK y AKT producía una inhibición del 50% de la actividad de estas proteínas, mientras que la de DDR2 era del 100%. Finalmente, en la línea celular SCC4 el efecto de PB1 se observó a 1,5 µM, y los resultados obtenidos en ERK y AKT estuvieron en concordancia con los obtenidos en DDR2 (Figura 46).



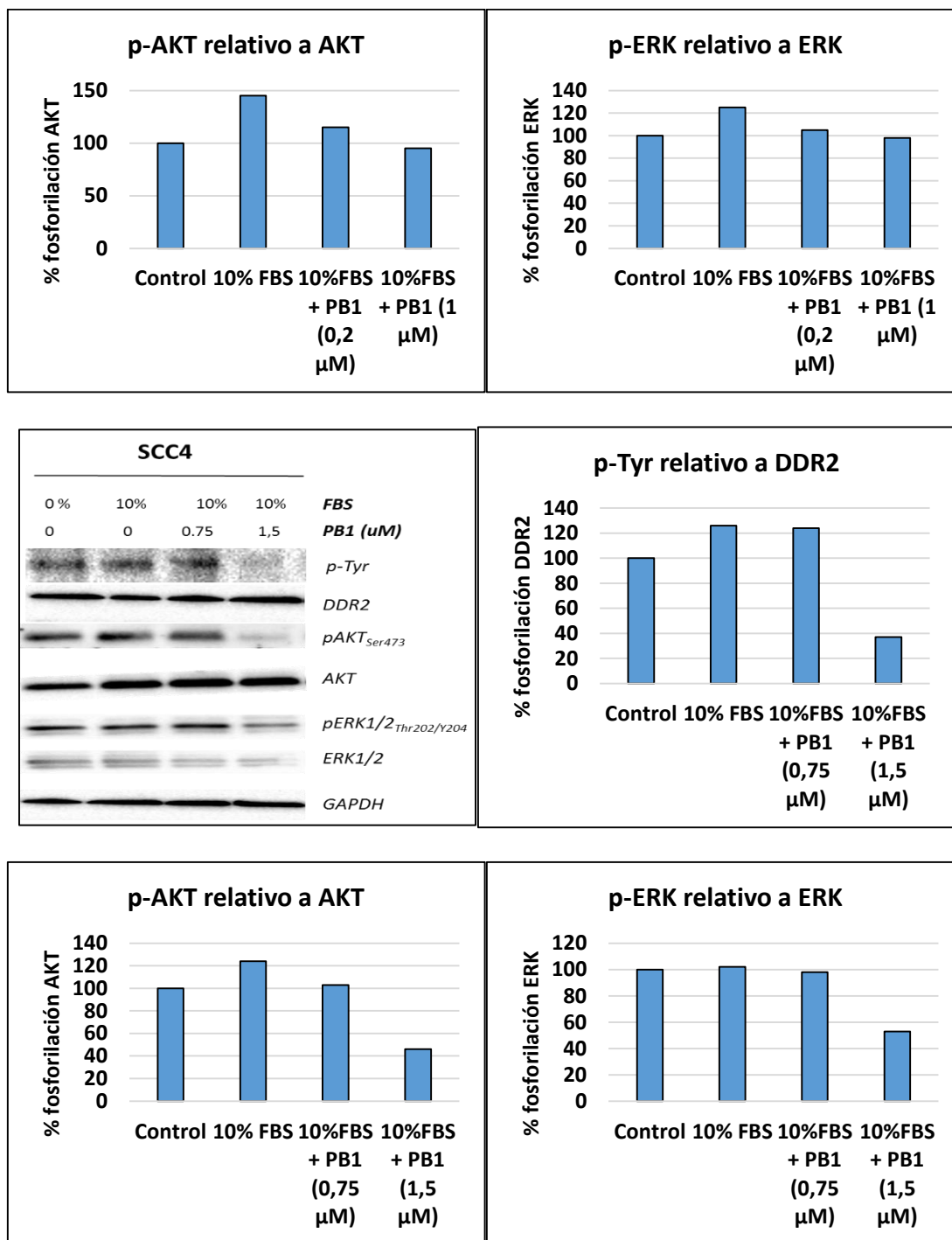


Figura 46: Western Blot de PB1 a distintas concentraciones en A549, H2286 y SCC4. Imágenes y cuantificación de las proteínas.

#### 4.3.3.1.2 Efectos de PB1 sobre la activación de EGFR (G719S)

Para determinar si la actividad antiproliferativa observada en la línea celular SW48 se correlacionaba de forma selectiva con una inhibición de la fosforilación de EGFR mutado en la posición 719 se realizaron estudios de *western blot* en las líneas PC9 (con la delección 15 pares de bases del exón 19 de *EGFR*) y SW48 (con una mutación G719S del exón 18 de *EGFR*). En ambas líneas celulares se indujo la fosforilación de EGFR con su ligando, EGF, y se adicionó PB1 a la IC<sub>50</sub> en SW48 (0,5  $\mu\text{M}$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PB1 bloqueó la activación de *EGFR* por su ligando en SW48, así como de *ERK* y *AKT*, proteínas que se encuentran en un nivel inferior en la vía de señalización celular del receptor (Figura 47 y Figura 48). A la misma concentración de compuesto, en la línea PC9 no se apreció inhibición de la fosforilación en ninguna de las proteínas sometidas a estudio (Figura 47 y Figura 49).

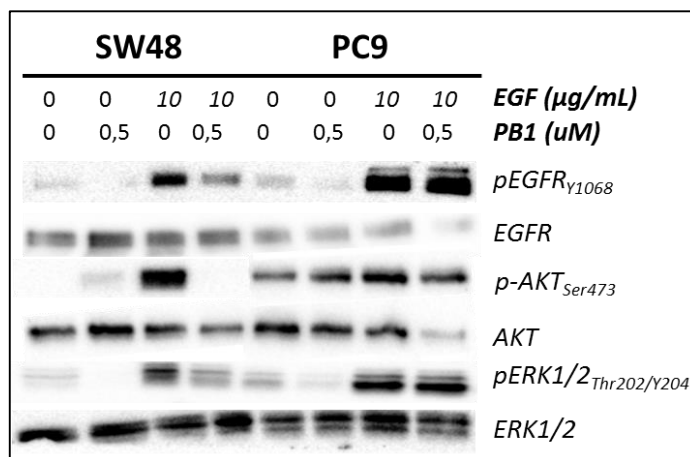


Figura 47: Imágenes y cuantificación de western blot de PB1 en SW48 y PC9.

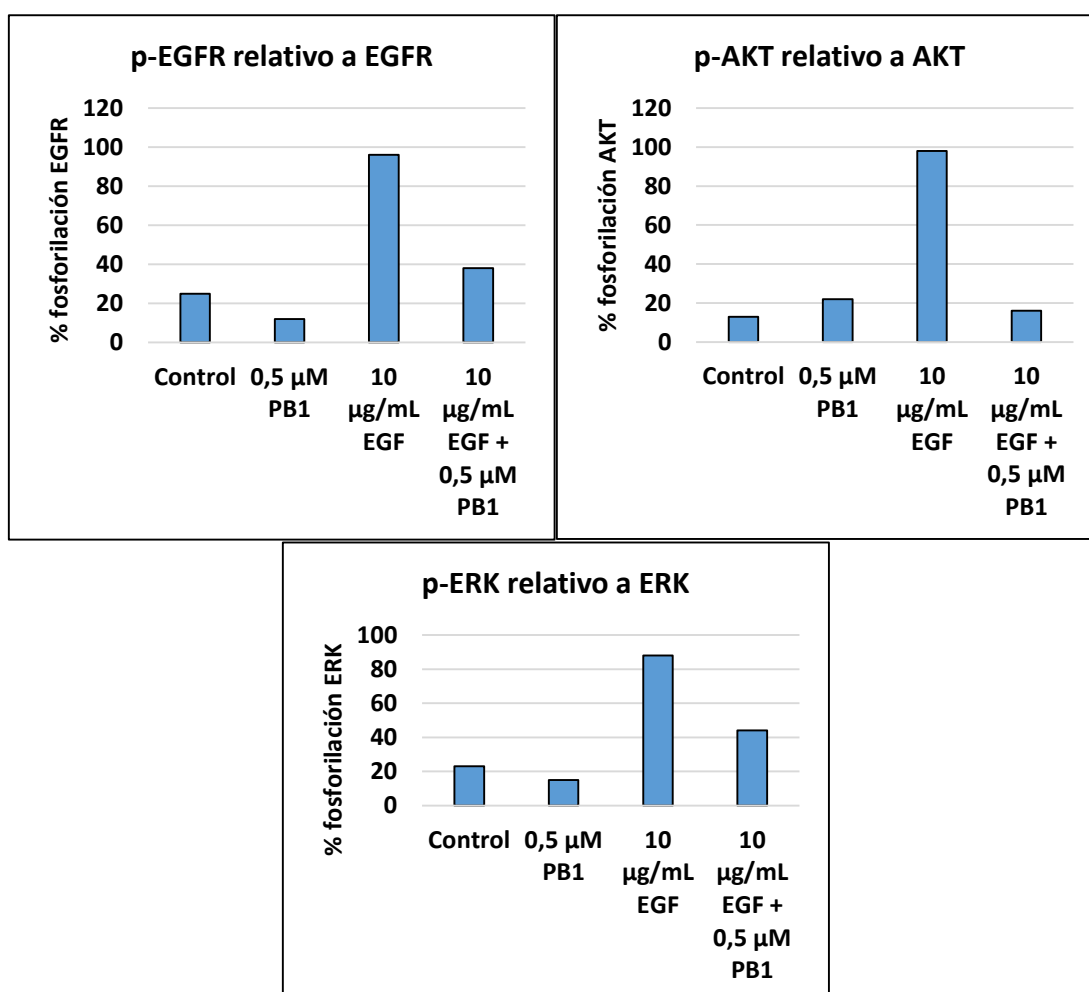


Figura 48: Cuantificación del western blot de PB1 en la línea celular SW48.

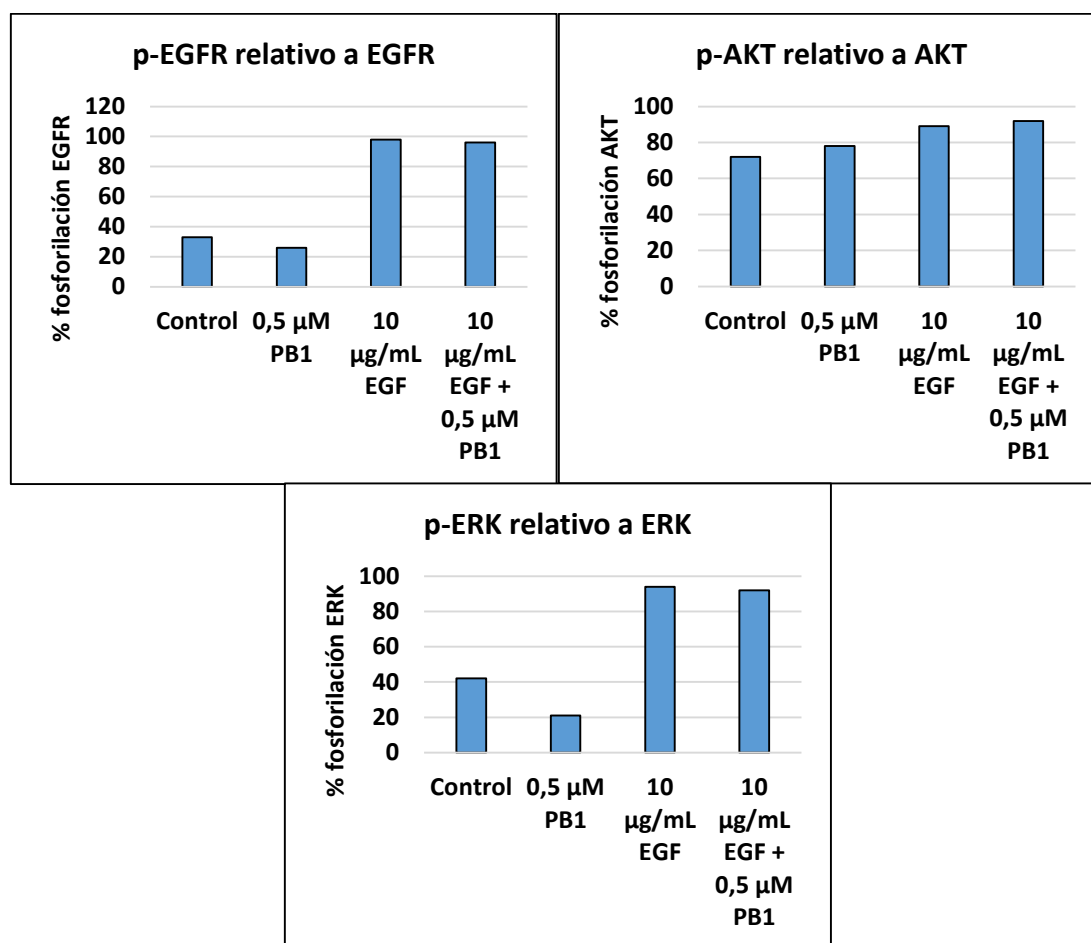


Figura 49: Cuantificación del western blot de PB1 en la línea celular PC9.

#### 4.3.4 Efectos de PB1 sobre el ciclo celular

Con la finalidad de poder determinar los efectos de PB1 sobre la progresión de las células sensibles en las distintas fases del ciclo celular se llevaron a cabo estudios de citometría de flujo. Los análisis se realizaron en las líneas celulares H2286 (con la mutación I638F de *DDR2*) y A549 (con la mutación G12S de *KRAS*). Como comparador se usó dasatinib que, como se ha comentado, es un ITQ con reactividad frente a varios receptores, entre ellos *DDR2*. Las concentraciones utilizadas fueron:

- En A549, 0,5  $\mu$ M de dasatinib y de PB1.
- En H2286, 0,1  $\mu$ M de ambas drogas.

En la línea A549 se observó una parada de las células en las fases S+G2/M del ciclo celular en presencia de PB1, disminuyendo significativamente la frecuencia de células en G0/G1, respecto al control sin tratamiento (Figura 50). Por otro lado, el tratamiento con dasatinib de esta línea celular no produjo efectos significativos (Figura 50).

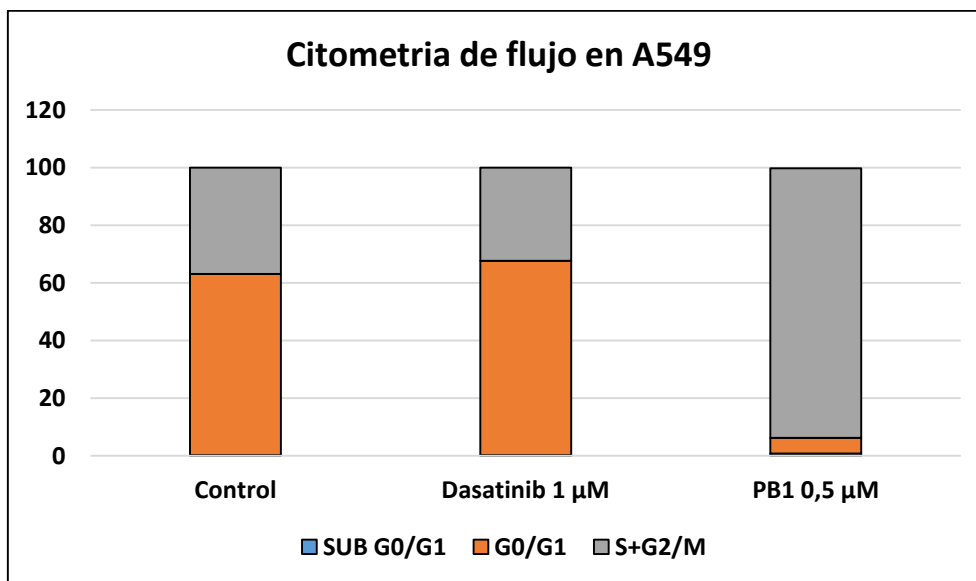


Figura 50: Citometría de flujo de PB1 y Dasatinib en A549 a 0,5 µM de ambos compuestos.

En la línea celular H2286 tratada con PB1 se observó el mismo comportamiento, es decir, la adición de PB1 producía paro celular en las fases S y G2/M. Los resultados obtenidos para esta línea celular en presencia de dasatinib mostraron, en cambio, una parada en la fase G0/G1 (Figura 51).

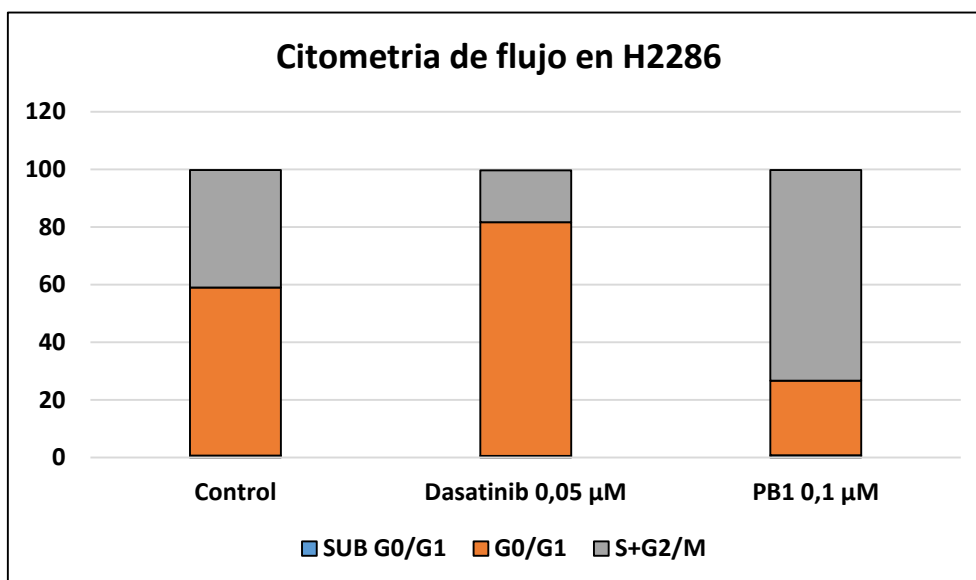


Figura 51: Citometría de flujo de PB1 y Dasatinib en H2286 a 0,1 µM de ambos compuestos.

#### 4.3.5 Evaluación global de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* de PB1

Una de las áreas de investigación biomédica más activa es la búsqueda de nuevas moléculas que interfieran en las vías de transducción de señal con el objetivo de utilizarlas en el tratamiento de tumores y otras enfermedades caracterizadas por una proliferación celular excesiva <sup>146</sup>. Entre dichas moléculas se incluyen los inhibidores de tirosina quinasa, que se unen al dominio quinasa de los RTQ bloqueando su actividad y sus rutas de señalización celular.



Como se ha descrito, inicialmente se realizó un estudio radiométrico para determinar la actividad residual de 24 quinasas frente 60 nuevos compuestos pirido[2,3-*d*]pirimidínicos con distintos sustituyentes. 16 de estos compuestos produjeron una disminución de la actividad residual de alguna de las proteínas por debajo del 20% y se seleccionaron para ensayos en líneas celulares que incluían alteraciones de *ROS1*, *DDR2*, *ALK*, *EGFR* y *KRAS*. En los compuestos C7, PB1 y C18; la baja actividad residual observada en proteína aislada se tradujo en unos valores de IC<sub>50</sub> de entre 0,43 μM y 5,4 μM. Sin embargo, para el resto de compuestos no se pudo establecer esta correlación; a pesar de presentar actividades residuales inferiores al 20% en proteína aislada, las actividades antiproliferativas fueron superiores a 5 μM.

La dificultad sintética de C7 y la elevada actividad antiproliferativa de C18 en células no tumorales llevó a que los estudios se continuaran exclusivamente con PB1.

Si se comparan las estructuras de PB1 y C7 con la de C18, la diferencia más evidente es la presencia de un grupo amino (NH<sub>2</sub>) en el carbono C4 del anillo pirimidínico (Figura 52). Respecto, a los resultados biológicos, el dato distintivo es la diferente actividad antiproliferativa en células no tumorales. PB1 y C7 presentaron actividad antiproliferativa selectiva. Sin embargo, C18 presentó actividades similares, entre 1,2 μM y 2,6 μM, en células tumorales y normales.

C18 es un análogo de los compuestos pirido[2,3-*d*]pirimidínicos sintetizados por Klutchko *et al.*, ninguno de los cuales presentaba un sustituyente en C4 del anillo pirimidínico. Los datos en proteína aislada de esta familia de compuestos mostraron valores de actividad entre 5 nM y 100 nM para *EGFR*, *FGFR* y *PDGFR*<sup>147</sup>. Sin embargo, estudios posteriores en fibroblastos NIH3T3 no tumorales mostraron valores de toxicidad elevados, de 95 nM<sup>148</sup>. Por lo tanto, el grupo NH<sub>2</sub> presente en C4, exclusivamente en C7 y PB1, podría ser el responsable de su toxicidad selectiva frente las células tumorales(Figura 52).

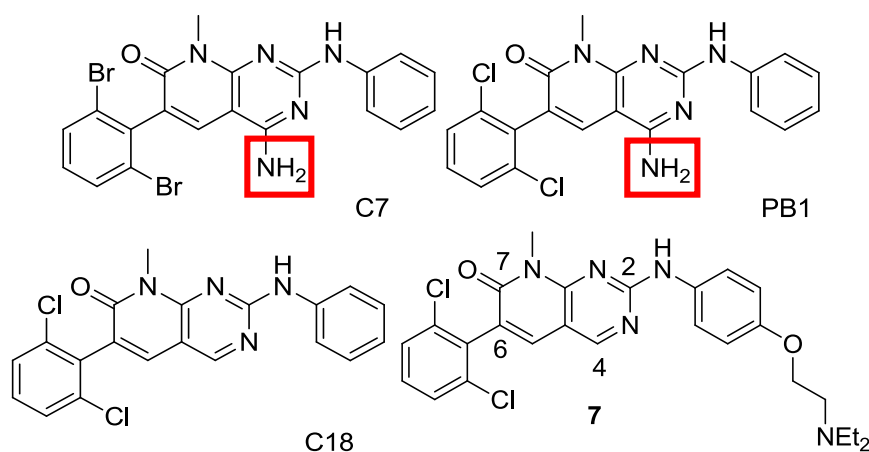


Figura 52: Estructura C7, PB1, C18 y 7 (estructura pirido[2,3-*d*]pirimidínica de Klutchko)<sup>147</sup>.

Estudios en proteína aislada de PB1 mostraron actividad en *DDR2* (*wt* y mutado) y en *EGFR* (con deleciones del exón 19 y con la mutación G719S del exón 18). En todos los casos se correlacionó esta actividad con la actividad antiproliferativa obtenida en cultivo celular, a excepción de las deleciones del exón 19 de *EGFR*. En líneas celulares con sobreexpresión de *DDR2 wt*, portadoras de mutaciones de *DDR2* y con la mutación G719S de *EGFR* se obtuvieron IC<sub>50</sub> entre 0,05 μM y

0,75  $\mu$ M para PB1, mientras que la línea celular PC9, con una delección de 15 pares de bases en el exón 19 de *EGFR*, la  $IC_{50}$  era de 1,67  $\mu$ M.

Finalmente, el estudio de la actividad antiproliferativa de PB1 en una línea portadora de la mutación G12S de *KRAS* dio un valor de 0,43  $\mu$ M. La ausencia de inhibidores específicos de la actividad de este oncogén motivó que se ampliases los estudios del compuesto en células tumorales con este tipo de alteraciones genéticas.

#### 4.3.5.1 *PB1 en SCC de pulmón con alteraciones de DDR2*

La sobreexpresión de *DDR2* es frecuente en carcinomas escamosos de distintas histologías, y sus mutaciones se han identificado, mediante secuenciación Sanger, en el 3,8% de CPNM escamosos y líneas celulares de esta misma histología<sup>149</sup>.

La sobreexpresión de *DDR2* activa la vía de transducción de señal de AKT y ERK promoviendo la proliferación, migración y metástasis celular mediante la regulación de la transición epitelial-mesenquimal<sup>13, 107</sup>.

Se han descrito diferentes mutaciones de *DDR2* en carcinomas escamosos pulmonares repartidas a lo largo de todo el gen (Figura 53). Sin embargo, en el presente trabajo tan solo se estudiaron dos de ellas (I638F y L239R), ya que no se disponía de líneas celulares portadoras de otras mutaciones.

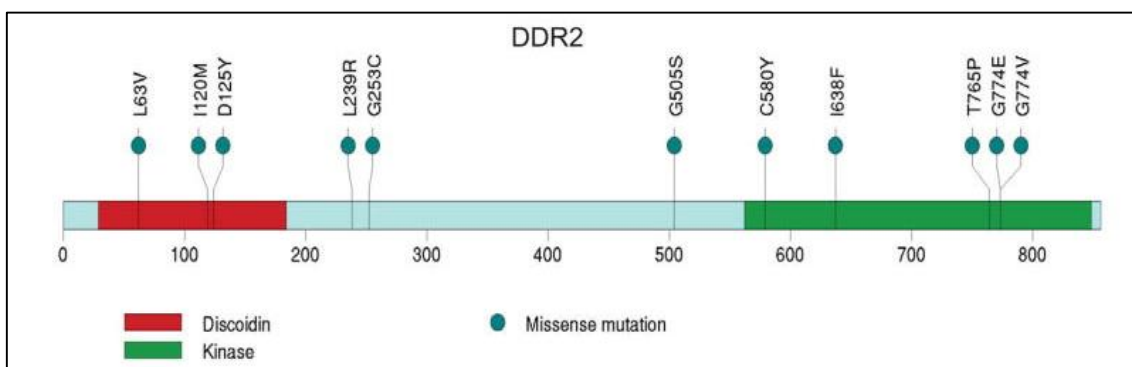


Figura 53: Mutaciones de *DDR2* en carcinoma escamoso pulmonar<sup>150</sup>.

Dos ensayos clínicos han estudiado la eficacia de dasatinib en tumores escamosos de pulmón, y han correlacionado el estatus mutacional de *DDR2* con la respuesta clínica observada en los pacientes (NCT01491633 y NCT01514864). Sin embargo, la aparición de efectos adversos como efusión pleural (14,29%), disnea (14,29%) y hemoptisis (20,00%) obligó a la detención de los mismos<sup>123</sup>. Actualmente, existen 4 ensayos canasta (NCT02029001, NCT02219711, NCT02795156 y NCT02465060) que admiten pacientes portadores de alteraciones en *DDR2* para ser tratados con *pan*-inhibidores como nilotinib, MGCD516 y regorafenib, ya que no hay disponibles inhibidores selectivos de *DDR2*.

En este contexto, PB1 podría tener utilidad como inhibidor selectivo de células tumorales con alteraciones de *DDR2*. Sus datos en células no tumorales no hacen prever toxicidad *in vivo* y

muestra actividad antiproliferativa similares a los de dasatinib en líneas celulares con mutaciones en este receptor.

En concreto la IC<sub>50</sub> de PB1 era superior a la de dasatinib en las líneas celulares de carcinomas escamosos con DDR2 *wt*, ya fuesen de origen pulmonar o de cabeza y cuello; mientras que para líneas celulares de adenocarcinomas pulmonares portadoras de mutaciones de DDR2 las IC<sub>50</sub> eran similares entre ambos compuestos.

Especialmente interesantes fueron los resultados obtenidos para líneas celulares portadoras de la mutación I638F de DDR2, ya que se trata de una mutación activadora, donde la actividad de PB1 y dasatinib era inferior a 50 nM. Estos resultados se correlacionaron con los estudios de *western blot*. En SCC4 (DDR2 *wt*), DDR2 se presenta como la diana celular principal de PB1 ya que el bloqueo de su actividad a 1,5 µM del compuesto se tradujo en una inhibición de la fosforilación de ERK y AKT. No obstante, en el caso de la línea celular H2286 no se pudo establecer esta correlación. A 0,2 µM de PB1 se observó una inhibición completa de la fosforilación de DDR2 que no se correlacionó con un bloqueo de ERK y AKT. Así pues, en H2286 AKT y ERK se activan por otros RTQ además de por DDR2.

Los resultados de citometría de flujo en H2286 de PB1 y dasatinib mostraron distintos comportamientos de cada uno de los inhibidores. Mientras que PB1 producía paro en S y G2/M, dasatinib lo hacía en G0/G1, de acuerdo con lo descrito en la bibliografía<sup>151</sup>. Por lo tanto, en esta línea celular PB1 y dasatinib presentan diferentes dianas celulares responsables de la parada en distintos puntos del ciclo celular. ITQs cuyo uso está ampliamente extendido como gefitinib, osimertinib o dacomitinib<sup>152-154</sup> producen paro celular en G0/G1, mientras que otros como crizotinib lo hacen en la fase G1/S del ciclo celular<sup>155</sup>.

En este contexto, si se asume que la diana principal de PB1 es *DDR2* el efecto antiproliferativo de dasatinib en H2286 no se debería únicamente a la inhibición de esta quinasa sino de otra de las dianas del compuesto. Dasatinib es un *pan*-inhibidor con actividad frente BCR-ABL, SRC, c-KIT, EPHA2 y PDGFRβ, de entre las cuáles SRC se ha descrito como un proto-oncogén involucrado en procesos de proliferación y supervivencia celular en carcinomas escamosos pulmonares<sup>156</sup>. La actividad de dasatinib sobre SRC podría ser la responsable del distinto perfil inhibitorio de ambos compuestos, ya que no existen evidencias experimentales de la actividad inhibitoria de PB1 sobre SRC.

Este hecho se correlacionó con la distinta respuesta de dasatinib y PB1 en las líneas generadas con resistencia a dasatinib. La aparición de resistencia a dasatinib en estas líneas aumentó 10 veces las IC<sub>50</sub> de PB1, dando valores de actividad de 0,6 µM en las H2286-DR y 5,9 µM en las HCC366-DR. Así pues, ambos compuestos presentan dianas celulares comunes responsables de esta disminución en la actividad antiproliferativa. Sin embargo, el distinto orden de magnitud en sus IC<sub>50</sub> podría ser debido a la inhibición de diferentes quinasas por dasatinib y PB1.

#### 4.3.5.2 *PB1 en ADC de pulmón con mutaciones de KRAS*

Las mutaciones en el oncogén *KRAS* son las más frecuentes en tres de las cuatro neoplasias con mayor mortalidad: pulmón, colon y páncreas. La elevada incidencia de las alteraciones genéticas en *KRAS* entre la población con estas histologías tumorales aumenta el interés en el desarrollo

de inhibidores de la proteína *KRAS* mutada. Sin embargo, no se dispone de fármacos con utilidad clínica dirigidos contra dicha proteína <sup>157</sup>.

En las líneas portadoras de mutaciones de *KRAS*, PB1 presentó valores de IC<sub>50</sub> entre 0,43  $\mu$ M y 1,12  $\mu$ M (4.3.2.3). Estas actividades antiproliferativas eran significativamente superiores a las obtenidas para paclitaxel, un agente quimioterapéutico cuyo uso está ampliamente extendido como tratamiento de primera línea en pacientes no accionables, y selumetinib, un inhibidor de MEK que se está evaluando en combinación con docetaxel en pacientes con mutaciones en *KRAS* con resultados superiores a los de docetaxel en monoterapia (1.1.4.5.1) <sup>38</sup>. Paclitaxel y docetaxel presentan efectos secundarios, consecuencia de su baja selectividad por las células tumorales, como hipersensibilidad cutánea, anomalías electrocardiográficas y neuropatía periférica. La toxicidad selectiva de PB1 en los estudios *in vitro* frente células tumorales con mutaciones de *KRAS* respecto las células no tumorales, así como su mayor actividad antiproliferativa en estas mismas líneas respecto a paclitaxel y selumetinib, hacen del compuesto una posible opción de tratamiento.

En los estudios de *western blot* de la línea celular A549 en presencia de PB1, se observó como el compuesto inhibía significativamente la fosforilación de DDR2 a valores próximos a la IC<sub>50</sub>, lo que se relacionó con un bloqueo de la fosforilación de ERK y AKT. Estos datos se correlacionaron con los obtenidos en citometría de flujo en los que la adición de PB1 inducía paro en S y G2/M.

DDR2 es un receptor transmembrana que forma parte de la vía de señalización celular de SHP2 involucrada en la EMT. Estudios recientes sugieren que la expresión de SHP2 en células con mutaciones de *KRAS* está relacionada con su capacidad metastásica <sup>158,159</sup>. Una disminución en la expresión de esta fosfatasa produce un bloqueo de la EMT en la línea celular A549 que se traduce en una disminución de la proliferación celular<sup>160-163</sup>. Si se tiene presente que DDR2 es un receptor cuya fosforilación activa la vía de señalización de SHP2, su inhibición podría producir una disminución de la actividad de esta fosfatasa que explicaría la actividad antiproliferativa de PB1 en células con mutaciones de *KRAS*.

En los estudios de citometría de flujo en la línea A549, dasatinib provocó paro en G0/G1 mientras que PB1 lo hizo en S y G2/M. Este hecho ya se había observado en el caso de células portadoras de mutaciones de DDR2, lo que confirmó la distinta diana celular responsable de la actividad antiproliferativa de cada uno de los inhibidores. Mientras que para PB1 la diana principal sería DDR2, en el caso de dasatinib, inhibidor multiquinasa entre las que está SRC, la actividad antiproliferativa en A549 podría ser producida, al menos en parte, por la inhibición de SRC <sup>164</sup>.

En los estudios de combinación de PB1 con Selumetinib (inhibidor de MEK) realizados en la línea celular A549 portadora de la mutación G12S de *KRAS*, se obtuvo un efecto sinérgico en las condiciones de estudio (Figura 44). El bloqueo de manera paralela de dos quinastas distintas, MEK por selumetinib y DDR2 por PB1, podría ser el motivo del efecto sinérgico observado. Se ha descrito la combinación de selumetinib y MK-2206, un inhibidor de AKT, como una opción de tratamiento para pacientes portadores de mutaciones de *KRAS* <sup>13</sup>, ya que ambos compuestos interactúan en la vía de señalización celular de Ras/Raf/MEK/ERK.

#### 4.3.5.3 PB1 en EGFR

Las células portadoras de la delección del exón 19 y 21 de EGFR presentan sensibilidad frente a gefitinib o erlotinib ( $IC_{50}$  en PC9 es de 5 nM y 50 nM, respectivamente), mientras que en aquellas mutadas del exón 18 la sensibilidad es significativamente inferior (1,6  $\mu$ M para gefitinib). Resultados equivalentes se han obtenido en estudios con pacientes portadores de mutaciones en el exón 18 de EGFR, cuyas tasas de respuesta a los inhibidores de EGFR eran muy inferiores<sup>165-169</sup>.

Los experimentos de viabilidad celular mostraron actividad de PB1 en la línea SW48 a concentraciones inferiores a los inhibidores de EGFR en uso clínico, gefitinib, dacomitinib y afatinib. Además, la tasa de supervivencia de las células a PB1 era inferior al 10% a concentraciones de 2  $\mu$ M (Figura 42).

Los experimentos de *western blot* realizados confirmaron la actividad selectiva de PB1 por EGFR cuando presenta la mutación G719S, (Figura 47). La inhibición de la fosforilación de EGFR se correlacionó con la inhibición de la fosforilación de AKT y ERK en la línea celular SW48. En la línea PC9, con la delección de 15 pares de bases del exón 19 de EGFR, la adición de PB1 a la misma concentración empleada en SW48 no produjo una inhibición de la fosforilación de EGFR, AKT ni ERK. Dada la ausencia de tratamiento selectivo para los tumores portadores de la mutación del exón 18 y las tasas de respuesta inferiores obtenidas con los inhibidores habituales como gefitinib o erlotinib (1.1.4.5.2.5), PB1 podría presentarse como fármaco para este grupo de pacientes.

Todo ello corroboró los datos en proteína aislada obtenidos inicialmente, donde la actividad residual de EGFR con la mutación G719S era inferior al 40% a 0,5  $\mu$ M. Sin embargo, en este mismo estudio se obtuvo una baja actividad residual para EGFR con otras alteraciones como las delecciones del exón 19 o la mutación puntual L858R del exón 21. Estos datos no se confirmaron en los estudios de viabilidad celular ni *western blot*, donde los resultados obtenidos en líneas celulares con estas alteraciones no mostraron actividad de PB1. De esta manera, se demostró que una actividad en proteína aislada no siempre es indicativa de una elevada actividad antiproliferativa. La baja solubilidad de los compuestos o su dificultad para alcanzar las dianas celulares, como consecuencia de sus diferencias estructurales, se presentan como los problemas principales para la falta de correlación entre estos resultados<sup>170,171</sup>.

### 4.4 Estudios preclínicos de PB1 en animales

En el presente trabajo los datos obtenidos han demostrado que PB1 es un posible fármaco para CPNM con la mutación G719S del exón 18 de EGFR, ya que tiene un elevado efecto inhibitorio sobre el crecimiento de células tumorales portadoras de dicha mutación frente a la cual los inhibidores de EGFR en uso clínico presentan una actividad modesta. El mismo efecto se ha demostrado en células portadoras de alteraciones en DDR2 y, en consecuencia, se consideró un *Lead compound* para iniciar los estudios preclínicos en animales.

#### 4.4.1 Desarrollo de una formulación para la solubilización de PB1

Dada la baja solubilidad de PB1 en agua se decidió buscar una formulación que permitiera su administración a animales de experimentación por vía oral. La empresa Pharmaterials

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(<http://www.pharmaterials.co.uk/>; Reino Unido) llevó a cabo un barrido de distintas disoluciones con el objetivo de encontrar una formulación preclínica para PB1 que permitiera el desarrollo de los estudios *in vivo*. Para ello, se consideraron los siguientes aspectos:

- La concentración deseada de PB1 para realizar los estudios de toxicidad y farmacocinética debía de estar entre 10 y 25 mg/mL. La solubilidad del compuesto en agua era inferior a 1 mg/mL.
- El uso de PB1 debía de ser prioritariamente oral. Sin embargo, se podían estudiar otras vías de administración (intravenosa o intraperitoneal) en el caso de encontrar una formulación adecuada.

Inicialmente se realizaron estudios de solubilidad con disolventes comunes. PB1 resultó ser soluble a concentraciones de 3 mg/mL y 6 mg/mL únicamente en dos mezclas de DMSO:cremofores (aceite de ricino hidrogenado y pegilado), con distintas proporciones (Tabla 42).

*Tabla 42: Estudios de solubilidad preliminares.*

Disolventes estudiados	Concentración de PB1 ensayada (mg/mL)	Solubilidad
<b>Un único disolvente</b>		
10% DMSO	3	No soluble
5% DMSO	3	No soluble
45% (w/v) de HPBCD	3	No soluble
10% cremofores	3	No soluble
30% PEG400	3	No soluble
10% propilenglicol	3	No soluble
10% dimetilacetamida	3	No soluble
<b>Combinación de disolventes</b>		
10% DMSO : 45% (w/v) de HPBCD	3	Parcialmente soluble
10% DMSO : 10% cremofores	3	Soluble
	6	Soluble
	9	Parcialmente soluble
5% DMSO : 10% cremofores	3	Soluble
	6	Soluble
	9	No soluble
10% DMSO : 5% cremofores	3	No soluble
5% HPMC + 0,2 Tween80	3	No soluble

Posteriormente se determinó la solubilidad de saturación de PB1 en distintos disolventes utilizados habitualmente para los estudios *in vivo*.

PB1 resultó tener una solubilidad de 59,0 mg/mL en labrasol (PEG-8 glicéridos de los ácidos caprílico/cáprico) y de 56,8 mg/mL en transcutoles (dietilenglicol monoetiléter) (Tabla 43). Así pues, se seleccionó una mezcla de ambos, al 60%/40% (v/v), en que PB1 era suficientemente soluble para la posterior realización de los estudios *in vivo* y farmacocinética.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 43: Resultados de solubilidad de saturación de PB1 en distintos disolventes utilizados en los estudios in vivo en animales.

Vehículo	Solubilidad saturada (mg/mL)
Labrasol	59,0
Transcutol HP	56,8
0.01 M tampón de citrato a pH5	0,048
0.01 M tampón fosfato a pH7	0,059
40% N-Metil-2-pirrolidona en agua	0,317
10% etanol en agua	0,047
10% solutol en agua	0,773
50% propilenglicol en agua	0,217

### 4.4.2 Estudio de eficacia de PB1 en un modelo animal

La determinación de la eficacia de PB1 en animales la realizó la empresa Crown Bioscience (<http://www.crownbio.com/>; EEUU). En este estudio se evaluó la eficacia terapéutica de PB1 en el tratamiento de un modelo subcutáneo de la línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano A549 inoculada en ratones atímicos. Como vehículo para la administración de PB1 se utilizó la mezcla previamente estudiada 60/40 de labrasol/transcutol y el número de la muestra de cada uno de los grupos sometidos a estudio era de 8 animales.

Los resultados de las dimensiones de los tumores en los distintos grupos a distintos tiempos después de la inoculación del tumor se muestran en la Tabla 44, la Tabla 45 y la Tabla 46.

Tabla 44: Tamaño del tumor en los distintos grupos de tratamiento.

Volumen medio, línea celular A549							
Días	14	17	21	24	28	31	35
Grupo 1- Vehículo control	149.50 ± 9,78	296.99 ± 22,02	429.28 ± 35,58	580.10 ± 58,25	750.33 ± 80,91	974.50 ± 91,08	1345.58 ± 112,81
Grupo 2- PB1 (25 mg/kg)	149.51 ± 9,69	264.71 ± 21,28	368.25 ± 39,15	510.59 ± 67,33	688.86 ± 55,37	862.91 ± 101,59	974.64 ± 129,91
Grupo 2- PB1 (50 mg/kg)	149.09 ± 10,44	291.23 ± 32,78	466.66 ± 37,54	647.11 ± 48,92	869.73 ± 54,69	1144.21 ± 106,92	1407.98 ± 114,79

Tabla 45: Actividad antitumoral de PB1 en el modelo A549 subcutáneo (por volumen del tumor).

Tratamiento	Tamaño del tumor (mm <sup>3</sup> ) el día 35	TGI (%)	Valor P respecto el control
Grupo 1- Vehículo control	1345.58 ± 112.81	----	----
Grupo 2- PB1 (25 mg/kg)	974.64 ± 129.91	28	0,058
Grupo 2- PB1 (50 mg/kg)	1407.98 ± 114.79	-5	0,708

Tabla 46: Actividad antitumoral de PB1 en el modelo A549 subcutáneo (por peso del tumor).

Tratamiento	Tamaño del tumor (mm <sup>3</sup> ) el día 35	TGI (%)	Valor P respecto el control
Grupo 1- Vehículo control	996,3 ± 96,3	----	----
Grupo 2- PB1 (25 mg/kg)	779,4 ± 96,5	22	0,138
Grupo 2- PB1 (50 mg/kg)	1140,9 ± 162,2	-15	0,477

La media del tamaño del tumor del grupo control alcanzada fue de 1345,58 mm<sup>3</sup> el día 35 después de la inoculación del tumor. El tratamiento con PB1 en las condiciones de estudio no mostró actividad antitumoral, ya que las dimensiones del tumor no variaron significativamente respecto las del grupo control (974,64 mm<sup>3</sup> a 0,5 mg/ratón y 1407,98 mm<sup>3</sup> a 1 mg/ratón). Se observó una leve pérdida de peso en los grupos 1 y 2, del 7,54% y del 4,38% respectivamente, el día 28 después de la inoculación.

#### 4.4.3 Estudios de farmacocinética de PB1

Se realizaron los estudios de farmacocinética de PB1, por la empresa Crown Bioscience, en ratones ICR a 10 mg/kg por vía intravenosa y 50 mg/kg por vía oral, para determinar las causas de la ausencia de actividad antitumoral de PB1 en animales. En el primer caso, el tiempo de vida medio del compuesto en el organismo fue de 0,49 horas y el aclarado de 16,2 mL/min/kg. Respecto a la administración oral, la máxima concentración en plasma a 1,33 horas fue de 1270 ng/mL, la exposición de 4931 horas\*ng/mL y la biodisponibilidad del 9,57%, este último dato insuficiente como para proseguir con ensayos más complejos y costosos como la determinación de la toxicidad de PB1 *in vivo* (Figura 54), ya que fármacos como gefitinib presentan valores de biodisponibilidad del 60% , y otros como dasatinib entre el 14% y el 34% (Figura 54).

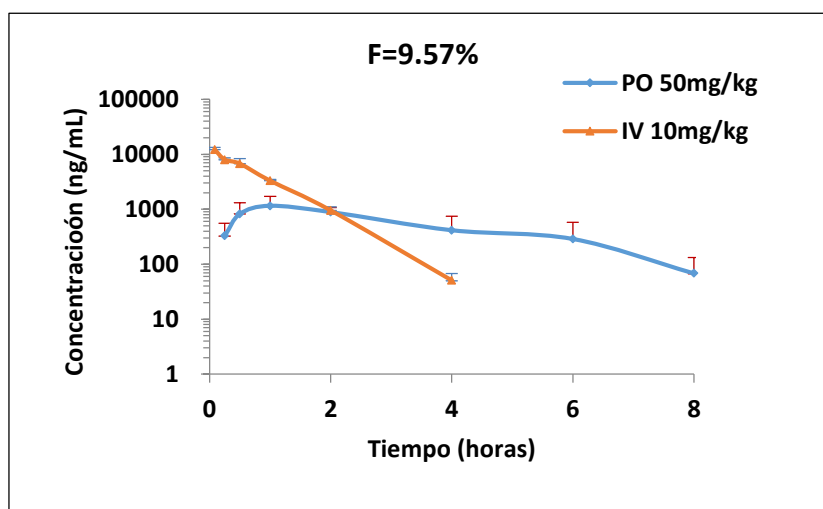


Figura 54: Gráfica con la concentración de PB1 disponible en el organismo en función del tiempo. Se presentan los datos por vía intravenosa (IV) y por vía oral (PO).

La baja biodisponibilidad de PB1 por vía oral, de 9,57%, así como la rápida eliminación por vía intravenosa podía ser debida a una baja absorción del compuesto por el organismo o a un rápido metabolismo del mismo. La primera de las hipótesis se descartó, pues los valores de concentración máxima en plasma a 1,33 horas (1270 ng/mL) y la exposición oral (4931 horas\*ng/mL), indicaban una correcta absorción del compuesto.

En consecuencia, se realizó un estudio de metabolismo de PB1 con el fin de identificar los elementos estructurales que podían ser responsables de su degradación.

#### 4.4.4 Estudios del metabolismo de PB1

Con el uso del software informático SMARTCYP<sup>172-177</sup> se estudiaron las posibles posiciones por las que el compuesto se podía metabolizar, es decir, aquellos puntos de la estructura de PB1 responsables de la baja biodisponibilidad del compuesto, así como de su rápida eliminación del organismo.



Se obtuvieron tres posiciones cuyo bloqueo podía eliminar el problema metabólico de PB1 (Figura 55):

- El grupo amino en C4 (círculo amarillo).
- La posición *para* del fenilo en la amina en C2 (círculo rosado).
- La amina en C2 (círculo verde).

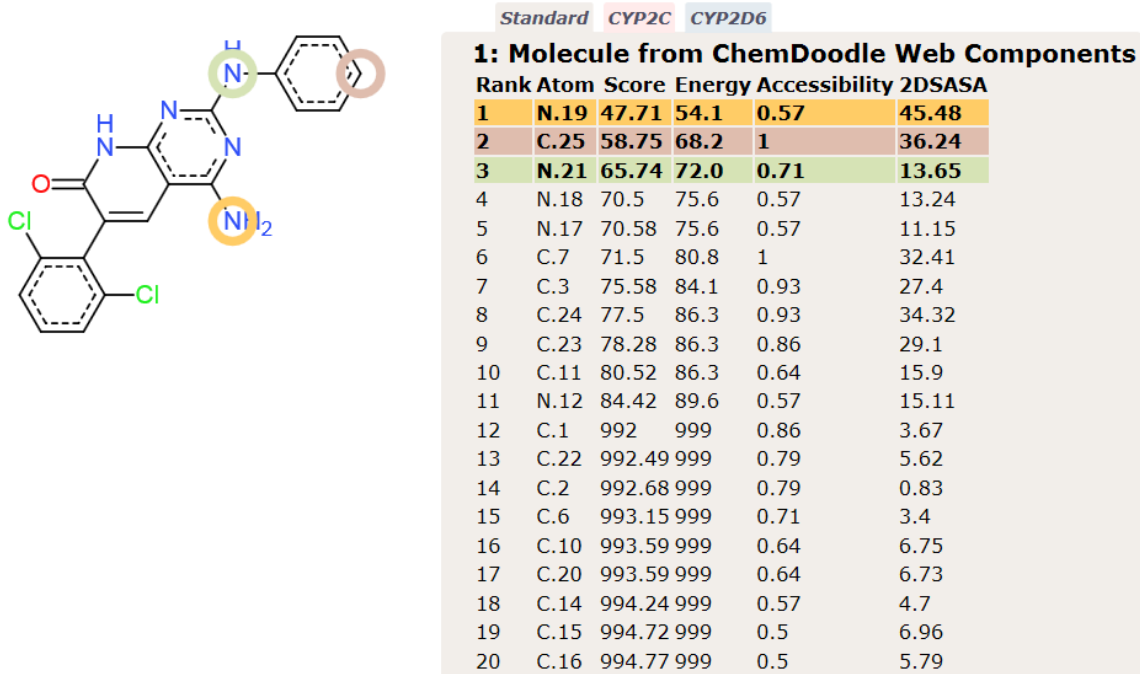


Figura 55: Puntos de metabolismo de PB1.

En el caso en que el punto de metabolismo de PB1 fuese el grupo amino en C4 se presentaba un problema de difícil solución. Por un lado, se trataba de una posición característica de las moléculas sintetizadas por el grupo del GEM. Por otro lado, cuando en C4 se introducía un grupo hidroxilo en forma de su tautómero carbonílico, como los compuestos C1, C8, C15, C17 y C19, una cadena alifática como en C1, C5, C6, C11 y C12, o una amina cíclica como en C10, la actividad antiproliferativa empeoraba significativamente (ver Tabla 26 y Tabla 27).

En cuanto al N presente en C2 su probabilidad de ser el responsable del rápido metabolismo de PB1 era significativamente inferior que el del grupo amino en C4, del 13,65% respecto el 45,48% del nitrógeno en C4. En consecuencia, se descartó su modificación.

Finalmente, la posición en *para* del sustituyente fenilo unido a dicho N en C2 se consideró como el segundo punto más probable de metabolismo (36,24%) y el de más fácil modificación. Es conocido que los anillos fenílicos sin sustitución en *para* se oxidan metabólicamente al correspondiente hidroxilo y que la sustitución de dicha posición mejora la resistencia a la oxidación metabólica<sup>178</sup>. Fármacos como diazepam cuyo uso clínico está ampliamente extendido han introducido sustituyentes en la posición *para* del fenilo, un cloro en el caso de este antidepresivo, para bloquear dicho metabolismo (Figura 56).

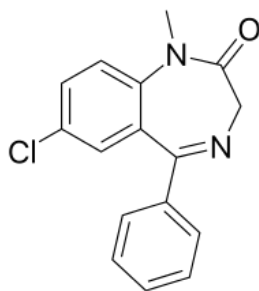


Figura 56: Estructura de diazepam.

Por consiguiente, se decidió sintetizar una serie de análogos de PB1 sustituidos en la posición *para* del fenilo unido al grupo amino en C2.

#### 4.5 Análogos de PB1

##### 4.5.1 Síntesis de análogos

Con los resultados obtenidos del estudio de metabolismo se generó una pequeña quimioteca de productos, análogos de PB1, cuyo objetivo era resolver los problemas de metabolismo observados en PB1 manteniendo su actividad antiproliferativa.

Las posibles modificaciones en la posición *para* del fenilo en C2 que se consideraron fueron la introducción de un flúor (C69) y un grupo amino o un éter (C70, C71, C72, C73 y C74) (Tabla 47).

Tabla 47: Estructuras de los análogos de PB1 sintetizados. Recuadradas en rojo las modificaciones realizadas.

Compuesto	Estructura
C69	
C70	
C71	
C72	

Compuesto	Estructura
C73	
C74	

La síntesis de los análogos de PB1 se realizó a partir de la propia molécula de PB1, es decir, PB1 fue el precursor sintético de las nuevas estructuras químicas.

Se bromó la posición *para* del grupo fenilamino situado en C2 del anillo pirimidínico de PB1, rindiendo el correspondiente sistema bromado **17{1}** en dicha posición. A continuación, la reacción de Ullman en este punto de la estructura resultó en sistemas pirido[2,3-*d*]pirimidínicos en los que el bromo se sustituyó por aminas, en C70, C71, C72 y C73, o por alcoholes, en C74, rindiendo moléculas derivatizadas en esta posición (Figura 57).

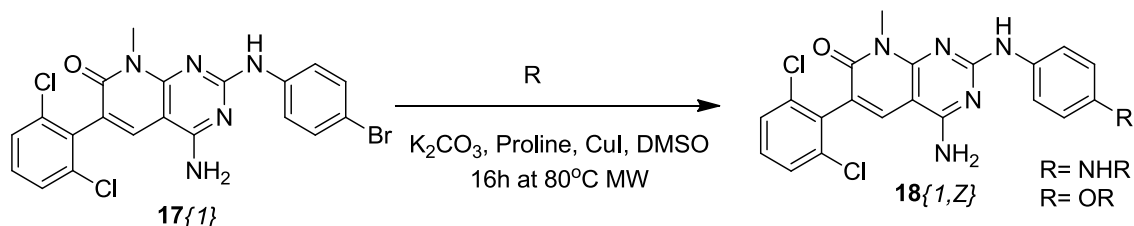


Figura 57: Esquema general de la reacción de Ullman a partir de **17{1}**.

Sin embargo, la ruta sintética de C69 fue significativamente diferente de la previamente descrita para el resto de compuestos. El hecho de tener que sustituir el bromo en *para* de la posición C2 del anillo pirimidínico por un fluor requirió una modificación que no permitía el uso de PB1 como precursor.

Como reactivo de partida se utilizó el mismo éster  $\alpha,\beta$ -insaturado **9{1}** que se empleó en la síntesis de PB1, cuya reacción con malononitrilo rindió el 2-metoxi-6-oxo-1,4,5,6-tetrahidropiridin-3-carbonitrilo (**10{1}**) correspondiente. Fue en este punto en que la síntesis se modificó ligeramente. En el caso de C69 fue necesario el tratamiento de **10{1}** con un sistema guanidínico con un fluor en la posición *para*. Así pues, previamente se sintetizó la correspondiente guanidina fluorada **13{3}** mediante la reacción de la 4-fluoroanilina **26** con cianamida. El posterior tratamiento de **10{1}** con **13{3}** rindió, vía la transposición de Dimroth del intermedio **14{1,3}**, la 4-amino-pirido[2,3-*d*]pirimidina, **12{1,3}**, cuya aromatización y su posterior tratamiento con MeI resultó en la estructura **16{1,3}**, denominada C69 en este trabajo (Figura 58).

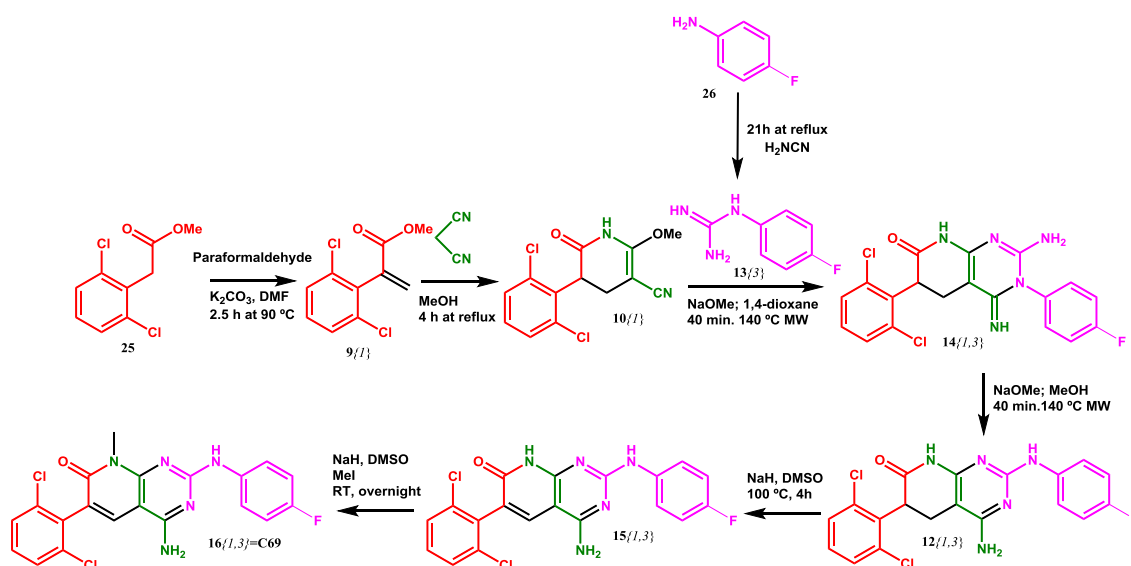


Figura 58: Esquema sintético de C69.

#### 4.5.2 Actividad en proteína aislada de los análogos de PB1

Los análogos sintetizados se sometieron a estudios en proteína aislada en Proquinase en los que se determinó su  $IC_{50}$ . Puesto que DDR2 era la diana celular de PB1 más estudiada, se seleccionó esta proteína en su forma *wt*, así como con la mutación N456S.

Todos los análogos mostraron valores en el rango nM para ambas formas de la proteína. Para los compuestos C72, C73 y C74, los valores de  $IC_{50}$  estaban entre 3,7 nM y 7,6 nM, mientras que para C69, C70 y C71 se situaron entre 11,7 nM y 31,3 nM (Tabla 48).

Tabla 48:  $IC_{50}$  de los análogos en PB1 en la proteína DDR2 aislada en su forma *wt* y con la mutación N456S.

	DDR2 N456S	DDR2 <i>wt</i>
Compuesto	$IC_{50}$ (nM)	$IC_{50}$ (nM)
C69	31,3	25,5
C70	11,7	13,3
C71	16,3	15,7
C72	7,52	7,51
C73	4,01	3,72
C74	7,52	5,06

#### 4.5.3 Actividad *in vitro* de los análogos de PB1

Se determinó la actividad antiproliferativa de los análogos sintetizados en un pequeño panel de líneas celulares con alteraciones en DDR2, mutadas de *KRAS* y del exón 18 de *EGFR*.

Tan solo el compuesto C69 presentaba actividad antiproliferativa en las líneas estudiadas con valores en el orden de los observados para PB1. Las  $IC_{50}$  del resto de análogos eran significativamente superiores por lo que no se continuó su desarrollo (Tabla 49).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 49: IC<sub>50</sub> de PB1 y sus análogos en las líneas seleccionadas, los datos están en  $\mu\text{M}$ .

Compuesto	Estructura	IC <sub>50</sub> SW48 ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> H2286 ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> HCC366 ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> H520 ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> A549 ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> H23 ( $\mu\text{M}$ )
PB1		0,75	0,05	0,83	0,35	0,43	1,12
C69		0,30	0,30	1,79	0,35	0,20	0,92
C70		3,45	0,75	3,90	4,08	0,70	10,87
C71		5,45	3,10	39,30	10,51	3,65	6,16
C72		44,50	16,35	24,52	>50	14,20	37,41
C73		3,10	4,65	9,69	5,21	2,45	33,35
C74		1,65	7,07	3,01	2,15	1,45	1,15

### 4.5.4 C69

#### 4.5.4.1 Actividad antiproliferativa de C69 en líneas portadoras de mutaciones de KRAS

La actividad antiproliferativa de C69 estaba en el rango de PB1, en las líneas celulares A549 y H23, portadoras de mutaciones de *KRAS* (Tabla 41). Este dato propició un estudio más amplio del compuesto en 6 líneas con mutaciones en este oncogén.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las líneas portadoras de mutaciones de *KRAS* los valores de  $IC_{50}$  obtenidos para C69 no diferían significativamente de los obtenidos para PB1. En ambos casos se encontraban entre 0,2  $\mu$ M y 2,24  $\mu$ M.

En las líneas A549 y H23 se obtuvieron  $IC_{50}$  inferiores a 1  $\mu$ M para C69, mientras que en las líneas HCT116 y MDA-MB-231 estas actividades incrementaron, eran superiores a 1  $\mu$ M (Tabla 50). En este segundo grupo de líneas celulares las mutaciones presentes en *KRAS* coexistían con mutaciones puntuales en otros genes; en *PIK3CA* en HCT116 y en *BRAF* en MDA-MB-231.

Tabla 50:  $IC_{50}$  de C69 en un pequeño panel de líneas celulares portadoras de mutaciones de *KRAS*.

Línea celular	$IC_{50}$ de PB1 ( $\mu$ M)	$IC_{50}$ de C69 ( $\mu$ M)	Prueba T student
A549	0,43	0,20	0,06
H23	1,13	0,92	0,08
Calu6	0,72	0,67	0,09
HCT166	1,97	2,11	0,13
MiaPaCa2	1,24	1,47	0,06
MDA-MB-231	2,11	2,24	0,11

Al comparar los datos de los porcentajes de células vivas entre C69 y PB1 se observó, que a 1  $\mu$ M, entre el 12% (en A549) y el 60% (en MDA-MB-231) de las células continuaban vivas aun en presencia del análogo mientras que para PB1 este porcentaje era inferior al 4% en todas las líneas celulares sometidas a estudio (Tabla 51 y Figura 59).

Tabla 51: % de células vivas portadoras de mutaciones de *KRAS*, después de ser tratadas 72 horas con 1  $\mu$ M de C69 y PB1.

Línea celular	% Células vivas a 1 $\mu$ M de C69	% Células vivas a 1 $\mu$ M de PB1
A549	12,00	0,12
H23	37,25	51,21
Calu6	35,45	3,75
HCT166	53,80	1,20
MiaPaCa2	47,85	1,05
MDA-MB-231	59,65	0,00

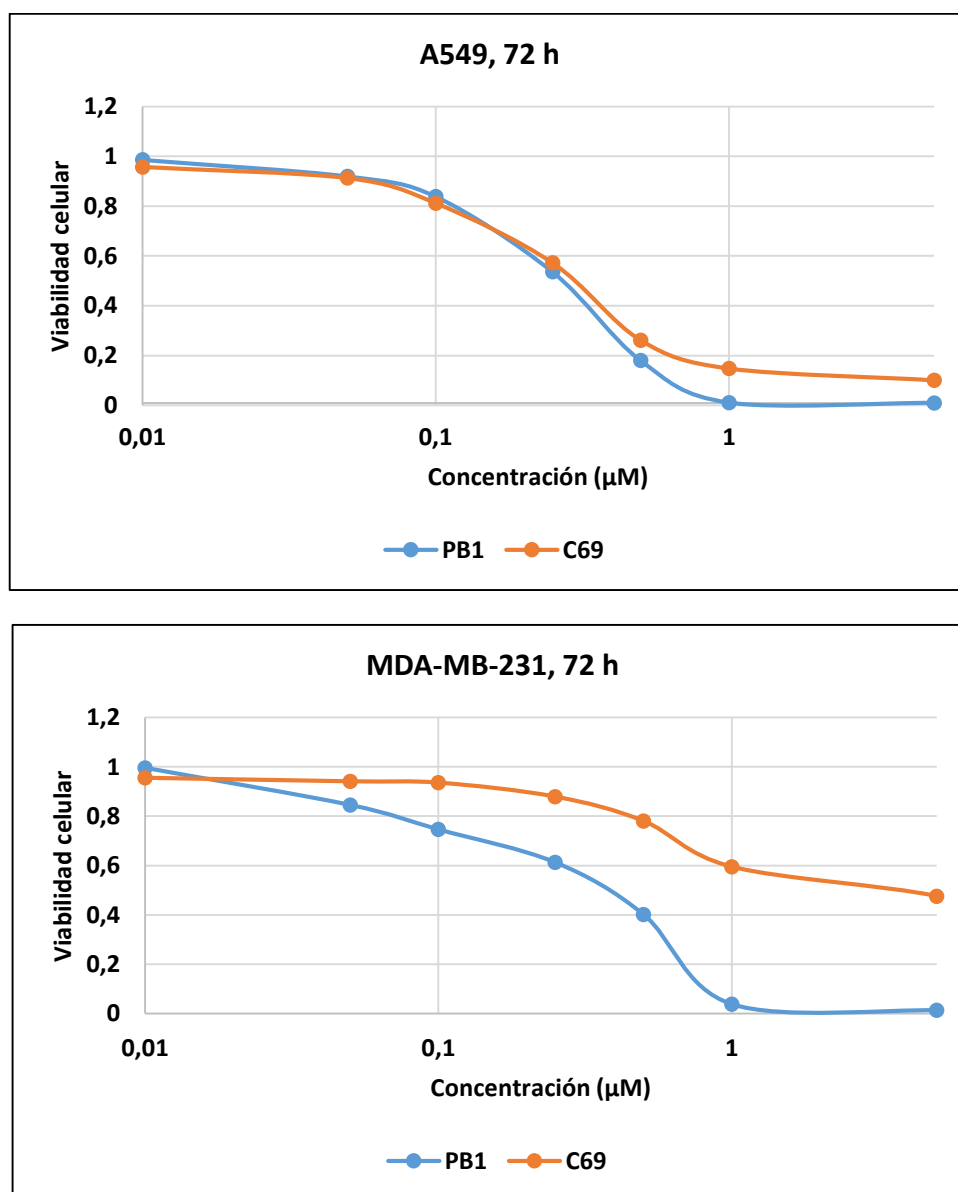
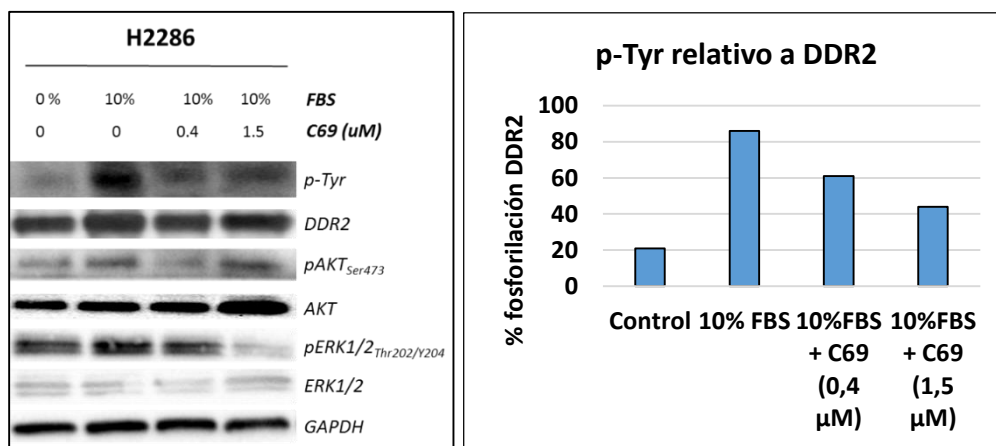
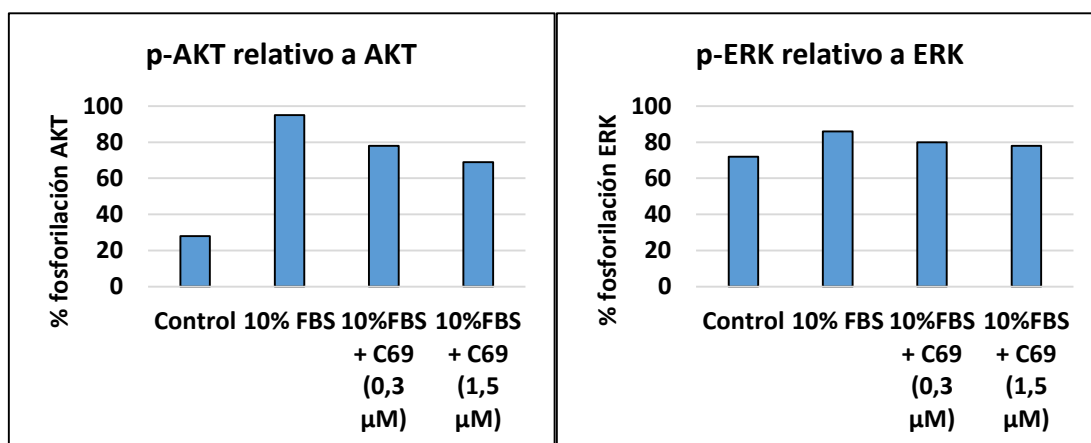
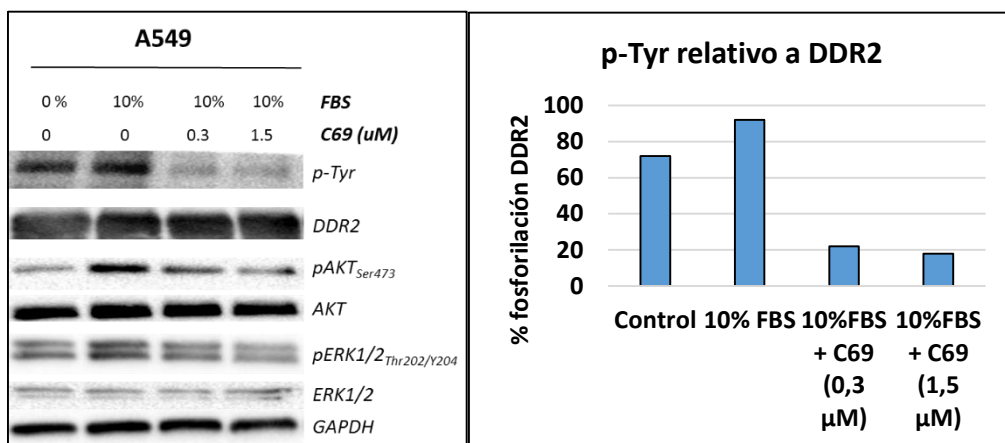


Figura 59: Comparativa de los estudios de viabilidad celular de PB1 y C69 en A549 y Calu6.

4.5.4.2 Efectos de C69 sobre la activación de DDR2 y EGFR (G719S)

Se realizaron los ensayos de *western blot* en A549, H2286 y SW48 para estudiar el mecanismo de acción de C69.

Después de activar las líneas celulares con un 10% de FBS se añadieron dos concentraciones distintas de C69. Tal y como se observa en la Figura 60 a la IC<sub>50</sub> del compuesto había una inhibición prácticamente completa de DDR2 en A549 y en H2286. A estas mismas concentraciones de C69 no se bloqueaba significativamente la fosforilación de ERK y AKT. Tan solo a concentraciones superiores a las IC<sub>50</sub>s, a 1,5 μM, se observó un bloqueo significativo de la fosforilación de ERK en la línea celular H2286. También en esta línea, la activación de DDR2 al adicionar un 10% de FBS es mayor en la línea A549, en la que se observa activación basal (Figura 60).





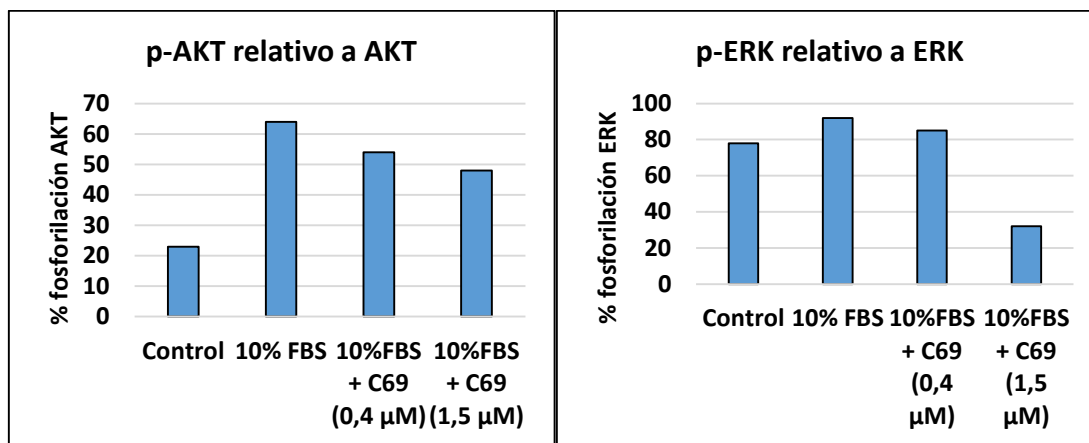


Figura 60: Imágenes y cuantificación de western blot de C69 en A549 y H2286.

Por otro lado, en la línea SW48 se observó una inhibición significativa por C69 de la fosforilación de EGFR, AKT y ERK, después de haber sido activados con 10 μg/mL de EGF (Figura 61).

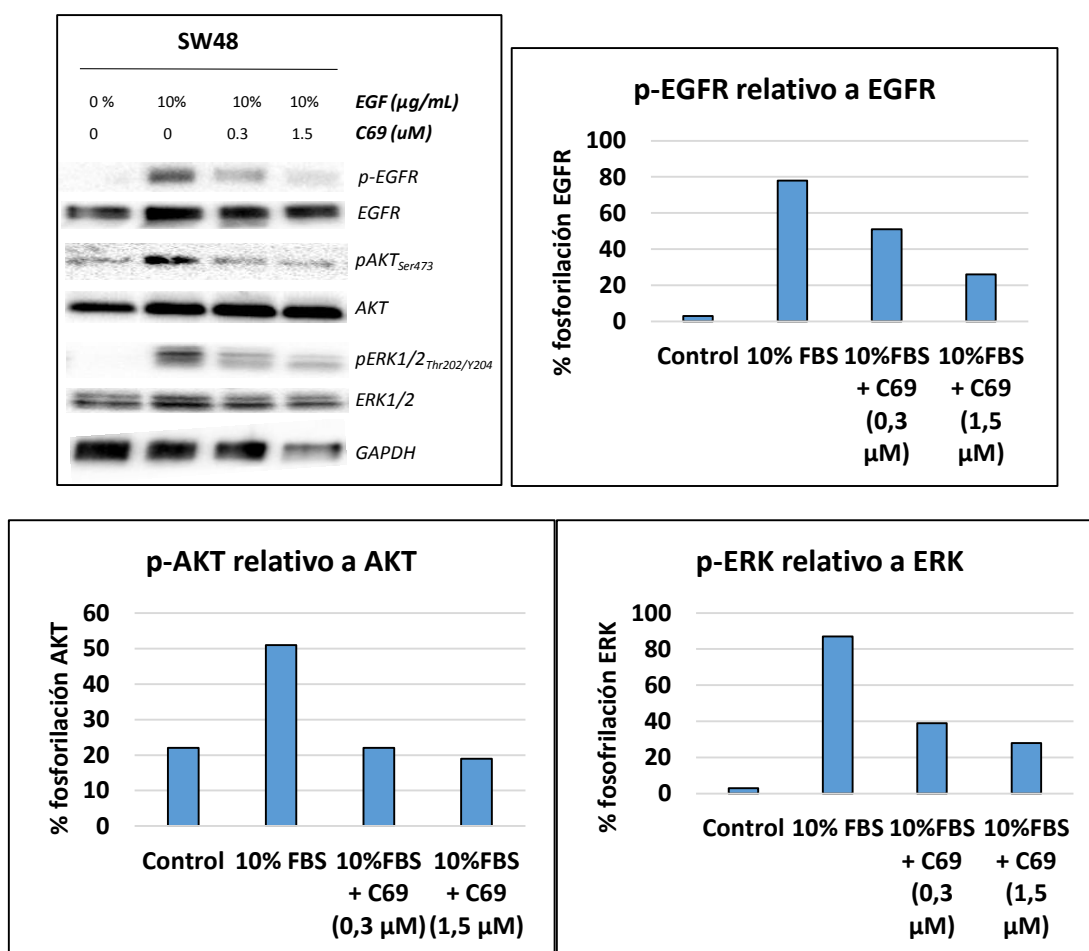


Figura 61: Imagen y cuantificación de western blot de C69 en SW48.

#### 4.5.4.3 Efectos de C69 sobre el ciclo celular

Se realizaron estudios de citometría de flujo para comparar el efecto de C69 sobre el ciclo celular tanto con dasatinib como con PB1. Dichos estudios se llevaron a cabo en las líneas celulares

A549 y H2286. Las concentraciones de los distintos compuestos corresponden a sus IC<sub>50</sub>'s en cada una de las líneas celulares estudiadas.

Tal y como se presenta en la Figura 64 en la línea celular A549, el comportamiento de C69 es muy similar al de PB1. En ambos compuestos se observó una parada de las células en S y G2/M y una disminución de G0/G1. Sin embargo, dasatinib no produjo cambios significativos respecto el control sin tratamiento (Figura 62).

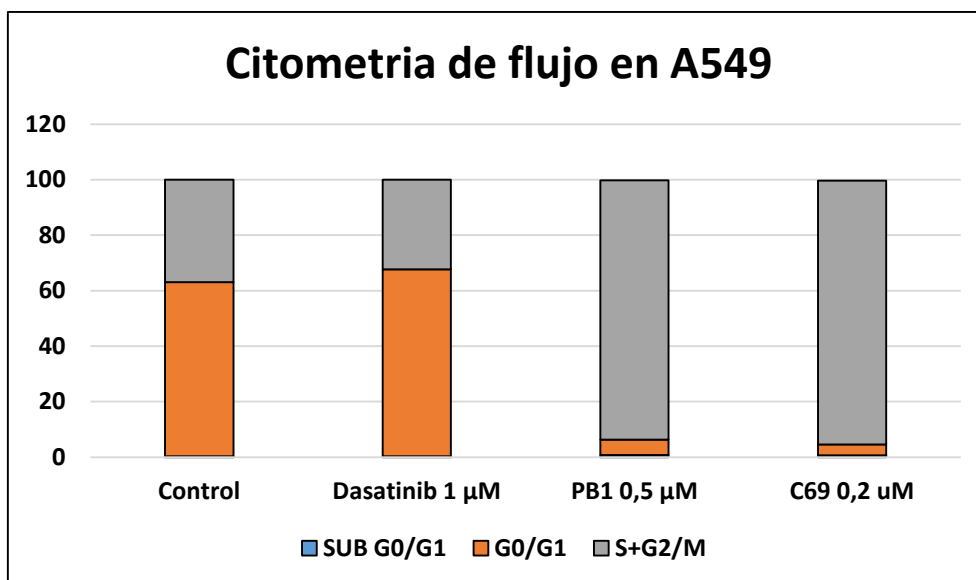


Figura 62: Citometría de flujo de PB1, C69 y dasatinib en A549.

El mismo comportamiento se observó en la línea celular H2286 para PB1 y C69, paro celular en S y G2/M. Mientras que la adición de dasatinib resultó en un paro de las células en la fase G0/G1 y una disminución de las fases S y G2/M (Figura 63). Así pues, en este estudio los cambios que se produjeron en los tratamientos con PB1 y C69, diferían significativamente de los observados en el tratamiento con dasatinib.

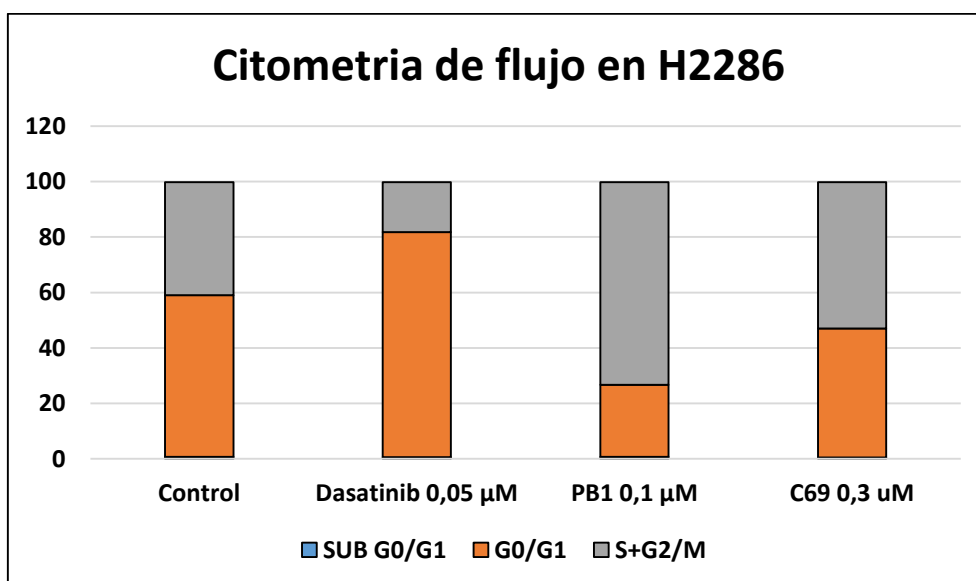


Figura 63: Citometría de flujo de PB1, C69 y Dasatinib en H2286.

#### 4.5.4.4 Estudios preclínicos de C69 en animales

Los estudios de farmacocinética de C69 se realizaron en ratones ICR. Se evaluó su actividad y comportamiento por vía intravenosa, a una dosis de 2 mg/kg, y por vía oral a una concentración de 50 mg/kg.

En la administración intravenosa se obtuvo un tiempo de vida medio del compuesto de 0,64 horas y un aclaramiento de 13,1 mL/min/kg. Por vía oral la concentración máxima alcanzada en plasma a 3 horas fue de 760 ng/mL y la exposición oral de 6760 horas\*ng/mL, la biodisponibilidad del compuesto fue de un 8,72% (Figura 64). Estos datos no difieren de los obtenidos en el caso de PB1 en el que se obtuvo un tiempo de vida medio de 0,49 horas y un aclaramiento de 16,2 mL/min/kg por vía oral, y una concentración máxima en plasma alcanzada a las 1,33 horas de 1270 ng/mL, la exposición oral de 4931 horas\*ng/mL y la biodisponibilidad del 9,57% (Tabla 52).

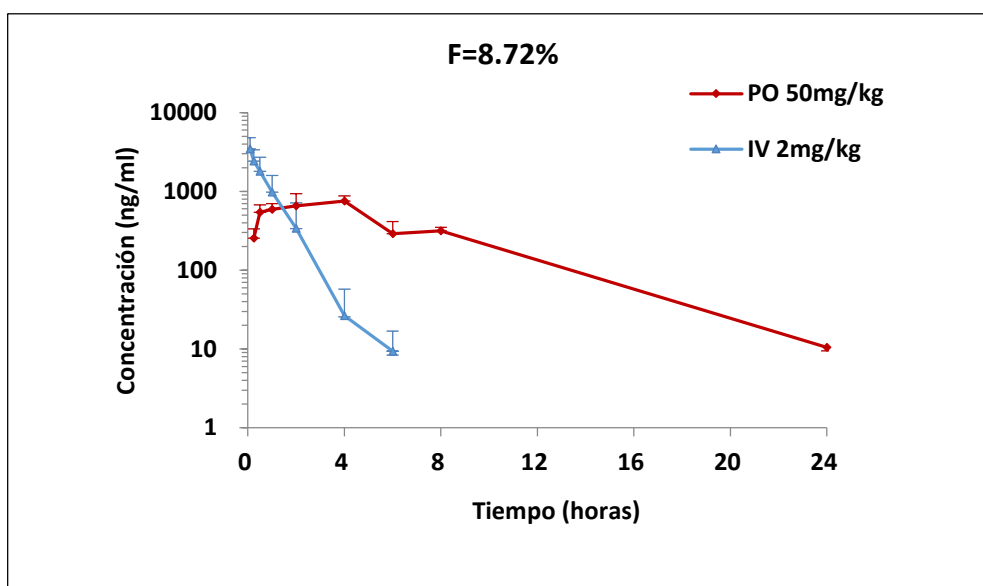


Figura 64: Gráfica con la concentración de C69 disponible en el organismo en función del tiempo. Se presentan los datos por vía intravenosa (IV) y por vía oral (PO).

Tabla 52: Datos de farmacocinética comparativos de PB1 y C69.

	PB1	C69
Vía intravenosa	10 mg/mL	2 mg/mL
Tiempo de vida medio (horas)	0,49	0,64
Aclarado (mL/min/kg)	16,2	13,1
Vía oral	50 mg/mL	50 mg/mL
Máxima concentración en plasma	1270 ng/mL a 1,33 horas	760 ng/mL a 3 horas
Exposición oral (horas*ng/mL)	4931	6760
Biodisponibilidad (%)	9,57	8,72

#### 4.5.5 Evaluación de los resultados de los análogos de PB1

Tal y como se ha comentado en el apartado 4.4, la baja solubilidad en medio acuoso así como la rápida metabolización de PB1 suponían obstáculos significativos para continuar su desarrollo *in vivo*. Por este motivo se sintetizaron nuevas moléculas análogas a PB1 que, sin perder su actividad antiproliferativa, tuvieran mejores propiedades farmacocinéticas.

Mediante un estudio *in silico* del metabolismo de PB1 (4.4.4) se determinó que la posición *para* del fenilo en C2 de PB1 se podía modificar para bloquear el metabolismo de la molécula y, en consecuencia, se sintetizaron los compuestos C70, C71, C72, C73 y C74. Para C69 se desarrolló una nueva ruta sintética con el uso de guanidina fluorada.

Aunque las modificaciones estructurales de los derivados eran relativamente menores, provocaron importantes variaciones en su actividad. Los estudios en proteína aislada mostraron unas IC<sub>50</sub>s entre 3,72 nM y 7,52 nM de C72, C73 y C74 en DDR2, *wt* y con la mutación N456S. Para el resto de compuestos, las IC<sub>50</sub> aumentaban hasta valores comprendidos entre 112 nM y 313 nM. Estos resultados no se correlacionaron con los datos de actividad antiproliferativa en cultivo celular, en los cuales todas las moléculas estudiadas tuvieron actividades muy superiores

a PB1. A excepción de C69, cuyas  $IC_{50}$ s están entre 0,20  $\mu$ M y 2,24  $\mu$ M en las líneas celulares sometidas a estudio.

En todas las líneas celulares en las que se testó PB1, la supervivencia celular era inferior al 10% a concentraciones entre 1  $\mu$ M y 5  $\mu$ M, llegando a ser prácticamente del 0% en líneas como H2286 o SW48 a 1  $\mu$ M. No obstante, para C69 a esta misma concentración y en estas líneas celulares la supervivencia celular resultaba superior al 10%, independientemente de la  $IC_{50}$  (4.5.5.1). Por otro lado, en los resultados de *western blot* de C69 las inhibiciones observadas eran similares a las obtenidas para PB1. En la línea SW48 la inhibición de EGFR, así como de los efectores en posiciones inferiores de su vía de transducción de señal, era prácticamente completa a la  $IC_{50}$  del compuesto. Para A549 y H2286 la misma actividad a la concentración correspondiente a la  $IC_{50}$  de C69 en cada una de las líneas tan solo se observó en DDR2. En los casos de *p*ERK y *p*AKT la disminución de la fosforilación era menor y se requería mayor concentración de inhibidor para obtener un bloqueo de su actividad.

Para la realización de los estudios de *western blot* la línea celular SW48 se activó con EGF, mientras que en las líneas A549 y H2286 se utilizó FBS. Así pues, en el primer caso se activó principalmente la vía de transducción de señal de EGFR. La adición de C69 bloqueaba completamente la fosforilación de EGFR, así como la de sus efectores, ERK y AKT, la activación de los cuales en estas condiciones era principalmente por la ruta de señalización de EGFR. Sin embargo, en los casos de A549 y H2286 la adición de FBS activó todos los receptores celulares, por este motivo, aunque la adición de C69 bloqueaba completamente la vía de transducción de señal de DDR2 esta misma actividad no se observó en ERK y AKT, ya que su activación puede ser inducida por otros receptores además de por DDR2.

Los resultados de citometría de flujo en los que se observó un incremento significativo de células en las fases S y G2/M del ciclo celular en presencia de C69 respecto al control sin tratamiento en las líneas H2286 y A549, se correlacionaron con los obtenidos en el caso de PB1.

Las similitudes de los resultados de PB1 y C69 obtenidas en los estudios de *western blot* y citometría de flujo indicaron que en ambos casos la diana celular principal era la misma, DDR2 o EGFR con la mutación G719S del exón 18, según el caso.

En cuanto a los estudios de farmacocinética los resultados de C69 fueron ligeramente mejores que los de PB1 por vía intravenosa pero peores por vía oral. En el primer caso, a una concentración de 2 mg/mL de C69 se alcanza un tiempo de vida medio y un aclaramiento mayor que para PB1 a 10 mg/mL. Sin embargo, por vía oral, a la misma concentración de ambos compuestos, se alcanza mayor concentración en plasma y mayor biodisponibilidad para PB1 que para C69 (Tabla 52).

# CONCLUSIONES



## 5 Conclusiones

1. La evaluación de la actividad biológica de más de 70 sistemas pirido[2,3-*d*]pirimidínicos en líneas celulares con mutaciones representativas de carcinomas pulmonares ha permitido seleccionar PB1 (Figura 65) como *Hit* para el desarrollo de estudios preclínicos.

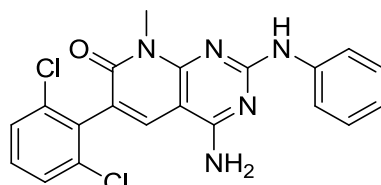


Figura 65: Estructura de PB1.

2. PB1, a concentraciones entre 5 nM y 830 nM, inhibe el crecimiento *in vitro* de varias líneas tumorales con mutaciones de DDR2. A estas concentraciones se observa una inhibición de la fosforilación de DDR2, ERK y AKT en las líneas H2286 y SCC4, previamente activadas con FBS. El inhibidor produce paro celular en las fases S y G2/M de las células H2286.
3. PB1, a concentraciones entre 0,43  $\mu$ M y 2,11  $\mu$ M, inhibe el crecimiento celular *in vitro* de células portadoras de mutaciones de KRAS. A estas concentraciones se observa una inhibición de la fosforilación de DDR2, ERK y AKT en las líneas celulares A549 y H23, previamente activadas con FBS. El inhibidor produce paro celular en las fases S y G2/M de las células A549.
4. PB1, a una concentración de 0,75  $\mu$ M, inhibe el crecimiento celular *in vitro* de SW48 portadora de la mutación G719S del exón 18 de EGFR. En esta línea celular a 0,75  $\mu$ M de compuesto se inhibe la fosforilación de EGFR, AKT y ERK. Este efecto inhibitorio es selectivo de la mutación G719S de EGFR.
5. Los estudios de solubilidad han determinado la mezcla labrasol/transcutol, 60/40, como vehículo para la administración oral de PB1. En estas condiciones el compuesto ha presentado problemas de metabolismo y/o absorción en ratones ICR.
6. Se ha desarrollado y sintetizado una familia de análogos de PB1 bloqueando la posición *para* del anillo *p*-aminofenílico, una de las posibles posiciones responsables del rápido metabolismo de PB1. La evaluación biológica de la quimioteca sintetizada ha permitido la selección del compuesto *p*-fluoro sustituido, C69 (Figura 66), para ampliar los estudios biológicos. La síntesis de C69 se realiza mediante una ruta sintética similar a la de PB1. Sin embargo, en el caso de C69 se requiere el uso de la *p*-fluorofenilguanidina en la etapa de construcción del anillo pirimidínico, para rendir el correspondiente sistema pirido[2,3-*d*]pirimidínico.

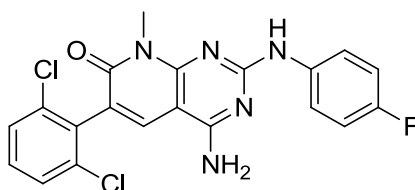


Figura 66: Estructura de C69.



## CONCLUSIONES

---

7. C69 presenta valores de actividad entre 0,20  $\mu\text{M}$  y 2,29  $\mu\text{M}$  frente líneas celulares representativas de carcinomas pulmonares.
8. C69 inhibe la fosforilación de DDR2 a concentraciones de 0,3  $\mu\text{M}$ , en A549, y 0,4  $\mu\text{M}$ , en H2286, pero esta inhibición no se correlaciona con una inhibición de ERK y AKT. En ambas líneas celulares se produce paro celular en las fases S y G2/M del ciclo celular.
9. C69 inhibe la fosforilación de EGFR con la mutación G719S en la línea celular SW48, así como la de ERK y AKT a una concentración 0,3  $\mu\text{M}$  de compuesto.
10. Los estudios en animales han revelado problemas de metabolismo y/o absorción de C69.

# REFERENCIAS



## 6 Referencias

1. Puente J. ¿ Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? SEOM. <http://www.seom.org/en/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>. Published 2015.
2. Knudson AG. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. 1971;68(4):820-823.
3. Médica SE de O. Las Cifras del Cáncer en España 2016. *Soc Española Oncol Médica*. 2016.
4. Sánchez MJ, Payer T, De Angelis R, et al. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Ann Oncol*. 2010;21 Suppl 3(suppl 3):iii30-36. doi:10.1093/annonc/mdq090.
5. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of Lung Cancer. *Chest*. 2003;123(1):21S-49S. doi:10.1378/chest.123.1\_suppl.21S.
6. Mahabir S, Spitz MR, Barrera SL, Beaver SH, Etzel C, Forman MR. Dietary zinc, copper and selenium, and risk of lung cancer. *Int J Cancer*. 2006;120(5):1108-1115. doi:10.1002/ijc.22451.
7. Miller AB, Altenburg H-P, Bueno-de-Mesquita B, et al. Fruits and vegetables and lung cancer: Findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J cancer*. 2004;108(2):269-276. doi:10.1002/ijc.11559.
8. Eriksson M, Hardell L, Berg NO, Möller T, Axelson O. Soft-tissue sarcomas and exposure to chemical substances: a case-referent study. *Br J Ind Med*. 1981;38(1):27-33. doi:10.1136/OEM.38.1.27.
9. Matakidou A, El Galta R, Rudd MF, et al. Prognostic significance of folate metabolism polymorphisms for lung cancer. *Br J Cancer*. 2007;97(2):247-252. doi:10.1038/sj.bjc.6603830.
10. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1243-1260. doi:10.1097/JTO.0000000000000630.
11. Krug LM, Pass HI, Rusch VW, et al. Multicenter phase II trial of neoadjuvant pemetrexed plus cisplatin followed by extrapleural pneumonectomy and radiation for malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*. 2009;27(18):3007-3013. doi:10.1200/JCO.2008.20.3943.
12. van Meerbeeck JP, Fennell DA, De Ruyscher DKM, et al. Small-cell lung cancer. *Lancet (London, England)*. 2011;378(9804):1741-1755. doi:10.1016/S0140-6736(11)60165-7.
13. Rothschild SI. Targeted Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer—Beyond EGFR and ALK. *Cancers (Basel)*. 2015;7:930-949. doi:10.3390/cancers7020816.

## REFERENCIAS

---

14. Weiss J, Sos ML, Seidel D, et al. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med*. 2010;2(62):62ra93. doi:10.1126/scitranslmed.3001451.
15. Liang MBBS C-K, Leow MBBS H-R, Pang Y-K. EGFR Mutation Testing for Squamous Cell Lung Carcinoma. *J Thorac Oncol*. 2013;8(12):e114. doi:10.1097/JTO.0b013e3182a4e111.
16. Saintigny P, Burger JA. Recent Advances in Non-small Cell Lung Cancer Biology and Clinical Management. *Discov Med*. 2012;13(71):287-297.
17. Tang J, Salama R, Gadgeel SM, Sarkar FH, Ahmad A. Erlotinib resistance in lung cancer: current progress and future perspectives. *Front Pharmacol*. 2013;4:15. doi:10.3389/fphar.2013.00015.
18. Bastide K1, Ugolin N, Levalois C, Bernaudin JF CS. Are adenosquamous lung carcinomas a simple mix of adenocarcinomas and squamous cell carcinomas, or more complex at the molecular level? *Lung Cancer*. 2010;68(1):1-9.
19. Gollard R1, Jhatakia S, Elliott M KM. Large cell/neuroendocrine carcinoma. *Lung Cancer*. 2010;69(1):13-18.
20. Arias F, Guevara ACL DE, Jiménez J, Río J, Alarcón J, Ecuín J. Normativa sobre terapéutica del carcinoma broncogénico. *SEPAR*. 2005;38.
21. Nonaka M, Kadokura M, Yamamoto S, Kataoka D, Kunimura T, Kushima M, Horichi N TN. Tumor Dimension and Prognosis in Surgically Treated Lung Cancer: For Intentional Limited Resection. *Am J Clin Oncol*. 2003;26(5):499-503.
22. Tter RP, Kirisits C, Fidarova EF, et al. Present status and future of high-precision image guided adaptive brachytherapy for cervix carcinoma. doi:10.1080/02841860802282794.
23. Price A. Lung cancer \* 5: State of the art radiotherapy for lung cancer. *Thorax*. 2003;58(5):447-452. doi:10.1136/thorax.58.5.447.
24. Group TIALCTC. Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients with Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. <http://dx.doi.org/101056/NEJMoa031644>. 2009.
25. Pignon J-P, Tribodet H, Scagliotti G V., et al. Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation: A Pooled Analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol*. 2008;26(21):3552-3559. doi:10.1200/JCO.2007.13.9030.
26. Gray J, Sommers E, Alvelo-Rivera M, Robinson L, Bepler G. Neoadjuvant chemotherapy for resectable non-small-cell lung cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2009;23(10):879-886. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19839429>. Accessed December 9, 2016.
27. Rosell R, Viteri S, Molina MA, Benlloch S, Taron M. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as first-line treatment in advanced nonsmall-cell lung cancer. *Curr Opin Oncol*. 2010;22:112-120.
28. Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. <http://dx.doi.org/101056/NEJMoa0904554>. 2009.

## REFERENCIAS

---

29. Arora A, Scholar EM. Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;315(3):971-979. doi:10.1124/jpet.105.084145.
30. Hartmann JT, Haap M, Kopp H-G, Lipp H-P. Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Curr Drug Metab*. 2009;10(5):470-481. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19689244>. Accessed July 14, 2016.
31. Kranenburg O. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1756(2):81-82.
32. Suda K, Tomizawa K, Mitsudomi T. Biological and clinical significance of KRAS mutations in lung cancer: an oncogenic driver that contrasts with EGFR mutation. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(1):49-60. doi:10.1007/s10555-010-9209-4.
33. McGrath JP, Capon DJ, Smith DH, et al. Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature*. 304(5926):501-506. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6308466>. Accessed July 14, 2016.
34. Langer CJ. Roles of EGFR and KRAS Mutations in the Treatment Of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *P T*. 2011;36(5):263-279. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21785539>. Accessed October 26, 2016.
35. Hames ML, Chen H, Iams W, Aston J, Lovly CM, Horn L. Correlation between KRAS mutation status and response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer☆ *Lung Cancer*. 2016;92:29-34. doi:10.1016/j.lungcan.2015.11.004.
36. Riely GJ, Marks J, Pao W. KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6(2):201-205. doi:10.1513/pats.200809-107LC.
37. Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med*. 2005;2(1):e17. doi:10.1371/journal.pmed.0020017.
38. Jänne PA, Shaw AT, Pereira JR, et al. Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2013;14(1):38-47. doi:10.1016/S1470-2045(12)70489-8.
39. Galati R. The Role of Cyclooxygenase-2, Epidermal Growth Factor Receptor and Aromatase in Malignant Mesothelioma. In: *Malignant Mesothelioma*. InTech; 2012. doi:10.5772/50674.
40. Midha A, Dearden S, McCormack R. EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutMapII). *Am J Cancer Res*. 2015;5(9):2892-2911. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26609494>. Accessed October 27, 2016.
41. Sasaki H, Endo K, Konishi A, et al. EGFR Mutation status in Japanese lung cancer patients: genotyping analysis using LightCycler. *Clin Cancer Res*. 2005;11(8):2924-2929. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1904.

42. Otsuka T, Mori M, Yano Y, et al. Effectiveness of Tyrosine Kinase Inhibitors in Japanese Patients with Non-small Cell Lung Cancer Harboring Minor Epidermal Growth Factor Receptor Mutations: Results from a Multicenter Retrospective Study (HANSHIN Oncology Group 0212). *Anticancer Res.* 2015;35(7):3885-3891. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26124334>. Accessed July 18, 2016.
43. Sato T, Watanabe H, Tsuganezawa K, Yuki H, Mikuni J, Yoshikawa S, Kukimoto-Niino M, Fujimoto T, Terazawa Y, Wakiyama M, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Shirouzu M, Yokoyama S, Tanaka A HT. Identification of novel drug-resistant EGFR mutant inhibitors by in silico screening using comprehensive assessments of protein structures. *Bioorg Med Chem.* 2012;20(12):3756-3767.
44. Pao W, Iafrate AJ SZ. Genetically informed lung cancer medicine. *J Pathol.* 2011;223(2):230-240.
45. Van Der Steen N, Caparello C, Rolfo C, Pauwels P, Peters GJ, Giovannetti E. New developments in the management of non-small-cell lung cancer, focus on rociletinib: what went wrong? *Onco Targets Ther.* 2016;9:6065-6074. doi:10.2147/OTT.S97644.
46. Park SJ, Kim HT, Lee DH, et al. Efficacy of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for brain metastasis in non-small cell lung cancer patients harboring either exon 19 or 21 mutation. *Lung Cancer.* 2012;77(3):556-560. doi:10.1016/j.lungcan.2012.05.092.
47. Zhang Y, Sheng J, Yang Y, et al. Optimized selection of three major EGFR-TKIs in advanced EGFR-positive non-small cell lung cancer: a network meta-analysis. *Oncotarget.* 2016;7(15):20093-20108. doi:10.18632/oncotarget.7713.
48. Porta R, Sánchez-Torres JM, Paz-Ares L, et al. Brain metastases from lung cancer responding to erlotinib: the importance of EGFR mutation. *Eur Respir J.* 2011;37(3):624-631. doi:10.1183/09031936.00195609.
49. Raghav K, Morris V, Tang C, et al. MET amplification in metastatic colorectal cancer: An acquired response to EGFR inhibition, not a de novo phenomenon. *Oncotarget.* July 2016. doi:10.18632/oncotarget.10559.
50. Ortiz-Cuaran S, Scheffler M, Plenker D, et al. Heterogeneous mechanisms of primary and acquired resistance to third-generation EGFR inhibitors. *Clin Cancer Res.* June 2016. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1915.
51. Wang J, Wang B, Chu H, Yao Y. Intrinsic resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer with activating EGFR mutations. *Onco Targets Ther.* 2016;9:3711-3726. doi:10.2147/OTT.S106399.
52. Singh PK, Singh H SO. Kinases inhibitors in lung cancer: From benchside to bedside. *Biochim Biophys Acta.* 2016;(16):30047-3004753.
53. Sheikine Y, Rangachari D, McDonald DC, Huberman MS, Folch ES, VanderLaan PA CD. EGFR Testing in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer, A Mini-Review. *Clin Lung Cancer.* 2016;16:30132-30124.
54. Kobayashi Y MT. Not all EGFR mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy. *Cancer Sci.* 2016.

## REFERENCIAS

---

55. Solca F, Dahl G, Zoepfel A, et al. Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;343(2):342-350. doi:10.1124/jpet.112.197756.
56. Li D, Ambrogio L, Shimamura T, et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene.* 2008;27(34):4702-4711. doi:10.1038/onc.2008.109.
57. Hoffknecht P, Tufman A, Wehler T, et al. Efficacy of the irreversible ErbB family blocker afatinib in epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor (TKI)-pretreated non-small-cell lung cancer patients with brain metastases or leptomeningeal disease. *J Thorac Oncol.* 2015;10(1):156-163. doi:10.1097/JTO.0000000000000380.
58. Landi L, Tiseo M, Chiari R, et al. Activity of the EGFR-HER2 dual inhibitor afatinib in EGFR-mutant lung cancer patients with acquired resistance to reversible EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Clin Lung Cancer.* 2014;15(6):411-417.e4. doi:10.1016/j.clcc.2014.07.002.
59. Wang S, Cang S, Liu D. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol.* 2016;9:34. doi:10.1186/s13045-016-0268-z.
60. Sequist L V, Soria J-C, Goldman JW, et al. Rociletinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(18):1700-1709. doi:10.1056/NEJMoa1413654.
61. Sequist L V., Soria J-C, Goldman JW, et al. Rociletinib in EGFR -Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(18):1700-1709. doi:10.1056/NEJMoa1413654.
62. Dhingra K. Rociletinib: has the TIGER lost a few of its stripes? *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2016;27(6):1161-1164. doi:10.1093/annonc/mdw140.
63. Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, et al. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife.* 2014;3:e02242. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24843020>. Accessed October 31, 2016.
64. Gallagher EJ, LeRoith D. The proliferating role of insulin and insulin-like growth factors in cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(10):610-618. doi:10.1016/j.tem.2010.06.007.
65. Ota S, Horigome K, Ishii T, et al. Metformin suppresses glucose-6-phosphatase expression by a complex I inhibition and AMPK activation-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;388(2):311-316. doi:10.1016/j.bbrc.2009.07.164.
66. Cross DAE, Ashton SE, Ghiorghiu S, et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov.* 2014;4(9):1046-1061. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0337.
67. Wang S, Cang S, Liu D. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol.* 2016;9:34. doi:10.1186/s13045-016-0268-z.
68. Zhang H. Osimertinib making a breakthrough in lung cancer targeted therapy. *Oncotargets Ther.* 2016;9:5489-5493. doi:10.2147/OTT.S114722.



## REFERENCIAS

---

69. Ou SH, Agarwal N AS. High MET amplification level as a resistance mechanism to osimertinib (AZD9291) in a patient that symptomatically responded to crizotinib treatment post-osimertinib progression. *Lung Cancer*. 2016;59-61.
70. Bersanelli M, Minari R, Bordi P, Gnetti L, Bozzetti C, Squadrilli A2, Lagrasta CA4, Bottarelli L3, Osipova G, Capelletto E, Mor M TM. L718Q Mutation as New Mechanism of Acquired Resistance to AZD9291 in EGFR-Mutated NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2016;(16):30494-30498.
71. Hata A, Yoshioka H, Fujita S, Kunimasa K, Kaji R, Imai Y, Tomii K, Iwasaku M, Nishiyama A, Ishida T KN. Complex mutations in the epidermal growth factor receptor gene in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2010;5(10):1524-1528.
72. Sequist L V, Besse B, Lynch TJ, et al. Neratinib, an irreversible pan-ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor: results of a phase II trial in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(18):3076-3083. doi:10.1200/JCO.2009.27.9414.
73. Longo DL. Cancer-Drug Discovery — Let's Get Ready for the Next Period. *Ed n engl j med*. 2014;37123(4).
74. Murga-Zamalloa C, Lim MS. ALK-driven tumors and targeted therapy: Focus on crizotinib. *Pharmgenomics Pers Med*. 2014. doi:10.2147/PGPM.S37504.
75. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448(7153):561-566. doi:10.1038/nature05945.
76. Hallberg B, Palmer RH. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(10):685-700. doi:10.1038/nrc3580.
77. Iragavarapu C, Mustafa M, Akinleye A, et al. Novel ALK inhibitors in clinical use and development. doi:10.1186/s13045-015-0122-8.
78. Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(9):3143-3149. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3248.
79. Wong DW-S, Leung EL-H, Wong SK-M, et al. A novel *KIF5B-ALK* variant in nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2011;117(12):2709-2718. doi:10.1002/cncr.25843.
80. Ye M, Zhang X, Li N, et al. ALK and ROS1 as targeted therapy paradigms and clinical implications to overcome crizotinib resistance. *Oncotarget*. 2016;7(11). doi:10.18632/oncotarget.6935.
81. Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*. 2007;131(6):1190-1203. doi:10.1016/j.cell.2007.11.025.
82. Viola D, Valerio L, Molinaro E, et al. Treatment of advanced thyroid cancer with targeted therapies: ten years of experience. *Endocr Relat Cancer*. 2016;23(4):R185-205. doi:10.1530/ERC-15-0555.

## REFERENCIAS

---

83. Saito M, Shiraishi K, Kunitoh H, Takenoshita S, Yokota J, Kohno T. Gene aberrations for precision medicine against lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2016;107(6):713-720. doi:10.1111/cas.12941.
84. Mlika M, Laabidi S, Afrit M, Boussen H, El Mezni F. Genomic classification of lung cancer: toward a personalized treatment. *La Tunisie médicale.* 2015;93(6):339-344. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26644092>. Accessed July 15, 2016.
85. Cagle PT, Raparia K, Portier BP. Emerging Biomarkers in Personalized Therapy of Lung Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2016;890:25-36. doi:10.1007/978-3-319-24932-2\_2.
86. Wellbrock C, Arozarena I. The Complexity of the ERK/MAP-Kinase Pathway and the Treatment of Melanoma Skin Cancer. *Front cell Dev Biol.* 2016;4:33. doi:10.3389/fcell.2016.00033.
87. Yeh I. Recent advances in molecular genetics of melanoma progression: implications for diagnosis and treatment. *F1000Research.* 2016;5. doi:10.12688/f1000research.8247.1.
88. Bansal P, Osman D, Gan GN, Simon GR, Bumber Y. Recent Advances in Targetable Therapeutics in Metastatic Non-Squamous NSCLC. *Front Oncol.* 2016;6:112. doi:10.3389/fonc.2016.00112.
89. Parker BC, Engels M, Annala M, Zhang W. Emergence of FGFR family gene fusions as therapeutic targets in a wide spectrum of solid tumours. *J Pathol.* 2014;232(1):4-15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24588013>. Accessed July 15, 2016.
90. Popper HH, Ryska A, Tímár J, Olszewski W. Molecular testing in lung cancer in the era of precision medicine. *Transl lung cancer Res.* 2014;3(5):291-300. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2014.10.01.
91. Zhao J, Xiong J. [Advances on driver oncogenes of non-small cell lung cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2015;18(1):42-47. doi:10.3779/j.issn.1009-3419.2015.01.07.
92. Jiang T, Gao G, Fan G, Li M ZC. FGFR1 amplification in lung squamous cell carcinoma: a systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer.* 2015;87(1):1-7.
93. Kahnert K, Kauffmann-Guerrero D HR. SCLC-State of the Art and What Does the Future Have in Store? *Clin Lung Cancer.* 2016;16:30130-30139.
94. Johnson JD, Edman JC, Rutter WJ. A receptor tyrosine kinase found in breast carcinoma cells has an extracellular discoidin I-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(12):5677-5681. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8390675>. Accessed December 7, 2016.
95. Di Marco E, Cutuli N, Guerra L, Cancedda R, De Luca M. Molecular cloning of trkE, a novel trk-related putative tyrosine kinase receptor isolated from normal human keratinocytes and widely expressed by normal human tissues. *J Biol Chem.* 1993;268(32):24290-24295. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8226977>. Accessed December 7, 2016.
96. Karn T, Holtrich U, Bräuninger A, et al. Structure, expression and chromosomal mapping of TKT from man and mouse: a new subclass of receptor tyrosine kinases with a factor VIII-like domain. *Oncogene.* 1993;8(12):3433-3440. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8247548>. Accessed December 7, 2016.

## REFERENCIAS

---

97. Zerlin M, Julius MA, Goldfarb M. NEP: a novel receptor-like tyrosine kinase expressed in proliferating neuroepithelia. *Oncogene*. 1993;8(10):2731-2739. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8397369>. Accessed December 7, 2016.
98. Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell*. 1997;1(1):13-23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9659899>. Accessed December 7, 2016.
99. Xu H, Raynal N, Stathopoulos S, Myllyharju J, Farndale RW, Leitinger B. Collagen binding specificity of the discoidin domain receptors: Binding sites on collagens II and III and molecular determinants for collagen IV recognition by DDR1. *Matrix Biol*. 2011;30(1):16-26. doi:10.1016/j.matbio.2010.10.004.
100. Kiedziarska A, Smietana K, Czepczynska H, Otlewski J. Structural similarities and functional diversity of eukaryotic discoidin-like domains. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2007;1774(9):1069-1078. doi:10.1016/j.bbapap.2007.07.007.
101. Iwai LK, Luczynski MT, Huang PH. Discoidin domain receptors: a proteomic portrait. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(17):3269-3279. doi:10.1007/s00018-014-1616-1.
102. Day E, Waters B, Spiegel K, et al. Inhibition of collagen-induced discoidin domain receptor 1 and 2 activation by imatinib, nilotinib and dasatinib. *Eur J Pharmacol*. 2008;599(1-3):44-53. doi:10.1016/j.ejphar.2008.10.014.
103. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*. 2010;141(7):1117-1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011.
104. Noordeen NA, Carafoli F, Hohenester E, Horton MA, Leitinger B. A Transmembrane Leucine Zipper Is Required for Activation of the Dimeric Receptor Tyrosine Kinase DDR1. *J Biol Chem*. 2006;281(32):22744-22751. doi:10.1074/jbc.M603233200.
105. Ali BR, Xu H, Akawi NA, et al. Trafficking defects and loss of ligand binding are the underlying causes of all reported DDR2 missense mutations found in SMED-SL patients. *Hum Mol Genet*. 2010;19(11):2239-2250. doi:10.1093/hmg/ddq103.
106. Valiathan RR, Marco M, Leitinger B, Kleer CG, Fridman R. Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2012;31(1-2):295-321. doi:10.1007/s10555-012-9346-z.
107. Walsh LA, Nawshad A, Medici D. Discoidin domain receptor 2 is a critical regulator of epithelial-mesenchymal transition. *Matrix Biol*. 2011;30(4):243-247. doi:10.1016/j.matbio.2011.03.007.
108. Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, et al. Mutations in the DDR2 Kinase Gene Identify a Novel Therapeutic Target in Squamous Cell Lung Cancer. *Cancer Discov*. 2011;1(1):78-89. doi:10.1158/2159-8274.CD-11-0005.
109. Xu J, Lu W, Zhang S, et al. Overexpression of DDR2 contributes to cell invasion and migration in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther*. 2014;15(5):612-622. doi:10.4161/cbt.28181.

## REFERENCIAS

---

110. Yan Z, Jin S, Wei Z, et al. Discoidin domain receptor 2 facilitates prostate cancer bone metastasis via regulating parathyroid hormone-related protein. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2014;1842(9):1350-1363. doi:10.1016/j.bbadis.2014.04.018.
111. Payne LS, Huang PH. Discoidin Domain Receptor 2 Signaling Networks and Therapy in Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2014;9(6):900-904. doi:10.1097/JTO.000000000000164.
112. Siddiqui K, Kim GW, Lee DH, et al. Actinomycin D identified as an inhibitor of discoidin domain receptor 2 interaction with collagen through an insect cell based screening of a drug compound library. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(1):136-141. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19122296>. Accessed December 7, 2016.
113. Castro-Sanchez L, Soto-Guzman A, Navarro-Tito N, Martinez-Orozco R, Salazar EP. Native type IV collagen induces cell migration through a CD9 and DDR1-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Eur J Cell Biol.* 2010;89(11):843-852. doi:10.1016/j.ejcb.2010.07.004.
114. Foehr ED, Tatavos A, Tanabe E, et al. Discoidin domain receptor 1 (DDR1) signaling in PC12 cells: activation of juxtamembrane domains in PDGFR/DDR/TrkA chimeric receptors. *FASEB J.* 2000;14(7):973-981. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10783152>. Accessed December 7, 2016.
115. Ikeda K, Wang L-H, Torres R, et al. Discoidin Domain Receptor 2 Interacts with Src and Shc following Its Activation by Type I Collagen. *J Biol Chem.* 2002;277(21):19206-19212. doi:10.1074/jbc.M201078200.
116. Davis MI, Hunt JP, Herrgard S, et al. Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol.* 2011;29(11):1046-1051. doi:10.1038/nbt.1990.
117. Yang X, Yang K, Kuang K. The Efficacy and Safety of EGFR Inhibitor Monotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review. *Curr Oncol Rep.* 2014;16(6):390. doi:10.1007/s11912-014-0390-4.
118. Ou S-HI. Second-generation irreversible epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs): A better mousetrap? A review of the clinical evidence. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012;83(3):407-421. doi:10.1016/j.critrevonc.2011.11.010.
119. Lou Y, Owens TD, Kuglstatler A, Kondru RK, Goldstein DM. Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors: Approaches to Potent and Selective Inhibition, Preclinical and Clinical Evaluation for Inflammatory Diseases and B Cell Malignancies. *J Med Chem.* 2012;55(10):4539-4550. doi:10.1021/jm300035p.
120. Lu XY, Cai Q, Ding K. Recent developments in the third generation inhibitors of Bcr-Abl for overriding T315I mutation. *Curr Med Chem.* 2011;18(14):2146-2157. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21517764>. Accessed December 7, 2016.
121. Schenone S, Bruno O, Radi M, Botta M. New insights into small-molecule inhibitors of Bcr-Abl. *Med Res Rev.* 2011;31(1):1-41. doi:10.1002/med.20175.
122. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, et al. Dasatinib in Imatinib-Resistant Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias. *N Engl J Med.* 2006;354(24):2531-2541. doi:10.1056/NEJMoa055229.

123. Brunner AM, Costa DB, Heist RS, et al. Treatment-Related Toxicities in a Phase II Trial of Dasatinib in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *J Thorac Oncol*. 2013;8(11):1434-1437. doi:10.1097/JTO.0b013e3182a47162.
124. Levitzki A, Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*. 1995;267(5205):1782-1788. doi:10.1126/SCIENCE.7892601.
125. Garcia-Echeverria C, Fabbro D. Therapeutically Targeted Anticancer Agents: Inhibitors of Receptor Tyrosine Kinases. *Mini-Reviews Med Chem*. 2004;4(3):273-283. doi:10.2174/1389557043487349.
126. Traxler PM, Furet P, Mett H, Buchdunger E, Meyer T, Lydon N. 4-(Phenylamino)pyrrolopyrimidines: Potent and Selective, ATP Site Directed Inhibitors of the EGF-Receptor Protein Tyrosine Kinase. *J Med Chem*. 1996;39(12):2285-2292. doi:10.1021/jm960118j.
127. Thompson AM, Bridges AJ, Fry DW, Kraker AJ, Denny WA. Tyrosine kinase inhibitors. 7. 7-Amino-4-(phenylamino)- and 7-amino-4-[(phenylmethyl)amino]pyrido[4,3-d]pyrimidines: a new class of inhibitors of the tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor. *J Med Chem*. 1995;38(19):3780-3788. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7562908>. Accessed October 7, 2016.
128. Victory P, Nomen R, Colomina O, Garriga M, Crespo A. pyrimidines. I: Reaction of 6-alkoxy-5-cyano-3, 4-dihydro-2-pyridones with guanidine and cyanamide. *Heterocycles*. 1985. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=8554489>. Accessed October 19, 2016.
129. I. Borrell J, Pérez-Pi I, Berzosa X, Galve I, Teixidó J. Dehydrogenation of 5,6-Dihydropyrido[3,2-d]pyrimidin-7(8H)-ones: A Convenient Last Step for a Synthesis of Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-ones. *Heterocycles*. 2010;82(1):581. doi:10.3987/COM-10-S(E)28.
130. Galve I, Puig de la Bellacasa R, Sánchez-García D, Batllori X, Teixidó J, Borrell JI. Synthesis of 2-aryl amino substituted 5,6-dihydropyrido[2,3-d]pyrimidine-7(8H)-ones from arylguanidines. *Mol Divers*. 2012;16(4):639-649. doi:10.1007/s11030-012-9398-6.
131. Martínez-Teipel B, Teixidó J, Pascual R, et al. 2-Methoxy-6-oxo-1,4,5,6-tetrahydropyridine-3-carbonitriles: versatile starting materials for the synthesis of libraries with diverse heterocyclic scaffolds. *J Comb Chem*. 7(3):436-448. doi:10.1021/cc049828y.
132. Lakshman MK, Frank J. A simple method for C-6 modification of guanine nucleosides. *Org Biomol Chem*. 2009;7(14):2933-2940. doi:10.1039/b905298d.
133. Zhao C, Wang Y, Ma S. Recent advances on the synthesis of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA-polymerase inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2015;102:188-214. doi:10.1016/j.ejmech.2015.07.046.
134. Wan Z-K, Wacharasindhu S, Binnun E, Mansour T. An Efficient Direct Amination of Cyclic Amides and Cyclic Ureas<sup>†</sup>. *Org Lett*. 2006;8(11):2425-2428. doi:10.1021/ol060815y.

135. Devine SM, Scammells PJ. Synthesis and Utility of 2-Halo-O6-(benzotriazol-1-yl)-Functionalized Purine Nucleosides. *European J Org Chem.* 2011;2011(6):1092-1098. doi:10.1002/ejoc.201001395.
136. Klutchko SR, Hamby JM, Boschelli DH, et al. 2-Substituted Aminopyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-ones. Structure–Activity Relationships Against Selected Tyrosine Kinases and in Vitro and in Vivo Anticancer Activity. 1998. doi:10.1021/JM9802259.
137. Puig de la Bellacasa R, Roué G, Balsas P, et al. 4-Amino-2-arylamino-6-(2,6-dichlorophenyl)-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-(8H)-ones as BCR kinase inhibitors for B lymphoid malignancies. *Eur J Med Chem.* 2014;86:664-675. doi:10.1016/j.ejmech.2014.09.018.
138. Kim A, Seong KM, Kang HJ, Park S, Lee S-S. Inhibition of Lyn is a promising treatment for mantle cell lymphoma with bortezomib resistance. *Oncotarget.* 2015;6(35):38225-38238. doi:10.18632/oncotarget.5425.
139. Leonard JT, Rowley JSJ, Eide CA, et al. Targeting BCL-2 and ABL/LYN in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 2016;8(354):354ra114-354ra114. doi:10.1126/scitranslmed.aaf5309.
140. Köhrer S, Havranek O, Seyfried F, et al. Pre-BCR signaling in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia regulates PI3K/AKT, FOXO1 and MYC, and can be targeted by SYK inhibition. *Leukemia.* 2016;30(6):1246-1254. doi:10.1038/leu.2016.9.
141. Roskoski R. Ibrutinib inhibition of Bruton protein-tyrosine kinase (BTK) in the treatment of B cell neoplasms. *Pharmacol Res.* 2016;113(Pt A):395-408. doi:10.1016/j.phrs.2016.09.011.
142. Chou T-C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Res.* 2010;70(2).
143. von Mässenhausen A, Sanders C, Brägelmann J, et al. Targeting DDR2 in head and neck squamous cell carcinoma with dasatinib. *Int J Cancer.* 2016;139(10):2359-2369. doi:10.1002/ijc.30279.
144. Liu L, Hussain M, Luo J, et al. Synthesis and biological evaluation of novel dasatinib analogues as potent DDR1 and DDR2 kinase inhibitors. *Chem Biol Drug Des.* October 2016. doi:10.1111/cbdd.12863.
145. Cross DAE, Ashton SE, Giorghiu S, et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov.* 2014;4(9):1046-1061. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0337.
146. Levitzki A. Targeting signal transduction for disease therapy. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8(2):239-244.
147. Klutchko SR, Hamby JM, Boschelli DH, et al. 2-Substituted aminopyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-ones. Structure-activity relationships against selected tyrosine kinases and in vitro and in vivo anticancer activity. *J Med Chem.* 1998;41(17):3276-3292. doi:10.1021/jm9802259.

## REFERENCIAS

---

148. Lukevics E, Jansone D, Leite L, et al. Synthesis and cytotoxicity of phenyl-vinyl derivatives of 4,6,6-trimethyl-2-oxo-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-carbonitrile. *Chem Heterocycl Compd.* 2009;45(10):1226-1234. doi:10.1007/s10593-010-0411-7.
149. Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, et al. Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov.* 2011;1(1):78-89. doi:10.1158/2159-8274.CD-11-0005.
150. Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, et al. Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov.* 2011. doi:10.1158/2159-8274.CD-11-0005.
151. Johnson FM, Saigal B, Talpaz M, Donato NJ. Dasatinib (BMS-354825) Tyrosine Kinase Inhibitor Suppresses Invasion and Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Clin Cancer Res.* 2005;11(19).
152. Jia G, Zhang W, Zhou J, Zhu Z. [Effects of paclitaxel and gefitinib on the proliferation and cell cycle of human lung adenocarcinoma cell SPC-A1.]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2008;11(3):339-344. doi:10.3779/j.issn.1009-3419.2008.03.026.
153. Ather F, Hamidi H, Fejzo MS, et al. Dacomitinib, an irreversible Pan-ErbB inhibitor significantly abrogates growth in head and neck cancer models that exhibit low response to cetuximab. *PLoS One.* 2013;8(2):e56112. doi:10.1371/journal.pone.0056112.
154. Jänne PA, Yang JC-H, Kim D-W, et al. AZD9291 in EGFR Inhibitor-Resistant Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(18):1689-1699. doi:10.1056/NEJMoa1411817.
155. Sahu A, Prabhash K, Noronha V, Joshi A, Desai S. Crizotinib: A comprehensive review. *South Asian J cancer.* 2013;2(2):91-97. doi:10.4103/2278-330X.110506.
156. Roskoski R. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;324(4):1155-1164. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.171.
157. Prenen H, Tejpar S, Cutsem E V. New Strategies for Treatment of KRAS Mutant Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(11):2921-2926. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2029.
158. Tang C, Luo D, Yang H, et al. Expression of SHP2 and related markers in non-small cell lung cancer: a tissue microarray study of 80 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* 2013;21(5):386-394. doi:10.1097/PAI.0b013e31827da3f9.
159. Tang C, Luo D, Yang H, et al. Expression of SHP2 and Related Markers in Non-Small Cell Lung Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2013;21(5):386-394. doi:10.1097/PAI.0b013e31827da3f9.
160. Savagner P. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2010;21 Suppl 7(suppl 7):vii89-92. doi:10.1093/annonc/mdq292.
161. Evdokimova V, Tognon C, Ng T, Sorensen PHB. Reduced proliferation and enhanced migration: Two sides of the same coin? Molecular mechanisms of metastatic progression by YB-1. *Cell Cycle.* 2009;8(18):2901-2906. doi:10.4161/cc.8.18.9537.

162. Tamiya S, Liu L, Kaplan HJ. Epithelial-Mesenchymal Transition and Proliferation of Retinal Pigment Epithelial Cells Initiated upon Loss of Cell-Cell Contact. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2010;51(5):2755. doi:10.1167/iovs.09-4725.
163. Zhang J, Zhang F, Niu R. Functions of Shp2 in cancer. *J Cell Mol Med*. 2015;19(9):2075-2083. doi:10.1111/jcmm.12618.
164. Formisano L, D'Amato V, Servetto A, et al. Src inhibitors act through different mechanisms in Non-Small Cell Lung Cancer models depending on EGFR and RAS mutational status. *Oncotarget*. 2015;6(28):26090-26103. doi:10.18632/oncotarget.4636.
165. Wu Y-L, Zhou C, Hu C-P, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(2):213-222. doi:10.1016/S1470-2045(13)70604-1.
166. Sequist L V., Yang JC-H, Yamamoto N, et al. Phase III Study of Afatinib or Cisplatin Plus Pemetrexed in Patients With Metastatic Lung Adenocarcinoma With EGFR Mutations. *J Clin Oncol*. 2013;31(27):3327-3334. doi:10.1200/JCO.2012.44.2806.
167. Yang JC, Shih JY, Su WC, Hsia TC, Tsai CM, Ou SH, Yu CJ, Chang GC, Ho CL, Sequist LV, Dudek AZ, Shahidi M, Cong XJ, Lorence RM, Yang PC MV. Afatinib for patients with lung adenocarcinoma and epidermal growth factor receptor mutations (LUX-Lung 2): a phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(5):539-548.
168. Watanabe S, Tanaka J, Ota T, et al. Clinical responses to EGFR-tyrosine kinase inhibitor retreatment in non-small cell lung cancer patients who benefited from prior effective gefitinib therapy: a retrospective analysis. *BMC Cancer*. 2011;11(1):1. doi:10.1186/1471-2407-11-1.
169. Wu J-Y, Wu S-G, Yang C-H, et al. Lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 20 mutations is associated with poor gefitinib treatment response. *Clin Cancer Res*. 2008;14(15):4877-4882. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5123.
170. Orfali G di C, Duarte AC, Bonadio V, et al. Review of anticancer mechanisms of isoquercetin. *World J Clin Oncol*. 2016;7(2):189. doi:10.5306/wjco.v7.i2.189.
171. Chripkova M, Zigo F, Mojzis J. Antiproliferative Effect of Indole Phytoalexins. *Molecules*. 2016;21(12):1626. doi:10.3390/molecules21121626.
172. Rydberg P, Jørgensen MS, Jacobsen TA, Jacobsen A-M, Madsen KG, Olsen L. Nitrogen Inversion Barriers Affect the N-Oxidation of Tertiary Alkylamines by Cytochromes P450. *Angew Chemie Int Ed*. 2013;52(3):993-997. doi:10.1002/anie.201206207.
173. Rydberg P, Rostkowski M, Gloriam DE, Olsen L. The Contribution of Atom Accessibility to Site of Metabolism Models for Cytochromes P450. *Mol Pharm*. 2013;10(4):1216-1223. doi:10.1021/mp3005116.
174. Rydberg P, Olsen L. Predicting Drug Metabolism by Cytochrome P450 2C9: Comparison with the 2D6 and 3A4 Isoforms. *ChemMedChem*. 2012;7(7):1202-1209. doi:10.1002/cmdc.201200160.



## REFERENCIAS

---

175. Rydberg P, Olsen L. Ligand-Based Site of Metabolism Prediction for Cytochrome P450 2D6. *ACS Med Chem Lett.* 2012;3(1):69-73. doi:10.1021/ml200246f.
176. Rydberg P, Gloriam DE, Olsen L. The SMARTCyp cytochrome P450 metabolism prediction server. *Bioinformatics.* 2010;26(23):2988-2989. doi:10.1093/bioinformatics/btq584.
177. Rydberg P, Gloriam DE, Zaretski J, Breneman C, Olsen L. SMARTCyp: A 2D Method for Prediction of Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism. *ACS Med Chem Lett.* 2010;1(3):96-100. doi:10.1021/ml100016x.
178. Stella VJ, Nti-Addae KW. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(7):677-694. doi:10.1016/j.addr.2007.05.013.
179. Borrell JI, Teixidó J, Puig de la Bellacasa R, Colomer D, Roué G, Pérez-Galán P. 4-AMINO-6-(2,6-DICHLOROPHENYL)-2-(PHENYLAMINO)-PYRIDO[2,3-d]PYRIMIDIN-7(8H)-ONE DERIVATIVES, SYNTHESIS AND USES THEREOF. 2014:60. <https://www.google.com/patents/WO2014198960A1?cl=en&hl=es>.

# SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF THE COMPOUNDS



## 7 Synthesis and characterization of the compounds

Infrared Spectra (IR) were recorded in a Thermo Scientific Nicolet iS10 FTIR spectrometer with Smart iTr of the Organic and pharmaceutical Chemistry department at IQS, by Mrs. Núria Ruiz, under the supervision of Dr. Xavier Batllori. Values are reported in wave numbers ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Nuclear Magnetic Resonance spectra ( $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR) were either recorded on a Varian 400-NMR spectrometer with a 400 MHz frequency generators for ranges  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  and  $^{15}\text{N}$ - $^{31}\text{P}$ , temperature control system, automatic tuning probe and sample introduction robot 50 positions ( $^1\text{H}$ -NMR at 400 MHz and  $^{13}\text{C}$ -NMR at 100.6 MHz) by myself in the Organic and Pharmaceutical Chemistry department at IQS under the direction of Dr. X. Batllori. Chemical shifts are reported in part per million (ppm) on the  $\delta$  scale, and are referenced to Tetramethylsilane (TMS) in  $^1\text{H}$ -NMR spectra and to residual signal of the solvent  $\text{CDCl}_3$  (77.0),  $\text{DMSO-}d_6$  (39.5), acetone- $d_6$  (29.8) in  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra. Coupling constants are reported in Hertz (Hz). Spectral splitting patterns are designed as a: s (singlet), d (doublet), t (triplet), dd (doublet of doublets), ddd (double doublet of doublets), dt (doublet of triplets), td (triplet of doublets), qd (quartet of doublets), m (complex multiplet).

Mass Spectrometry (MS) was conducted on a VG AutoSpec (Micromass Instruments) TrioSector EBE spectrometer operating in Fast Atom Bombardment (FAB) mode or on a Biotoff II (Bruker) in Electrospray ionization (ESI) mode with a Time Of Flight (TOF) detector at Unidade de Espectrometria de Masas (Universidad de Santiago de Compostela) under the supervision of Dr. Esteban Gutiérrez and on an Agilent Technologies 5975 spectrometer at Organic and Pharmaceutical Chemistry department at IQS under the direction of Dr. Xavier Batllori by Mrs. Núria Ruiz.

High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) was recorded at the Mass Spectrometry Service at Unidade de Espectrometría de Masas (Universidad de Santiago de Compostela) under the direction of Dr. Esteban Gutiérrez, by using a VG AutoSpec (Micromass Instruments) Trisector EBE high resolution spectrometer (EI mode) or a Bruker Biotof II mass spectrometer (ESI-TOF mode).

Elemental microanalyses were obtained in a EuroVector Instruments Euro EA analyzer at the Organic and Pharmaceutical Chemistry department at IQS by Mrs. Núria Ruiz under the supervision of Dr. X. Batllori.

Microwave irradiation experiments were carried out in an InitiatorTM (Biotage) microwave apparatus, operating at a frequency of 2.45 GHz with continuous irradiation power from 0 to 400 W. Reactions were carried out in 0.5, 2.5, 5, 20 mL glass tubes, sealed with aluminium/Teflon crimp tops, which can be exposed up to 250°C and 20 bar inteARNI pressure. Temperature was measured with an IR sensor on the outer surface of the process vial. After the irradiation period, the reaction vessel was cooled rapidly to 50°C by air jet cooling.

Automatic flash chromatography was done in an Isco Combiflash medium pressure liquid chromatograph with RediSep® silica gel columns (35-70  $\mu\text{m}$ ) or basic alumina columns (50-200  $\mu\text{m}$ ).

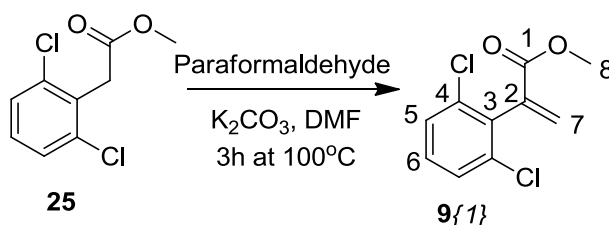
The melting point (mp) and decomposition point (dp) were determined with a Büchi-Tottoli 530 capillary apparatus and are uncorrected.

Thanks to all of them for all their work.

## 7.1 C-16 Synthetic pathway

All solvents and chemicals were reagent grade. Unless otherwise mentioned, all solvents and chemicals were purchased from commercial vendors (Fluka, Aldrich, and ACROS Organics) and used without purification.

### 7.1.1 Synthesis of methyl 2-(2,6-dichlorophenyl)acrylate (**9{1}**)

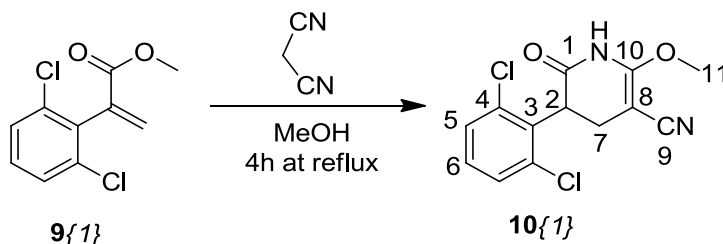


Methyl 2-(2,6-dichlorophenyl)acetate (32.65 mmol) was dissolved in dimethylformamide (135.00 mL) and paraformaldehyde (4.025 g, 42.44 mmol) and potassium carbonate (4.512 g, 32.65 mmol) were added. The reaction temperature was kept at 100°C during 3 h. The reaction mixture was quenched with water and extracted with Et<sub>2</sub>O (3 × 60.00 mL). The combined extracts were washed with a solution of lithium chloride (3 × 60.00 mL) and the solvent was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered and removed under reduced pressure to afford 7.389 g (31.98 mmol, 98%) the corresponding methyl 2-(2,6-dichlorophenyl)acrylate (**9{1}**) as a white solid which was used without further purification. m.p.: 47-48°C.

#### Spectroscopic data

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 7.35 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H, C5-H), 7.21 (m, 1H, C6-H), 6.79 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1H, C7-H), 5.83 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1H, C7-H), 3.77 (s, 3H, C8-H).

Spectroscopy data were identical with those reported in the literature<sup>137</sup>.

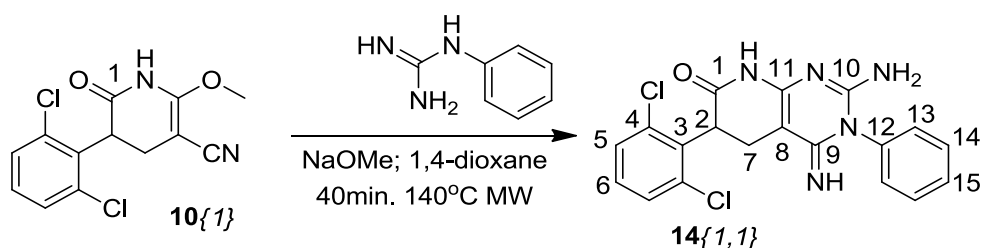
7.1.2 Synthesis of 5-(2,6-dichlorophenyl)-2-methoxy-6-oxopiperidine-3-carbonitrile (**10{1}**)

To a solution of 1.141 g (20.53 mmol) of NaOMe in 25.00 mL of anhydrous methanol, 1.003 g (15.18 mmol) of malononitrile were added and the mixture left cool down. 2.946 g (12.75 mmol) of methyl 2-(2,6-dichlorophenyl)acrylate were added slowly and the mixture refluxed for 5 h. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue dissolved in the minimum quantity of water. Careful neutralization to pH 7 with 2M aqueous HCl allowed the precipitation of a solid which was filtered, washed with cold water and dried *in vacuo* over phosphorus pentoxide. 3.707 g (12.48 mmol, 98%) of 5-(2,6-dichlorophenyl)-2-methoxy-6-oxo-1,4,5,6-tetrahydropyridine-3-carbonitrile (**10{1}**) were obtained as a white solid mp: 148–150°C.

Spectroscopic data

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 9.49 (br s, 1H, NH), 7.48 (dd,  $J = 8.0$  Hz, 2H, C5-H), 7.37 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H, C6-H), 4.79 (dd,  $J = 14.0, 8.3$  Hz, 1H, C2-H), 4.13 (s, 3H, C11-H), 3.13 (dd,  $J = 15.3, 14.0$  Hz, 1H, C7-H), 2.55 (dd,  $J = 15.3, 8.3$  Hz, 1H, C7-H).

Spectroscopy data were identical with those reported in the literature<sup>137</sup>.

7.1.3 Synthesis of 2-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-4-imino-3-phenyl-3,4,5,6-tetrahydropyrido-[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (**14{1,1}**)

A mixture of *N*-phenylguanidine carbonate ( $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_3 \cdot (\text{H}_2\text{CO}_3)_{0.7}$ ) (365.000 mg, 2.04 mmol of *N*-phenylguanidine), sodium methoxide (155.000 mg, 2.87 mmol), and 1,4-dioxane (10.00 mL) was sealed in a 20.00 mL microwave vial and heated at 65°C under microwave irradiation for 15 min. A clear solution with a white precipitate was obtained. The solid was removed by filtration and the mother liquor was transferred to a 20.00 mL microwave vial together with 5-(2,6-dichlorophenyl)-2-methoxy-6-oxo-1,4,5,6-tetra-hydropyridine-3-carbonitrile (202.000 mg, 0.68 mmol). The vial was sealed and heated at 140°C under microwave irradiation for 40 min. The solvent of the red solution obtained was removed *in vacuo*, and the resulting red oil was treated with acetone (10.00 mL) and sonication for 10 min while a white precipitate was formed. The

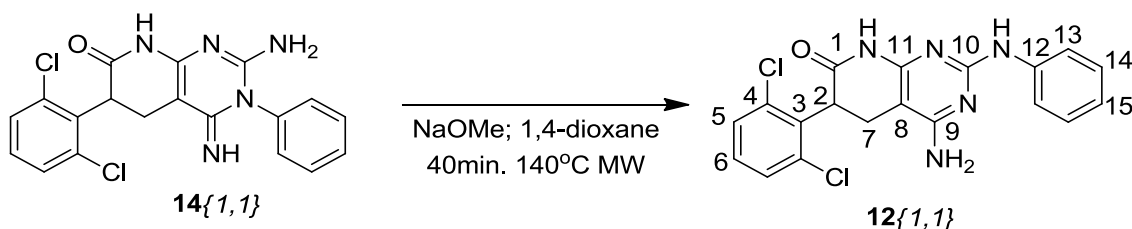
solid was filtered, washed with acetone to afford 257.000 mg (0.64 mmol, 94%) of pure 2-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-4-imino-3-phenyl-3,4,5,6-tetrahydropyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (**14**{1,1}). mp >250°C.

#### Spectroscopic data

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 10.01 (br s, 1H, NH), 7.59 (t,  $J = 8.1$  Hz, 2H, C5-H), 7.55 – 7.47 (m, 3H, C13-H, C15-H), 7.35 – 7.31 (m, 1H, C6-H), 7.33 – 7.27 (m, 2H, C14-H), 6.23 (br s, 3H, NH, NH2), 4.61 (dd,  $J = 13.4, 9.2$  Hz, 1H, C2-H), 2.86 (dd,  $J = 15.9, 9.2$  Hz, 1H, C7-H), 2.75 – 2.64 (dd,  $J = 15.9, 13.4$  Hz, 1H, C7-H).

Spectroscopy data were identical with those reported in the literature <sup>137</sup>.

#### 7.1.4 Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-(phenylamino-5,6-dihydropyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (**12**{1,1})

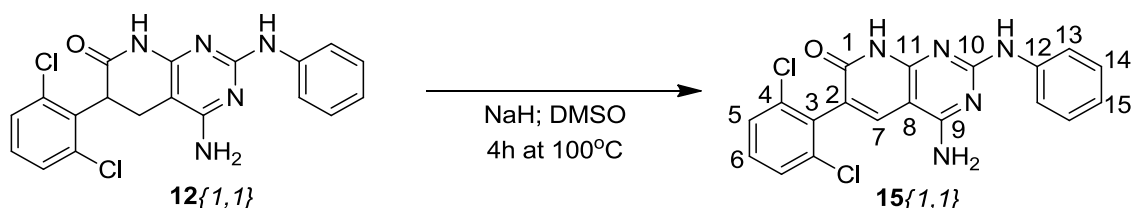


A mixture of 2-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-4-imino-3-phenyl-3,4,5,6-tetrahydropyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (100.000 mg, 0.25 mmol), sodium methoxide (14.000 mg, 0.26 mmol) and methanol (10.00 mL) was sealed in a 20.00 mL microwave vial and heated at 140°C under microwave irradiation for 40 min. The solid obtained was filtered, washed with water and Et<sub>2</sub>O to afford 87.000 mg (0.21 mmol, 87%) of pure 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-(phenylamino-5,6-dihydropyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (**12**{1,1}) as a white solid, mp >250°C.

#### Spectroscopic data

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 10.34 (br s, 1H, NH), 8.75 (br s, 1H, NH), 7.84 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, C13-H), 7.59 – 7.50 (m, 2H, C5-H), 7.38 (t,  $J = 8.1$  Hz, 1H, C6-H), 7.19 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H, C14-H), 6.89–6.81 (m, 1H, C15-H), 6.37 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.68 (dd,  $J = 13.1, 8.9$  Hz, 1H, C2-H), 2.95 (dd,  $J = 15.7, 8.8$  Hz, 1H, C7-H), 2.81 (dd,  $J = 15.5, 13.4$  Hz, 1H, C7-H).

Spectroscopy data were identical with those reported in the literature <sup>137</sup>.

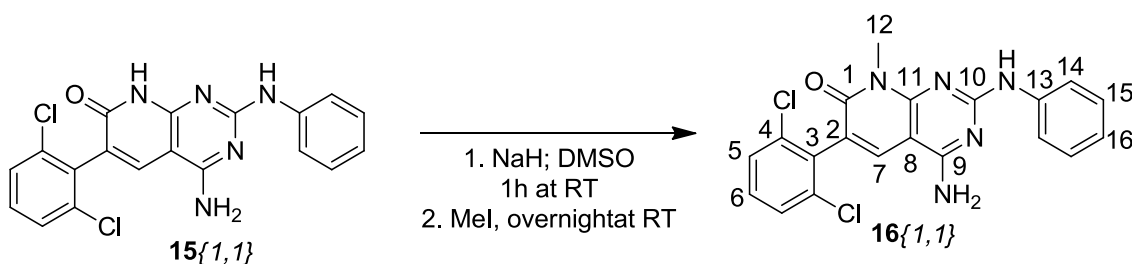
7.1.5 Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-(phenylamino)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (**15**{1,1})

A mixture of 200.100 mg (0.50 mmol) of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-5,6-dihydro-2-(phenylamino)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one and 60.000 mg (1.50 mmol) of sodium hydride (NaH) (60% dispersion in mineral oil) in 5.00 mL of anhydrous DMSO was heated for 4h at 100°C protected from moisture. The resulting solution was cooled, water (300.00 mL) was added and the resulting solution was neutralized with AcOH. The resulting precipitate was filtered, washed with EtOH and Et<sub>2</sub>O and dried *in vacuo* over phosphorus pentoxide to afford 173.300 mg (0.44 mmol, 87%) of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-(phenylamino)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (**15**{1,1}) as a slightly brownish solid. m.p. > 270°C.

Spectroscopic data

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 11.85 (br s, 1H, NH), 9.26 (br s, 1H, NH), 8.04 (s, 1H, C7-H), 7.88 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, C5-H), 7.60 – 7.52 (m, 2H, C13-H), 7.42 (dd, *J* = 8.7, 7.5 Hz, 1H, C6-H), 7.29 (br s, 2H, C14-H), 7.27 – 7.18 (m, 2H, C15-H), 6.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, C7-H).

Spectroscopy data were identical with those reported in the literature<sup>137</sup>.

7.1.6 Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methyl-2-(phenylamino)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (**16**{1,1}) (C16 or PB1)

28.000 mg (0.70 mmol) of sodium hydride (NaH) (60% dispersion in mineral oil) were added to a solution of 280.200 mg (0.70 mmol) of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-(phenylamino)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one in 10.00 mL of anhydrous DMSO, and the mixture was stirred for 1h at rt under nitrogen atmosphere. After this period, 43.80 μL (0.70 mmol) of methyl iodide were added dropwise and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched by addition of 300.00 mL of water and the resulting precipitate was filtered, washed with water and dried *in vacuo* over phosphorus pentoxide to afford 275.700 mg (0.67 mmol, 96%) of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methyl-2-(phenylamino)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (**16**{1,1}) as a slightly brownish solid. m.p. = 265-267°C.

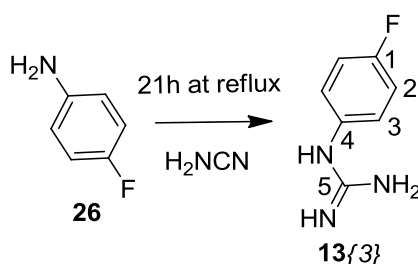


Spectroscopic data

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 9.41 (br s, 1H, NH), 8.09 (s, 1H, C7-H), 7.82 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, C5-H), 7.56 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, C14-H), 7.42 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, C6-H), 7.38 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.28 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H, C15-H), 6.95 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H, C16-H), 3.59 (s, 3H, C12-H).

Spectroscopy data were identical with those reported in the literature<sup>137</sup>.

## 7.2 Synthesis of PB1 analogues

7.2.1 Synthesis of *N*-(4-fluorophenyl)guanidine **13{3}**

A solution of 4-fluoroaniline (2.800 g, 25.00 mmol) in 10.00 mL of ethanol was cooled in ice. 1.90 mL of nitric acid were added drop by drop under stirring. 4.00 mL of cyanamide (50% in water) were added and the mixture refluxed 21 hours. The solvent was removed *in vacuo*, the resulting precipitate **13{3}** was washed with 50.00 mL of ethanol and dried *in vacuo* over phosphorus pentoxide to afford 3.232 g (15.00 mmol, 61%) of pure *N*-(4-fluorophenyl)guanidine nitrate (**13{3}**) as a purple precipitate.

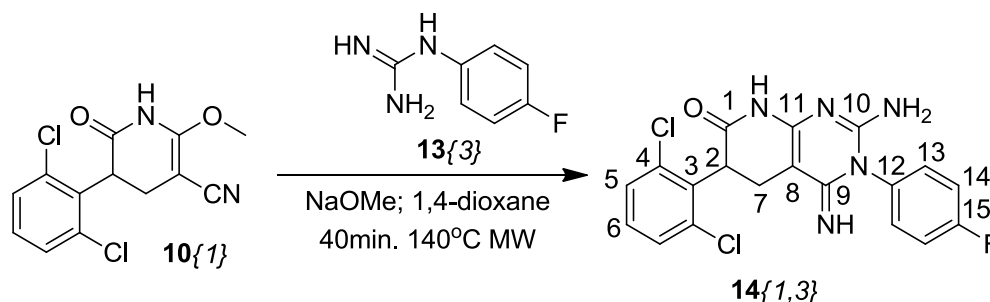
Spectroscopic data

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 9.50 (br s, 1H, NH), 7.34 – 7.26 (m, 8H, C2-H, C3-H, NH, NH<sub>2</sub>, HNO<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 160.7 (d,  $J = 243.8$  Hz, C1), 156.1 (C5), 131.5 (C4), 127.7 (d,  $J = 8.6$  Hz, C3), 116.5 (d,  $J = 22.8$  Hz, C2).

IR (KBr) max (cm<sup>-1</sup>): 3476, 3398, 3337, 3164, 2396, 1676, 1655, 1611, 1595, 1508, 1450, 1384, 1351, 1260, 1216, 1155, 1096, 1015, 970, 883, 839, 824, 796.

Anal. (%) calculated for C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: C 38.89, H 4.20, N 25.92; found: C 39.10, H 4.38, N 25.65.

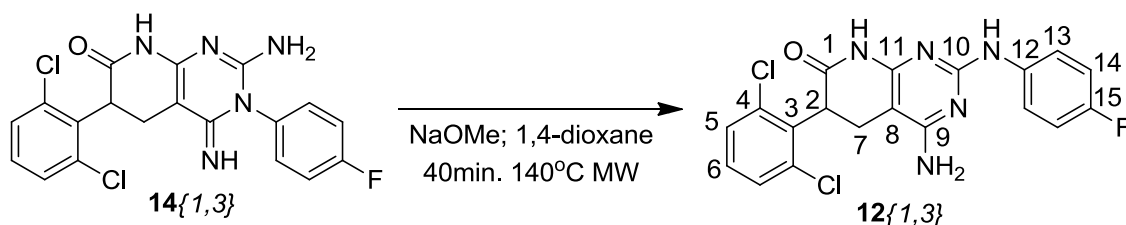
7.2.2 Synthesis of 2-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(4-fluorophenyl)-4-imino-4,5,6,8-tetrahydropyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(3*H*)-one (**14**{1,3})

A mixture of N-(4-fluorophenyl)guanidine nitrate (662.780 mg, 3.06 mmol), sodium methoxide (232.500 mg, 4.31 mmol), and 1,4-dioxane (15.00 mL) was sealed in a 20.00 mL microwave vial and heated at 65°C under microwave irradiation for 15 min. A clear solution with a white precipitate was obtained. The solid was removed by filtration and the mother liquor was transferred to a 20.00 mL microwave vial together with 5-(2,6-dichlorophenyl)-2-methoxy-6-oxopiperidine-3-carbonitrile (302.600 mg, 1.02 mmol). The vial was sealed and heated at 140°C under microwave irradiation for 40 min. The solvent of the red solution obtained was removed *in vacuo*, and the resulting red oil was treated with acetone (10.00 mL) and sonication for 10 min while a white precipitate was formed. The solid was filtered, washed with acetone to afford 687.100 mg (1.64 mmol, 81%) of pure 2-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(4-fluorophenyl)-4-imino-4,5,6,8-tetrahydropyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(3*H*)-one (**14**{1,3}) as a white precipitate.

Spectroscopic data

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 9.90 (br s, 1H, NH), 7.49 (qd,  $J = 8.0, 1.2$  Hz, 2H, C5-H), 7.33 (t,  $J = 8.1$  Hz, 5H, C6-H, C13-H, C14-H), 6.26 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 5.09 (br s, 1H, NH), 4.56 (dd,  $J = 13.4, 9.1$  Hz, 1H, C2-H), 2.81 (dd,  $J = 15.8, 9.2$  Hz, 1H, C7-H), 2.66 (dd,  $J = 15.8, 13.5$  Hz, 1H, C7-H).

$\text{IR}$  (KBr) max ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3224, 1684, 1632, 1595, 1505, 1434, 1383, 1322, 1279, 1254, 1214, 1164, 1086, 1032, 973, 920, 820, 784.

7.2.3 Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-(4-fluoroanilino)-5,8-dihydropyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one (**12**{1,3})

A mixture of 2-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-3-(4-fluorophenyl)-4-imino-4,5,6,8-tetrahydropyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(3*H*)-one (585.600 mg, 1.40 mmol), sodium methoxide (79.600 mg, 1.40 mmol) and methanol (10.00 mL) was sealed in a 20.00 mL microwave vial and heated at 140°C under microwave irradiation for 40 min. The solid obtained was filtered, washed

with water and Et<sub>2</sub>O to afford 87.000 mg (14%) of pure 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-(4-fluoroanilino)-5,8-dihydropyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one (**12**{1,3}) as a white precipitate.

#### Spectroscopic data

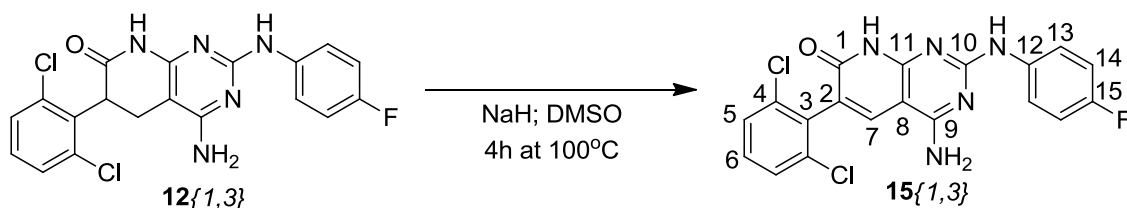
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 10.32 (br s, 1H, NH), 8.80 (br s, 1H, NH), 7.85 – 7.81 (m, 2H, C13-H), 7.54 – 7.49 (m, 2H, C5-H), 7.36 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, C6-H), 6.98 (td, *J* = 7.1, 2.2 Hz, 2H, C14-H), 6.36 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.65 (dd, *J* = 13.1, 8.9 Hz, 1H, C2-H), 2.92 (dd, *J* = 15.8, 8.9 Hz, 1H, C7-H), 2.77 (dd, *J* = 15.7, 13.2 Hz, 1H, C7-H).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 169.4 (C1), 161.4 (C11), 158.2 (C10), 156.5 (d, *J* = 236.7 Hz, C15), 155.7 (C9), 137.9 (C12), 135.6 (C3), 135.0 (C4), 129.8 (C6), 128.3 (C5), 119.7 (d, *J* = 7.3 Hz, C13), 114.5 (d, *J* = 21.6 Hz, C14), 84.3 (C8), 43.2 (C2), 23.4 (C7).

IR (KBr) max (cm<sup>-1</sup>): 3492, 3395, 3287, 3212, 3149, 3097, 2924, 1680, 1638, 1616, 1581, 1555, 1506, 1477, 1435, 1380, 1317, 1289, 1245, 1209, 1159, 1129, 1082, 919, 833, 815, 780.

Anal. (%) calculated for C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>5</sub>O: C 54.56, H 3.37, N 16.74; found: C 54.78, H 3.29, N 16.53.

#### 7.2.4 Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-(4-fluoroanilino)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (**15**{1,3})



A mixture of 209.100 mg (0.50 mmol) of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-(4-fluoroanilino)-5,8-dihydropyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one and 60.000 mg (1.50 mmol) of sodium hydride (NaH) (60% dispersion in mineral oil) in 5.00 mL of anhydrous DMSO was heated for 4h at 100°C protected from moisture. The resulting solution was cooled, water (300.00 mL) was added and the resulting solution was neutralized with AcOH. The resulting precipitate was filtered, washed with EtOH and Et<sub>2</sub>O and dried *in vacuo* over phosphorus pentoxide to afford 163.100 mg (0.39 mmol, 78%) of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-(4-fluoroanilino)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (**15**{1,3}) as a brownish precipitate.

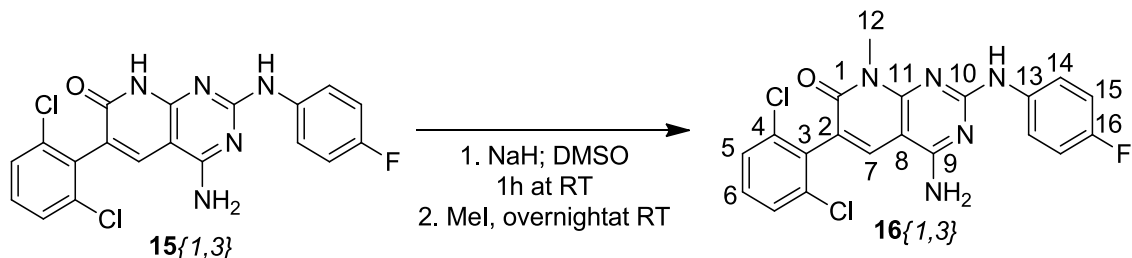
#### Spectroscopic data

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 11.85 (br s, 1H, NH), 9.32 (br s, 1H, NH), 8.05 (s, 1H, C7-H), 7.90 (ddd, *J* = 7.2, 5.1, 2.1 Hz, 2H, C13-H), 7.57 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, C5-H), 7.43 (dd, *J* = 8.7, 7.5 Hz, 1H, C6-H), 7.31 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.07 (td, *J* = 8.9, 6.7 Hz, 2H, C14-H).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 161.3 (C1), 161.1 (C11), 159.4 (C10), 158.3 (d, *J* = 238.3 Hz, C15), 156.1 (C9), 136.9 (C12), 135.5 (C7), 135.4 (C4), 135.0 (C3), 130.3 (C6), 128.0 (C5), 121.6 (C2), 121.1 (d, *J* = 7.5 Hz, C13), 114.7 (d, *J* = 21.9 Hz, C14), 91.3 (C8).

IR (KBr) max (cm<sup>-1</sup>): 3409, 3217, 2925, 1615, 1572, 1532, 1508, 1448, 1311, 1261, 1217, 1154, 1095, 889, 833, 799.

### 7.2.5 Synthesis of 4-amino-2-(4-fluoroanilino)-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methylpyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (C69) (**16**{1,3})



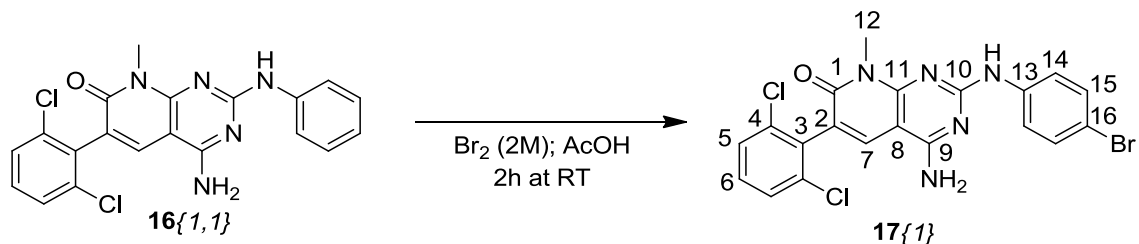
10.000 mg (0.25 mmol) of sodium hydride (NaH) (60% dispersion in mineral oil) were added to a solution of 104.060 mg (0.25 mmol) of 44-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-(4-fluoroanilino)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one in 3.60 mL of anhydrous DMSO, and the mixture was stirred for 1h at rt under nitrogen atmosphere. After this period, 15.60  $\mu$ L (0.25 mmol) of methyl iodide were added dropwise and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched by addition of 300.00 mL of water and the resulting precipitate was filtered, washed with water and dried *in vacuo* over phosphorus pentoxide. The product was purified by flash chromatography (silica, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH; 100:0 to 90:10 in 18 min) to afford 37.300 mg (0.087 mmol, 35%) of 4-amino-2-(4-fluoroanilino)-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methylpyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (**16**{1,3}) as an off-white precipitate.

#### Spectroscopic data

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 9.47 (br s, 1H, NH), 8.10 (s, 1H, C7-H), 7.83 (td, *J* = 7.2, 5.1 Hz, 2H, C14-H), 7.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, C5-H), 7.44 (dd, *J* = 7.5, 8.7 Hz, 1H, C6-H), 7.41 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.13 (td, *J* = 2.2, 9.0, 2H, C15-H), 3.59 (s, 3H, C12-H).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 161.7 (C9), 160.5 (C1), 159.0 (C10), 157.3 (d, *J* = 238.5 Hz, C16), 156.0 (C11), 136.8 (C13), 135.4 (C4), 135.3 (C3), 134.0 (C7), 130.3 (C6), 128.1 (C5), 121.3 (d, *J* = 7.7 Hz, C14), 120.1 (C2), 114.9 (d, *J* = 22.1 Hz, C15), 91.3 (C8), 28.4 (C12).

HRMS calcd for C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>5</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 412.0732; found: 412.0726.

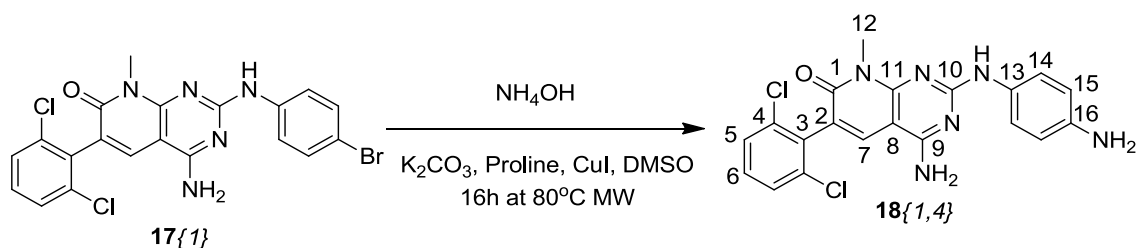
7.2.6 Synthesis of 4-amino-2-(4-bromoanilino)-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methylpyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (**17**{1})

A dispersion of 412.300 mg (1.00 mmol) of C16/PB1 in 40.00 mL of acetic acid was treated with 0.50 mL (1.00 mmol) of 2 M bromine in acetic acid for 2 h at rt. The resulting solution was diluted with 1,4-dioxane (40.00 mL) and the solvent was removed by vacuum azeotropic distillation. A second 1,4-dioxane addition (40.00 mL) and vacuum distillation yields a white solid that is dispersed in water with ultrasounds and mechanical stirring. The resulting precipitate was filtered, washed with water and dried *in vacuo* over phosphorus pentoxide to afford 490.200 mg (0.50 mmol, 100%) of 18 as a white solid **17**{1}. m.p. = 267-269°C.

Spectroscopic data

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 9.67 (br s, 1H, NH), 8.14 (s, 1H, C7-H), 7.82 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, C14-H), 7.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, C5-H), 7.57 (br s, 2H, C6-H), 7.51-7.37 (m, 4H, C15-H, NH<sub>2</sub>), 3.61 (s, 3H, C12-H).

Spectroscopy data were identical with those reported in the literature<sup>137</sup>.

7.2.7 Synthesis of 4-amino-2-(4-aminoanilino)-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methylpyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (**18**{1,4})

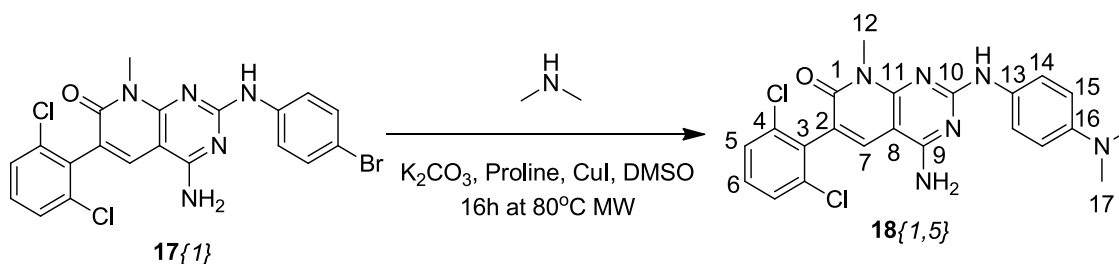
A mixture of 98.200 mg (0.2 mmol) of 4-amino-2-(4-bromoanilino)-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methylpyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one, 0.26 mL (3.91 mmol) of ammonium hydroxide, 38.000 mg (0.2 mmol) of copper iodide, 46.000 mg (0.40 mmol) of L-proline and 82.700 mg (0.60 mmol) of potassium carbonate in 2.30 mL of dimethyl sulfoxide was sealed in a 20.00 mL microwave vial and heated for 16 hours at 80°C under microwave irradiation. 300.00 mL of water were added and the resulting precipitate was filtered, washed with water and dried *in vacuo* over phosphorous pentoxide. Finally, the precipitate was purified by flash chromatography (silica, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH; 100:0 to 90:10 in 18 min) to afford 59.700 mg (0.14 mmol, 70%) 4-amino-2-(4-aminoanilino)-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methylpyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (**18**{1,4}) as a white precipitate.

Spectroscopic data

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 8.97 (br s, 1H, NH), 8.04 (s, 1H, C7-H), 7.57 (d,  $J = 0.52$  Hz, 2H, C5-H), 7.37 – 7.44 (br m, 3H, C6-H, C14-H), 7.23 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 6.52 (d,  $J = 8.56$  Hz, 2H, C15-H), 4.78 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3.54 (s, 3H, C12-H).

Spectroscopy data were identical with those reported in the literature<sup>179</sup>.

### 7.2.8 Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-[[4-(dimethylamino)phenyl]amino]-8-methyl-7H,8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (**18**{1,5})



A mixture of 98.200 mg (0.20 mmol) of 4-amino-2-(4-bromoanilino)-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methylpyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-one, 1.955 mL (3.91 mmol) of the amine in a solution of tetrahydrofuran 2 M, 38.000 mg (0.20 mmol) of copper iodide, 46.000 mg (0.40 mmol) of L-proline and 31.700 mg (0.23 mmol) of potassium carbonate in 2.30 mL of dimethyl sulfoxide was sealed in a 20.00 mL microwave vial and heated for 16 hours at 80°C under microwave irradiation. The tetrahydrofuran was removed under reduced pressure and the resulting solution was washed with 300.00 mL of water. The resulting precipitate was filtered, washed with water and dried *in vacuo* over phosphorous pentoxide. Finally, the product was purified by flash chromatography (silica,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH; 100:0 to 90:10 in 18 min) to afford 36.000 mg (0.08 mmol, 40%) 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-2-[[4-(dimethylamino)phenyl]amino]-8-methyl-7H,8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (**18**{1,5}) as a yellow precipitate.

Spectroscopic data

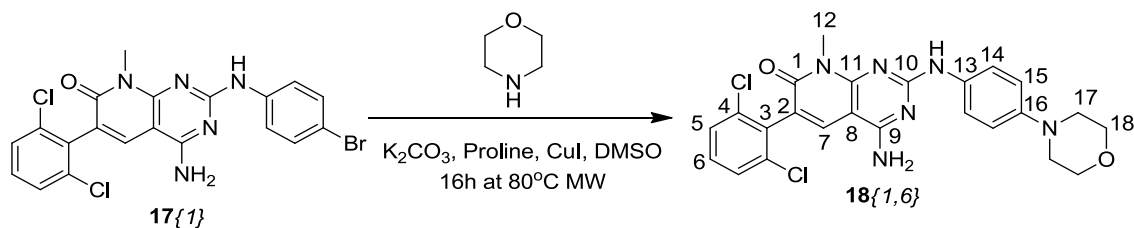
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 9.12 (s, 1H, NH), 8.05 (s, 1H, C7-H), 7.52 – 7.62 (m, 4H, C5-H, C14-H), 7.43 (dd,  $J = 7.48, 8.68$  Hz, 1H, C6-H), 7.26 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 6.71 (dd,  $J = 3.4, 9.16$  Hz, 2H, C15-H), 3.57 (s, 3H, C12-H), 2.85 (s, 6H, C17-H).

$^{13}\text{C NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 161.6 (C9), 160.6 (C1), 159.2 (C10), 156.2 (C11), 146.4 (C16), 135.5 (C4), 135.5 (3), 134.0 (C7), 130.2 (C6), 130.1 (C13), 128.0 (C5), 121.4 (C14), 119.3 (C2), 112.8 (C15), 91.3 (C8), 40.7 (C17), 28.3 (C12).

$\text{IR}$  (KBr) max ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3331, 3193, 2793, 1631, 1575, 1556, 1515, 1462, 1426, 1338, 1304, 1238, 1190, 1164, 1010, 946, 817, 800.

$\text{HRMS}$  calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ : 455.34; found: 455.11.

$\text{Anal.}$  (%) calculated for  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}$ : C 58.03, H 4.44, N 18.46; found: C 57.72, H 4.58, N 18.56.

7.2.9 Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methyl-2-[[4-(morpholin-4-yl)phenyl]amino]-7H,8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (**18**{1,6})

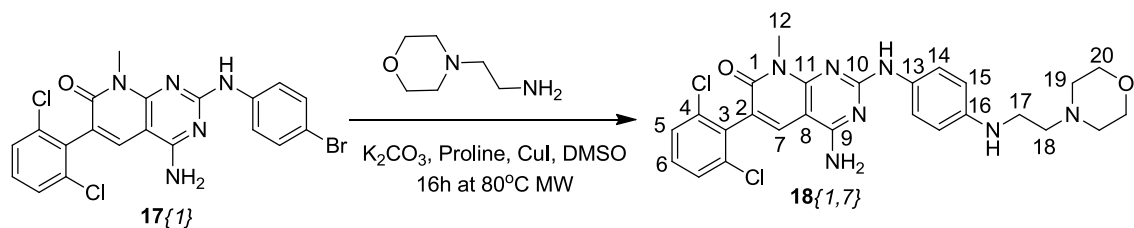
A mixture of 98.200 mg (0.20 mmol) of 4-amino-2-(4-bromoanilino)-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methylpyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-one, 344.080 mg (3.91 mmol) of amine, 38.000 mg (0.20 mmol) of copper iodide, 46.000 mg (0.40 mmol) of L-proline and 31.700 mg (0.23 mmol) of potassium carbonate in 2.30 mL of dimethyl sulfoxide was sealed in a 20.00 mL microwave vial and heated for 16 hours at 80°C under microwave irradiation. The tetrahydrofuran was removed under reduced pressure and the resulting solution was washed with 300.00 mL of water. The resulting precipitate was filtered, washed with water and dried *in vacuo* over phosphorous pentoxide. Finally, the product was purified by flash chromatography (silica, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH; 100:0 to 90:10 in 18 min) to afford 49.500 mg (0.11 mmol, 55%) 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methyl-2-[[4-(morpholin-4-yl)phenyl]amino]-7H,8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (**18**{1,6}) as a yellow precipitate.

Spectroscopic data

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 9.22 (br s, 1H, NH), 8.07 (s, 1H, C7-H), 7.66 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, C14-H), 7.57 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, C5-H), 7.43 (dd, *J* = 7.5, 8.68 Hz, 1H, C6-H), 7.30 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.90 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, C15-H), 3.74 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H, C18-H), 3.58 (s, 3H, C12-H), 3.05 (t, *J* = 4.7 Hz, 4H, C17-H).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 161.6 (C9), 160.5 (C1), 159.1 (C10), 156.1 (C11), 146.4 (C16), 135.4 (C3), 135.4 (C4), 134.0 (C7), 132.6 (C13), 130.2 (C6), 128.0 (C5), 120.9 (C14), 119.5 (C2), 115.5 (C15), 91.4 (C8), 66.2 (C18), 49.2 (C17), 28.3 (C12).

IR (KBr) max (cm<sup>-1</sup>): 3412, 2955, 2852, 1635, 1575, 1557, 1511, 1464, 1421, 1298, 1262, 1227, 1191, 1113, 1067, 1010, 921, 824, 800.

7.2.10 Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methyl-2-[[4-[[2-(morpholin-4-yl)ethyl]amino]phenyl]amino]-7H,8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (**18**{1,7})

A mixture of 98.200 mg (0.20 mmol) of 4-amino-2-(4-bromoanilino)-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methylpyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-one, 46.000 mg (0.40 mmol) of L-proline, 38.000 mg (0.20

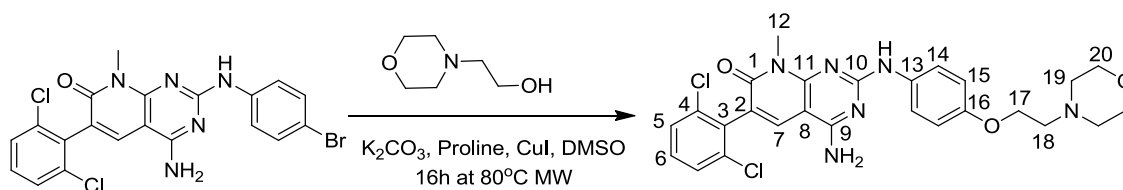
mmol) of copper iodide, 31.700 mg (0.23 mmol) of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 513.15 mL (3.91 mmol) of 4-(aminoethyl)morpholine in 2.30 mL of DMSO was heated under microwave irradiation for 16 h at 80°C. The resulting solution was cooled and water (400.00 mL) was added. The resulting precipitate was filtered, washed with water and dried *in vacuo* over phosphorus pentoxide to afford 82.900 mg (0.15 mmol, 77%) of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methyl-2-[(4-[(2-(morpholin-4-yl)ethyl)amino]phenyl)amino]-7*H*,8*H*-pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-one (**18**{1,7}) as a slightly brownish solid.

#### Spectroscopic data

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 9.02 (br s, 1H, NH), 8.04 (s, 1H, C7-H), 7.56 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, C5-H), 7.47 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, C14-H), 7.42 (dd, *J* = 7.5, 8.6 Hz, 1H, C6-H), 7.24 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.55 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, C15-H), 5.13 (br t, *J* = 5.6 Hz, 2H, NH), 3.59 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H, C20-H), 3.55 (s, 3H, C12-H), 3.11 (dd, *J* = 6.3, 12.5 Hz, 2H, C17-H), 2.42 (dd, *J* = 6.2, 12.6 Hz, 2H, C18-H), 2.41 (t, *J* = 4.2 Hz, 1H, C19-H).

Spectroscopy data were identical with those reported in the literature<sup>137</sup>.

#### 7.2.11 Synthesis of 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methyl-2-({4-[2-(morpholin-4-yl)ethoxy]phenyl}amino)-7*H*,8*H*-pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-one (**18**{1,8})



A mixture of 98.200 mg (0.20 mmol) of 4-amino-2-(4-bromoanilino)-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methylpyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one, 38.000 mg (0.20 mmol) of copper iodide, 128.000 mg (0.40 mmol) of Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 1.25 mL (8.80 mmol) of 4-(2-hydroxyethyl)morpholine was heated under microwave irradiation for 18 h at 180°C. The resulting solution was cooled and water (400.00 mL) was added. The resulting precipitate was filtered, washed with water and dried *in vacuo* over phosphorus pentoxide. The residue was purified by flash chromatography (silica, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH; 100:0 to 90:10 in 18 min) to afford 18.90 mg (0.036 mmol, 18%) 4-amino-6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methyl-2-({4-[2-(morpholin-4-yl)ethoxy]phenyl}amino)-7*H*,8*H*-pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-one (**18**{1,8}) as a white solid.

#### Spectroscopic data

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 9.27 (br s, 1H, NH), 8.08 (s, 1H, C7-H), 7.70 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, C14-H), 7.58 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, C5-H), 7.43 (dd, *J* = 7.5, 8.7 Hz, 1H, C6-H), 7.33 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.89 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, C15-H), 4.06 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, C17-H), 3.58 (t, *J* = 4.8 Hz, 7H, C12-H, C20-H), 2.68 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, C18-H), 2.46 – 2.48 (m, *J* = 4.4 Hz, 4H, C19-H).

Spectroscopy data were identical with those reported in the literature<sup>137</sup>.



To simplify the presentation and discussion of the results, those compounds subjected to biological studies will be referred according to the following nomenclature (Table 53):

*Table 53: Correlation between the systematic nomenclature and the nomenclature used in the document.*

Systematic nomenclature	Document nomenclature
<b>18{1,1}</b>	C3
<b>16{1,1}</b>	C16
<b>16{1,3}</b>	C69
<b>18{1,4}</b>	C70
<b>18{1,5}</b>	C71
<b>18{1,6}</b>	C72
<b>18{1,7}</b>	C73
<b>18{1,8}</b>	C74

# ANEXO



## 8 Anexo

### 8.1 Tablas y gráficas

## ANEXO

Tabla 54: Actividad residual de cada una de las proteínas en presencia de los compuestos sintetizados. El código de colores indica la actividad residual de la proteína con el compuesto estudiado: entre el 80-100% blanco; entre el 60-80% (rojo), entre el 20-60% (amarillo) e inferior al 20% (verde).

Compuesto	ALK C1156Y (GST-HIS-tag)	ALK F1174L (GST-HIS-tag)	ALK F1174S (GST-HIS-tag)	ALK L1196M (GST-HIS-tag)	ALK R1275Q (GST-HIS-tag)	ALK wt (GST- HIS-tag)	AXL	DDR2	EGF-R L858R	EGF-R T790M	EGF-R T790M/L858R	EPHA2	ERBB2	ERBB4
IQS20121018.01	104	115	101	122	102	92	92	102	94	120	97	102	88	109
IQS20121018.02	113	143	114	102	82	90	97	101	103	131	109	101	91	100
IQS20121018.03	92	108	107	105	99	85	102	103	110	110	118	86	85	106
IQS20120917.03	56	53	63	42	78	51	93	104	79	55	61	60	85	64
IQS20121018.04	93	86	93	74	81	86	92	105	87	84	81	88	85	83
IQS20121018.05	66	59	52	64	33	37	69	95	70	65	60	57	69	63
IQS20121018.06	27	23	28	17	20	13	50	92	57	49	46	42	66	44
IQS20121018.07	10	6	11	3	4	4	23	73	43	30	34	19	34	29
IQS20121018.08	107	99	102	113	94	131	105	100	119	94	83	101	72	80
IQS20121018.09	33	31	32	26	24	19	61	102	65	56	37	31	55	54
IQS20121018.10	29	24	26	14	14	11	53	80	42	39	31	9	54	39
IQS20121018.11	12	14	23	9	9	6	41	73	43	37	25	15	51	24
IQS20121018.12	120	126	103	124	97	120	99	93	122	106	103	99	96	94
IQS20121018.13	52	39	42	33	27	28	57	97	77	61	48	40	66	62
IQS20121018.14	19	17	16	11	9	7	39	72	47	40	35	24	53	33
IQS20121018.15	10	10	14	4	4	4	25	72	36	30	31	18	40	22
IQS20121018.16	22	21	26	18	18	16	56	94	57	46	41	37	78	50
IQS20121018.17	60	59	73	58	53	74	84	96	67	56	52	61	84	64
IQS20120723.03	14	14	22	10	10	9	39	98	38	39	31	21	49	30
IQS20121018.18	47	43	56	27	41	34	73	111	74	53	37	35	83	46
IQS20121018.19	103	85	99	93	79	91	86	102	111	88	77	89	104	97
IQS20121018.20	13	15	22	7	9	10	32	97	51	42	36	24	54	34
IQS20121018.21	93	100	93	159	83	100	85	81	104	90	88	83	94	86
IQS20121018.22	28	22	46	29	27	22	56	92	54	44	48	33	71	46
IQS20120917.02	12	12	20	8	8	8	33	83	40	35	37	27	46	36
IQS20121018.23	87	77	87	94	76	85	90	96	76	77	103	85	91	100
IQS20121018.24	97	110	106	105	79	120	98	98	114	110	107	77	92	100
IQS20121018.25	87	89	106	111	66	94	86	85	87	91	103	76	86	97
IQS20120709.02	47	58	58	33	51	69	52	-1	15	30	28	1	46	8
IQS20100713.06	60	82	92	117	81	113	83	31	58	56	50	12	85	69

ANEXO

Compuesto	ALK C1156Y (GST-HIS-tag)	ALK F1174L (GST-HIS-tag)	ALK F1174S (GST-HIS-tag)	ALK L1196M (GST-HIS-tag)	ALK R1275Q (GST-HIS-tag)	ALK wt (GST- HIS-tag)	AXL	DDR2	EGF-R L858R	EGF-R T790M	EGF-R T790M/L858R	EPHA2	ERBB2	ERBB4
IQS20110330.01	28	37	43	20	25	22	63	10	24	45	34	24	37	21
IQS20110330.02	27	23	29	20	22	17	57	17	13	36	28	15	44	22
IQS20110330.03	83	64	69	103	49	70	84	91	78	79	66	60	85	81
IQS20121018.26	97	96	81	93	82	71	94	45	76	93	86	73	58	77
IQS20121018.27	31	27	34	23	38	35	53	66	56	49	47	39	69	64
IQS20110125.05	83	78	89	71	87	79	107	72	87	80	105	97	79	91
IQS20121018.28	76	77	88	102	69	87	75	29	63	99	107	73	61	70
IQS20110125.04	51	52	57	35	32	62	111	19	33	62	53	20	52	35
IQS20110125.03	63	66	63	73	56	78	90	4	19	36	37	16	42	16
IQS20110125.01	13	10	14	7	7	9	32	24	21	31	22	7	41	16
IQS20110125.02	32	36	44	38	25	31	62	2	14	48	29	6	41	17
IQS20121018.29	27	26	34	18	15	17	51	6	18	51	35	12	54	29
IQS20121018.30	41	41	53	42	49	56	72	83	50	43	36	28	66	39
IQS20121018.31	58	40	54	47	51	37	81	12	33	52	40	22	78	46
IQS20120328.01	28	25	36	19	18	19	51	1	16	37	29	4	37	15
IQS20100713.05	36	60	65	46	70	106	90	4	19	56	55	0	84	50
IQS20121018.32	23	28	25	22	18	18	40	0	14	36	31	0	40	21
IQS20121018.33	51	71	76	47	46	99	74	0	12	31	34	0	50	13
IQS20121018.34	62	50	74	69	57	85	80	85	42	60	68	30	84	63
IQS20121018.35	78	76	95	92	75	124	76	107	76	87	88	63	96	62
IQS20120723.04	122	92	85	115	87	102	77	47	101	60	68	60	94	59
IQS20100713.09	47	67	72	42	39	42	78	77	110	94	83	124	85	111
IQS20121018.36	98	113	118	97	106	91	98	100	102	87	105	112	93	112
IQS20100713.10	35	60	78	37	35	43	62	84	69	62	66	75	68	68
IQS20100713.07	112	81	107	107	59	94	90	64	72	69	86	51	86	89
IQS20100713.01	130	98	114	82	92	135	102	3	44	84	93	3	66	60
IQS20121018.37	102	91	72	90	72	129	106	95	53	99	110	84	98	102
IQS20121018.38	119	122	87	85	67	130	97	103	103	86	117	94	91	91
IQS20121018.39	107	99	85	132	90	113	94	97	92	105	111	118	93	111
IQS20121018.40	71	98	78	102	97	136	91	115	92	74	98	63	88	73

ANEXO

Compuesto	FGF-R1 wt	FGF-R2	FGF-R3 wt	FGF-R4	IGF1-R	MET wt	MKNK1	MKNK2	RET wt	ROS	VEGF-R1	VEGF-R2	VEGF-R3
IQS20121018.01	93	99	119	100	107	99	90	100	133	106	87	100	115
IQS20121018.02	106	90	121	102	113	102	94	100	88	104	118	102	119
IQS20121018.03	104	97	114	103	114	101	92	91	159	104	81	101	109
IQS20120917.03	71	60	80	61	39	89	71	79	59	102	88	61	90
IQS20121018.04	93	77	101	86	85	94	99	91	161	102	77	82	104
IQS20121018.05	61	45	78	49	44	84	60	89	67	86	76	50	85
IQS20121018.06	41	41	48	33	19	73	58	56	55	85	47	26	69
IQS20121018.07	12	3	31	20	6	47	91	116	23	70	19	8	40
IQS20121018.08	102	72	130	76	83	97	73	85	107	105	103	82	105
IQS20121018.09	38	24	49	42	21	75	40	67	57	86	45	35	78
IQS20121018.10	15	10	46	36	15	65	35	56	45	58	40	29	67
IQS20121018.11	14	13	37	34	16	60	72	89	36	66	49	26	57
IQS20121018.12	99	78	139	90	102	95	74	92	106	89	86	94	105
IQS20121018.13	40	34	76	49	30	74	60	88	59	79	61	38	76
IQS20121018.14	16	18	36	36	23	55	31	70	35	61	49	33	69
IQS20121018.15	13	9	30	20	8	52	84	111	26	53	24	9	46
IQS20121018.16	39	42	45	45	25	76	63	80	72	93	48	33	67
IQS20121018.17	80	68	75	58	56	95	87	92	79	99	68	65	78
IQS20120723.03	18	10	41	30	12	77	101	94	37	78	37	18	51
IQS20121018.18	65	47	57	38	22	86	76	69	60	92	53	36	68
IQS20121018.19	88	82	114	66	76	94	76	111	94	84	85	74	85
IQS20121018.20	22	9	35	28	16	75	116	110	33	64	31	17	52
IQS20121018.21	100	73	134	70	85	92	81	97	102	73	87	77	98
IQS20121018.22	51	21	59	45	21	81	91	96	22	81	49	43	64
IQS20120917.02	18	11	17	30	15	66	115	100	35	51	45	11	56
IQS20121018.23	97	86	97	88	108	94	90	92	102	69	92	84	106
IQS20121018.24	95	86	120	88	110	95	94	90	95	90	97	84	116
IQS20121018.25	106	81	117	87	106	96	84	93	88	81	97	82	116
IQS20120709.02	1	1	2	10	47	39	94	85	1	54	13	2	20
IQS20100713.06	45	37	37	64	77	96	80	70	30	75	69	51	69
IQS20110330.01	40	34	53	54	57	65	125	119	51	77	63	52	91
IQS20110330.02	32	24	42	47	25	74	86	96	57	87	52	38	70
IQS20110330.03	76	64	76	65	59	81	96	119	79	100	79	66	94
IQS20121018.26	98	85	95	96	104	84	95	101	107	83	92	99	100
IQS20121018.27	48	33	56	50	32	69	81	86	83	92	57	48	66

ANEXO

Compuesto	FGF-R1 wt	FGF-R2	FGF-R3 wt	FGF-R4	IGF1-R	MET wt	MKNK1	MKNK2	RET wt	ROS	VEGF-R1	VEGF-R2	VEGF-R3
IQS20110125.05	99	75	103	87	98	82	85	99	75	94	86	90	100
IQS20121018.28	91	69	130	81	103	84	85	103	69	78	99	78	88
IQS20110125.04	65	35	71	66	62	73	45	69	31	87	78	44	62
IQS20110125.03	95	55	71	75	69	75	108	117	73	92	82	61	108
IQS20110125.01	11	9	34	28	15	51	26	56	23	41	39	18	40
IQS20110125.02	37	37	53	65	36	85	105	106	65	90	66	63	86
IQS20121018.29	34	23	56	43	33	69	99	76	58	73	54	37	66
IQS20121018.30	38	31	90	73	56	95	103	120	85	93	65	42	61
IQS20121018.31	61	53	62	56	35	77	89	75	76	85	64	48	84
IQS20120328.01	31	24	38	54	24	73	76	101	43	77	56	39	66
IQS20100713.05	46	30	19	40	44	78	84	107	14	95	31	8	53
IQS20121018.32	-2	0	8	26	21	62	83	84	2	62	15	2	32
IQS20121018.33	8	4	8	32	79	45	93	104	3	76	19	3	29
IQS20121018.34	61	50	64	59	65	99	80	92	52	93	60	43	80
IQS20121018.35	73	55	78	91	78	89	84	81	89	101	102	69	82
IQS20120723.04	83	55	130	95	71	93	98	103	99	93	100	70	101
IQS20100713.09	52	52	90	87	65	62	42	84	86	59	65	50	110
IQS20121018.36	112	88	145	106	104	88	99	109	117	86	90	93	92
IQS20100713.10	43	55	83	60	65	69	47	72	69	70	64	44	80
IQS20100713.07	88	47	100	76	76	85	81	99	75	85	81	82	88
IQS20100713.01	31	30	56	89	92	86	85	97	39	79	78	57	102
IQS20121018.37	101	77	103	105	97	94	88	109	91	85	93	88	101
IQS20121018.38	108	72	95	99	106	85	69	88	73	87	95	86	99
IQS20121018.39	260	91	95	100	94	97	122	118	93	86	89	84	86
IQS20121018.40	469	55	86	80	87	80	76	83	94	87	71	70	99



ANEXO

Tabla 55: Líneas celulares con su clasificación histológica, perfil mutacional e IC<sub>50</sub> de PB1.

Línea celular	Clasificación histológica	Perfil mutacional	IC <sub>50</sub> (μM)
435S	Adenocarcinoma de mama	Amplificación de HER2	1,00 ± 0,10
A431	Carcinoma escamoso de piel	Translocación y mutación G2032R de HER2	1,35 ± 0,45
A549	Adenocarcinoma bronquioalveolar	G12S de KRAS	0,43 ± 0,05
BxPC-3	Adenocarcinoma pancreático	KRAS wt	1,80 ± 0,20
Calu-6	Carcinoma anaplásico	Q61K de KRAS	0,72 ± 0,14
BaF3 pBABE	Linfocitos transfectados	CD74-ROS1	2,10 ± 0,23
BaF3 pMIG	Linfocitos transfectados	CD74-ROS1 (G2032R)	2,63 ± 0,78
DLD1	Adenocarcinoma colorrectal	Adenocarcinoma colorrectal	1,00 ± 0,10
EBC-1	Carcinoma escamoso pulmonar	Carcinoma escamoso pulmonar	5,10 ± 0,15
FaDu	Carcinoma escamoso de faringe	Carcinoma escamoso de faringe	4,85 ± 2,23
H1118	Adenocarcinoma pulmonar	L858R de EGFR	4,90 ± 0,70
H1568	Adenocarcinoma pulmonar	CD74-NRG1	2,43 ± 0,18
H1650	Adenocarcinoma pulmonar	Deleción 15 pares de bases del exón 21 de EGFR	2,68 ± 0,66
H1703	Carcinoma escamosos de pulmón	DDR2 wt	0,55 ± 0,15
H1975	Carcinoma escamoso pulmonar	DDR2 wt	2,07 ± 0,20
H2228	Adenocarcinoma pulmonar	T790M del exón 20 de EGFR	1,59 ± 0,29
H2286	Adenocarcinoma pulmonar	EML4-ALK	0,05 ± 0,01
H2286-DR	Carcinoma escamoso pulmonar	I638F de DDR2	0,66 ± 0,17
H23	Carcinoma escamoso pulmonar	I638F de DDR2	1,13 ± 0,33
H3122	Adenocarcinoma pulmonar	EML4-ALK	1,28 ± 0,27
H3122-CR1	Adenocarcinoma pulmonar	EML4-ALK	0,68 ± 0,27
H3122-CR3	Adenocarcinoma pulmonar	EML4-ALK	8,88 ± 4,92

## ANEXO

Línea celular	Clasificación histológica	Perfil mutacional	IC <sub>50</sub> (μM)
H3122-CR4	Adenocarcinoma pulmonar	EML4-ALK	10,04 ± 2,04
H322	Carcinoma bronquioalveolar	CD74-NRG1	4,35 ± 0,45
H460	Carcinoma escamoso pulmonar	DDR2 wt	1,00 ± 0,28
H520	Adenocarcinoma pulmonar	CD74-NRG1	0,35 ± 0,15
HCC366	Carcinoma adenoescamoso pulmonar	L239R de DDR2	0,83 ± 0,26
HCC366-DR	Carcinoma adenoescamoso pulmonar	L239R de DDR2	5,92 ± 0,76
HCC78	Adenocarcinoma pulmonar	ROS1-SLC34A2	0,92 ± 0,11
HCCT116	Adenocarcinoma colorrectal	G13D de KRAS	1,97 ± 0,01
HT29	Adenocarcinoma colorrectal	V600E de BRAF	2,00 ± 0,31
NIH3T3 (I638F)	Fibroblastos transfectados	I638F en DDR2	0,10 ± 0,02
NIH3T3 (I638F+T654M)	Fibroblastos transfectados	I638F y T654M en DDR2	0,77 ± 0,14
NIH3T3 (L239R)	Fibroblastos transfectados	L239R en DDR2	0,75 ± 0,05
NIH3T3 (L239R+T654M)	Fibroblastos transfectados	L239R y T654M en DDR2	0,60 ± 0,19
MDA-MB-231	Adenocarcinoma triple negativo de mama	Mutación G13D de KRAS y mutación G464V de BRAF	2,11 ± 0,01
MiaPaCa	Adenocarcinoma de páncreas	Mutación G12C de KRAS	1,24 ± 0,01
PC3	Adenocarcinoma próstata	DDR2 wt	3,48 ± 0,08
PC9	Adenocarcinoma pulmonar	Deleción 15 pares de bases del exón 21 de EGFR	1,67 ± 0,97
PC9-ER	Adenocarcinoma pulmonar	Deleción de 15 pares de bases del exón 21 de EGFR. Sobreexpresión de AXL	1,18 ± 0,44
PC9-GR1	Adenocarcinoma pulmonar	Deleción de 15 pares de bases del exón 21 y T790M en el exón 20 de EGFR. Activación de MET	1,45 ± 0,13
PC9-GR2	Adenocarcinoma pulmonar	Deleción de 15 pares de bases del exón 21 de EGFR. Sobreexpresión de AXL. Activación de MET	2,16 ± 0,35
PC9-GR3	Adenocarcinoma pulmonar	Deleción de 15 pares de bases del exón 21 de EGFR. Sobreexpresión de AXL	0,88 ± 0,10

ANEXO

Línea celular	Clasificación histológica	Perfil mutacional	IC <sub>50</sub> (μM)
PC9-GR4	Adenocarcinoma pulmonar	Deleción de 15 pares de bases del exón 21 y T790M en el exón 20 de EGFR. Sobreexpresión de AXL	2,10 ± 0,60
PC9-GR5	Adenocarcinoma pulmonar	Deleción de 15 pares de bases del exón 21 de EGFR. Sobreexpresión de AXL. Sobreexpresión de FGFR1.	1,61 ± 0,16
SCC4	Carcinoma escamoso de lengua	DDR2 wt	0,58 ± 0,15
SCC9	Carcinoma escamoso de lengua	DDR2 wt	4,35 ± 1,05
SK-MES-1	Carcinoma escamoso pulmonar	DDR2 wt	0,57 ± 0,04
SNU-1	Carcinoma gástrico	Mutación A400V de BRAF	>25 ± 3,52
SU-DHL-1	Linfoma de célula larga	ALK-NPM1	0,97 ± 0,72
SW48	Adenocarcinoma colorrectal	G719S de EGFR	0,75 ± 0,15
U118MG	Glioblastoma	FIG-ROS1	2,60 ± 0,68
UACC903	Melanocitos	V600E de BRAF	3,35 ± 0,25
WM793	Melanocitos	V600E de BRAF	1,60 ± 0,37

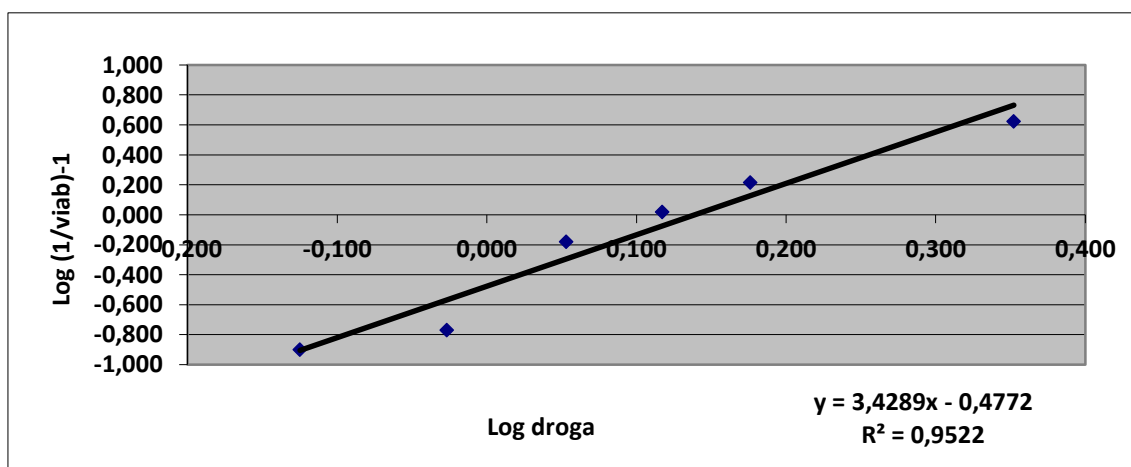


Figura 67: IC<sub>50</sub> de PB1 en H1975.

ANEXO

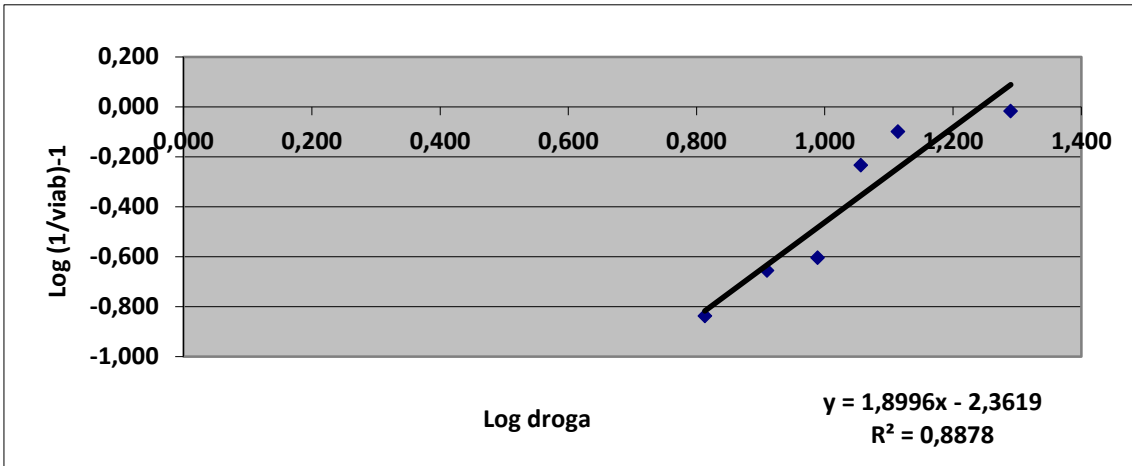


Figura 68: IC<sub>50</sub> de gefitinib en H1975.

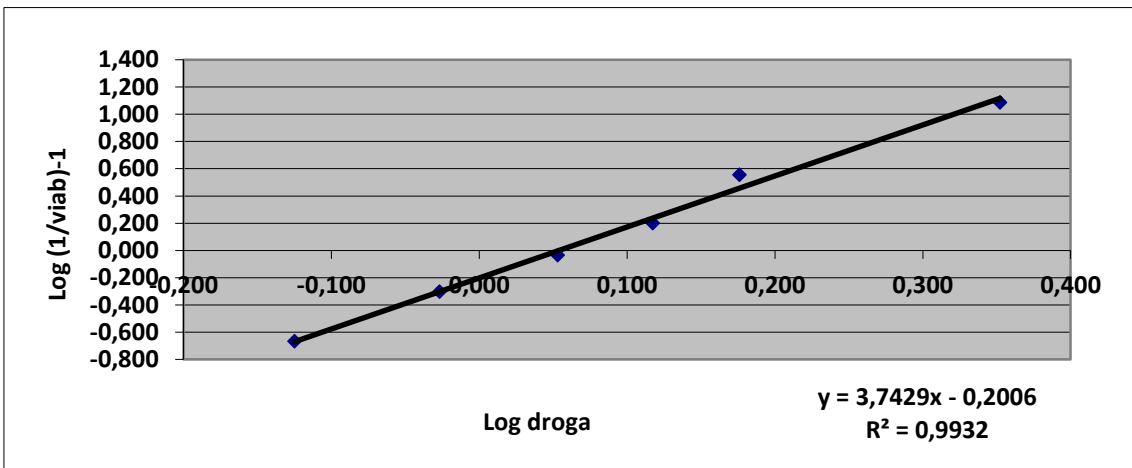


Figura 69: Combinación de PB1 con gefitinib en H1975.

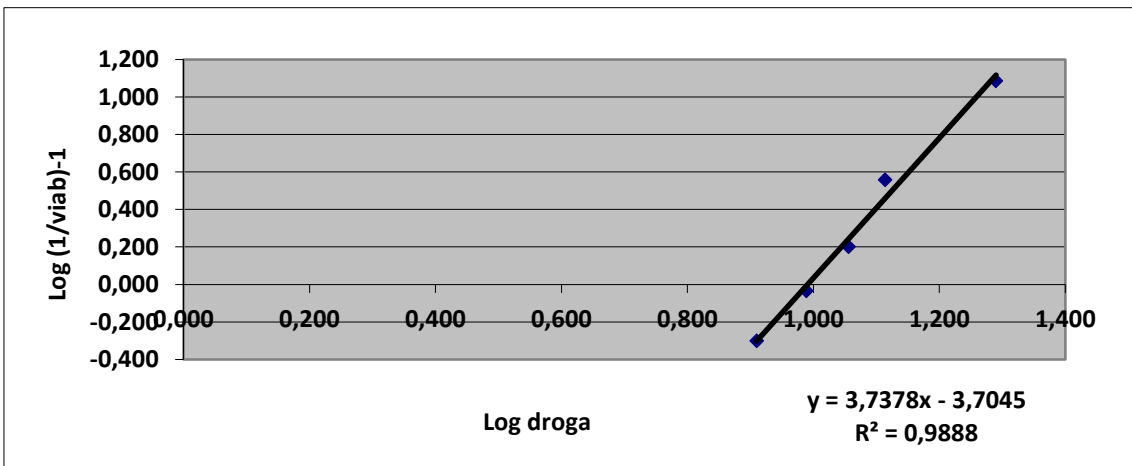


Figura 70: Combinación de gefitinib con PB1 en H1975.

ANEXO

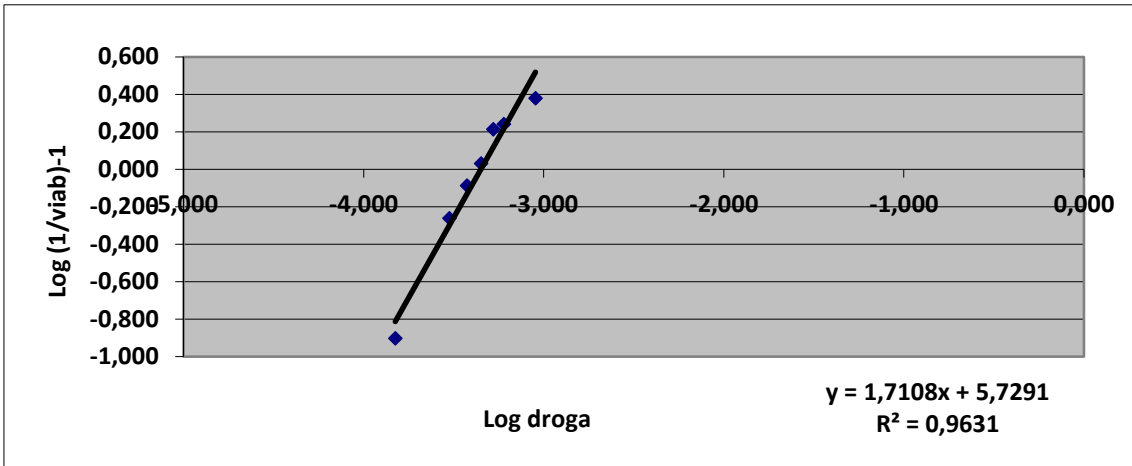


Figura 71: IC<sub>50</sub> de afatinib en H1975.

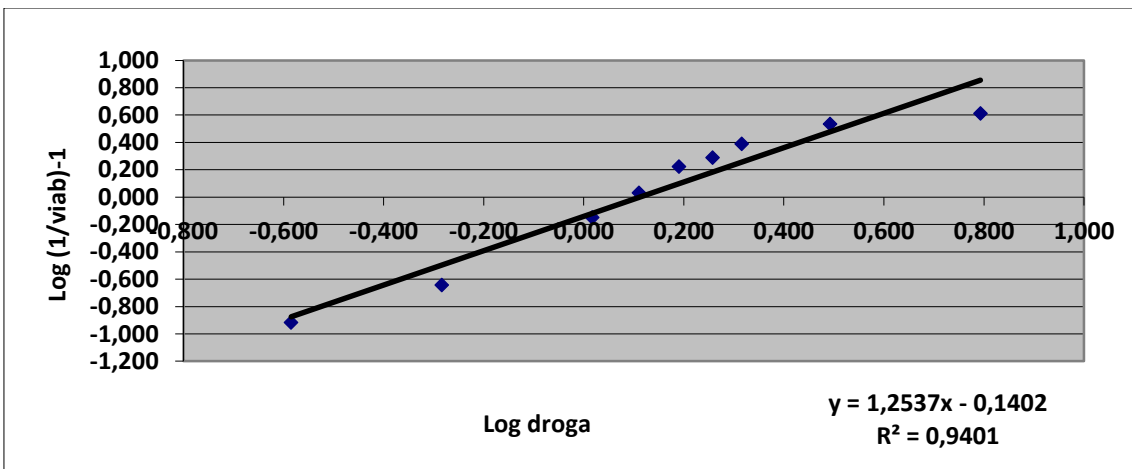


Figura 72: Combinación de PB1 con afatinib en H1975.

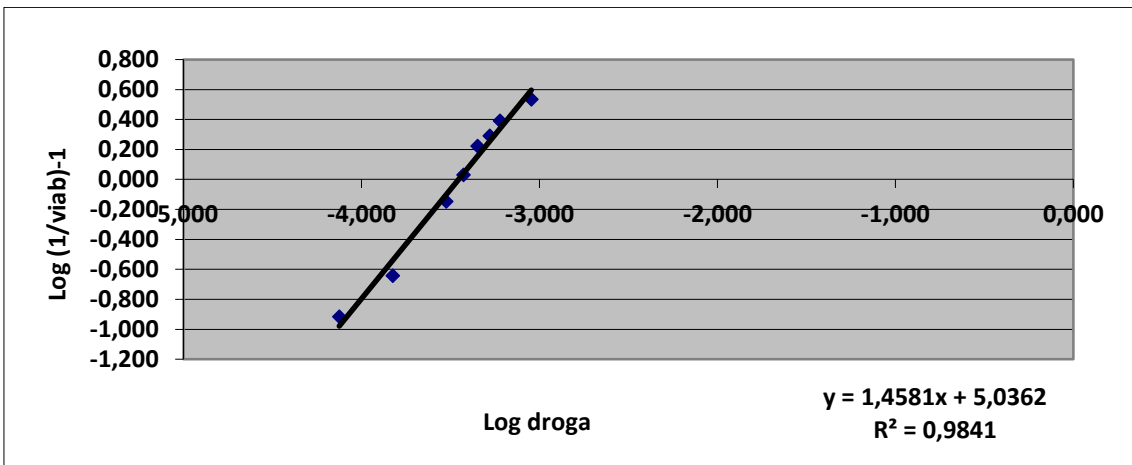


Figura 73: Combinación de afatinib con PB1 en H1975.

ANEXO

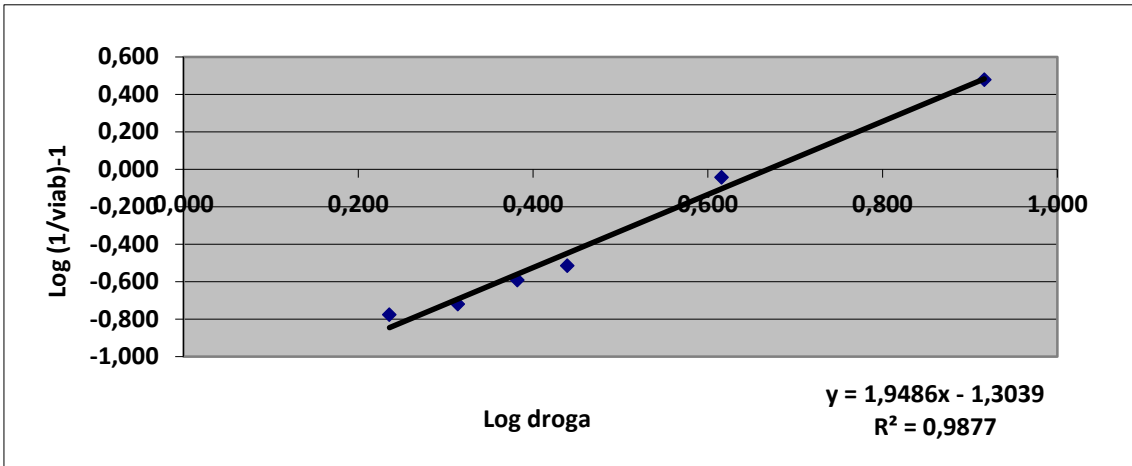


Figura 74: IC<sub>50</sub> de dacomitinib en H1650

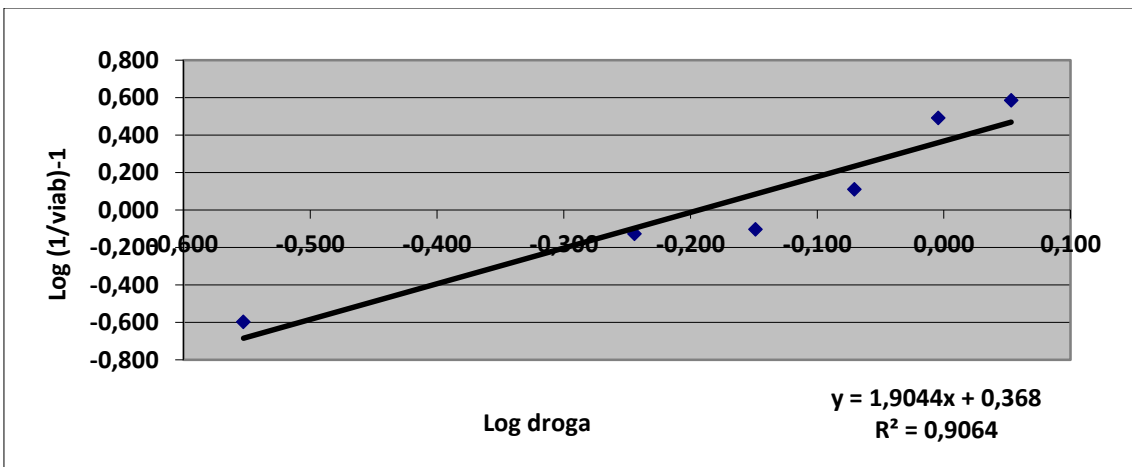


Figura 75: Combinación de PB1 con dacomitinib.

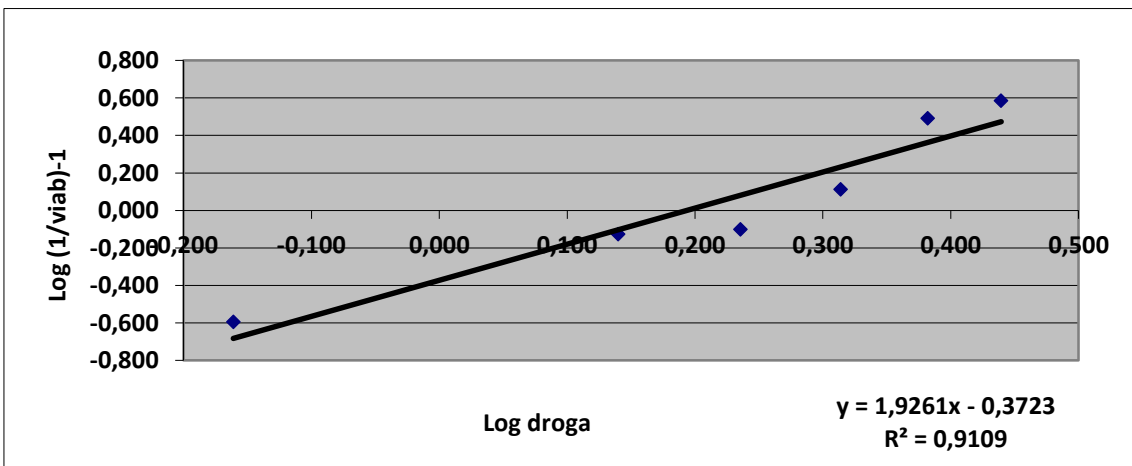


Figura 76: Combinación de dacomitinib con PB1.

ANEXO

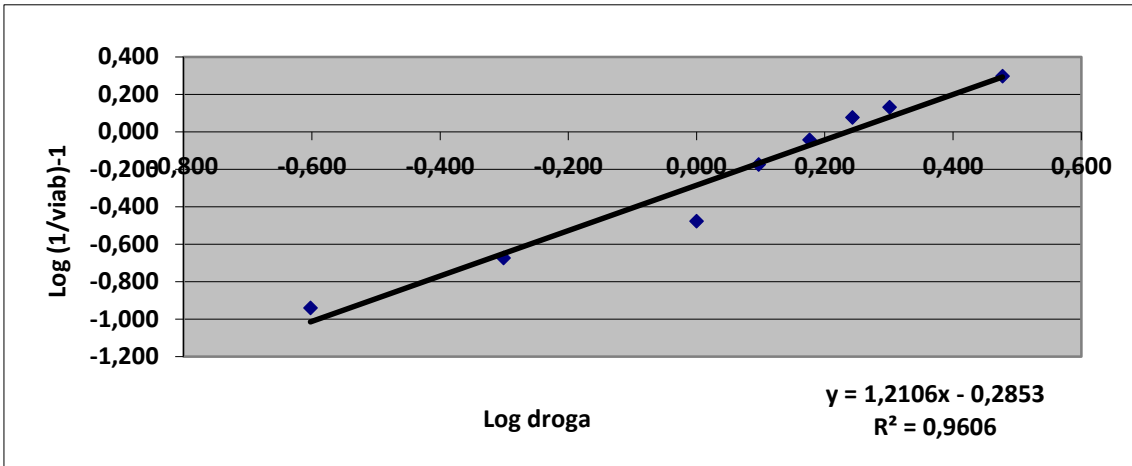


Figura 77: IC<sub>50</sub> de PB1 en H1650.

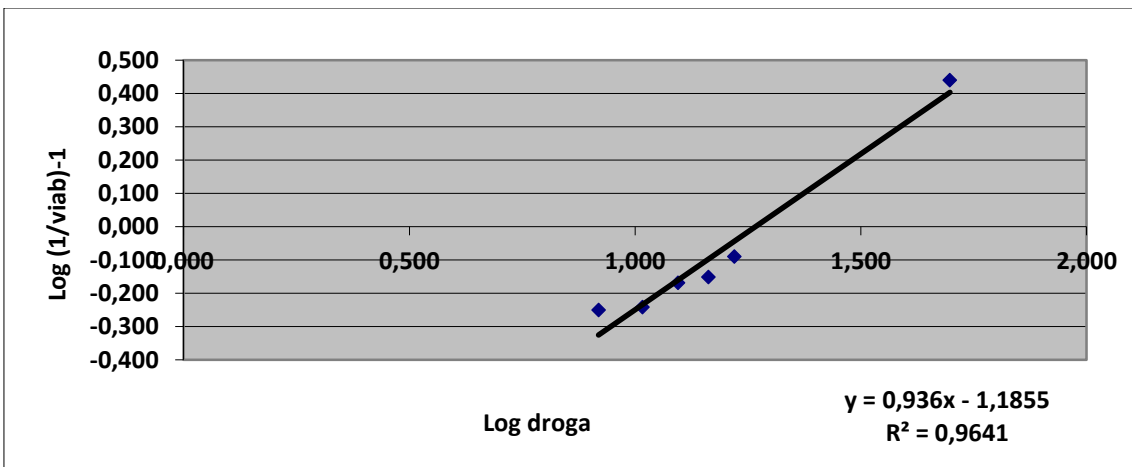


Figura 78: IC<sub>50</sub> de gefitinib en H1650.

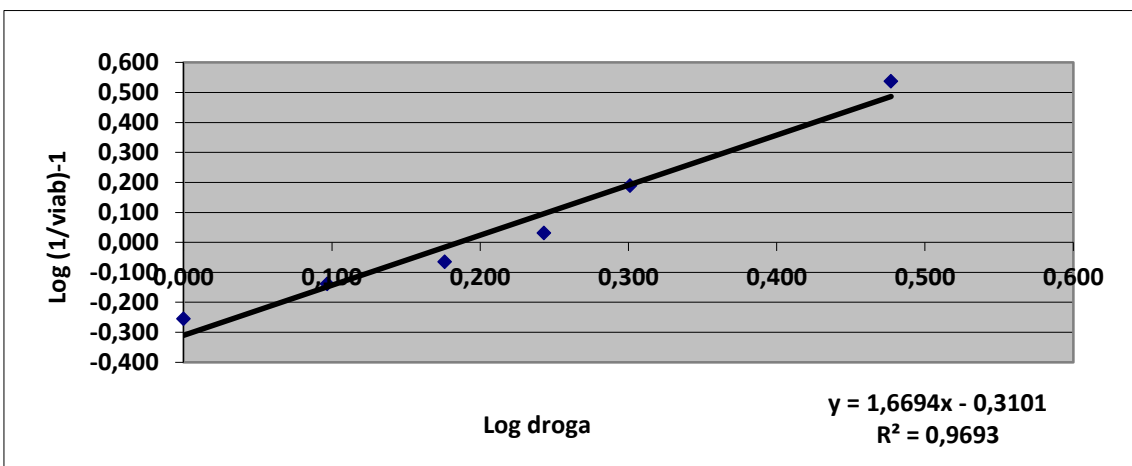


Figura 79: Combinación de PB1 con gefitinib en H1650.

ANEXO

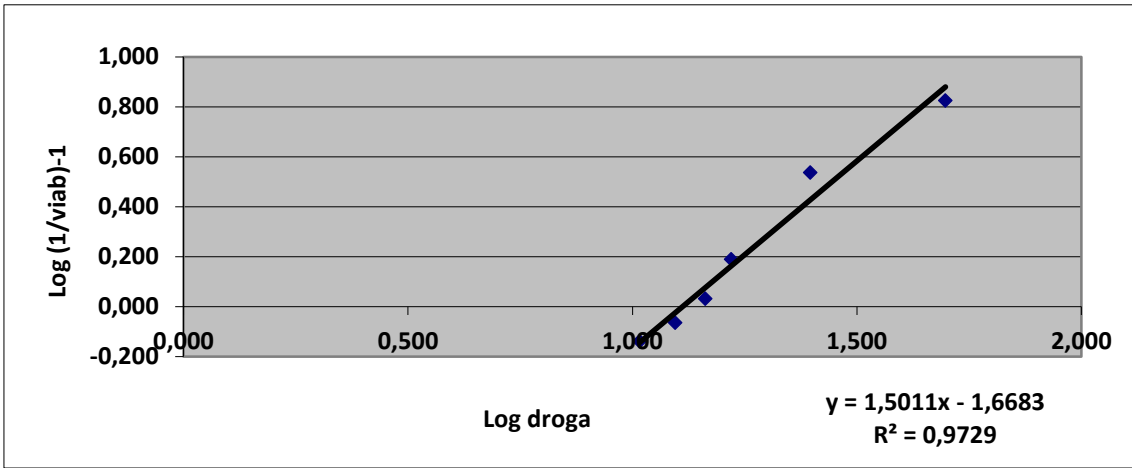


Figura 80: Combinación de gefitinib con PB1 en H1650.

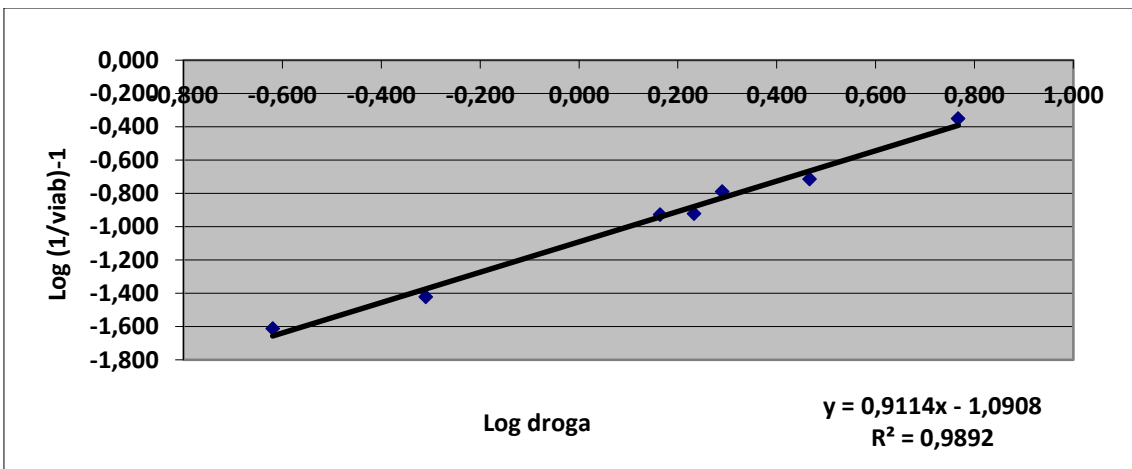


Figura 81.  $IC_{50}$  de afatinib en H1650.

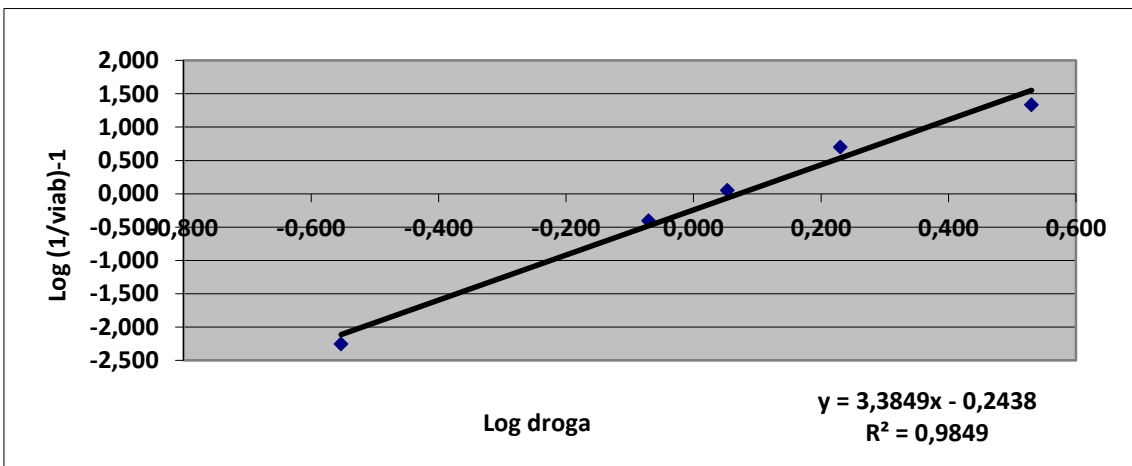


Figura 82: Combinación de PB1 con afatinib en H1650.



ANEXO

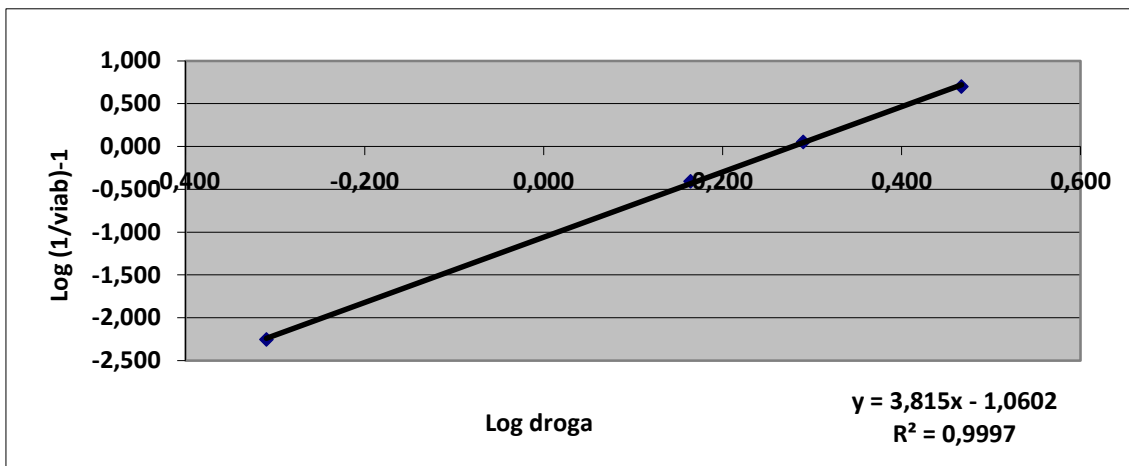


Figura 83: Combinación de afatinib con PB1 en H1650.

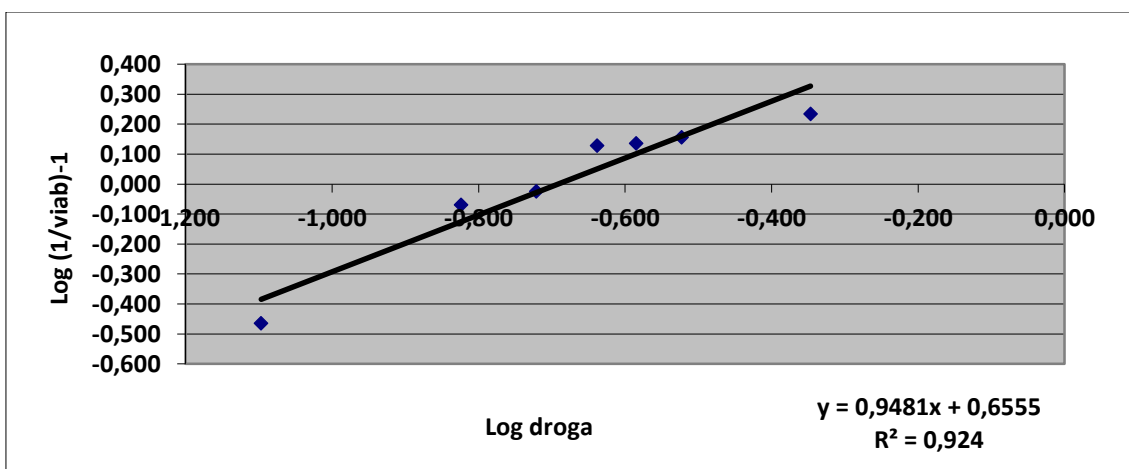


Figura 84: IC<sub>50</sub> de dacomitinib en H1650.

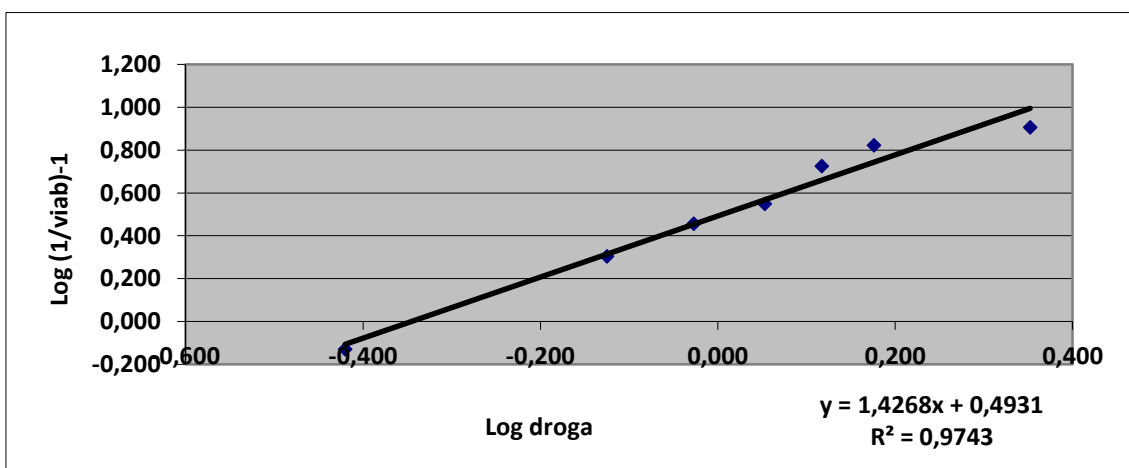


Figura 85: Combinación de PB1 con dacomitinib en H1650.

ANEXO

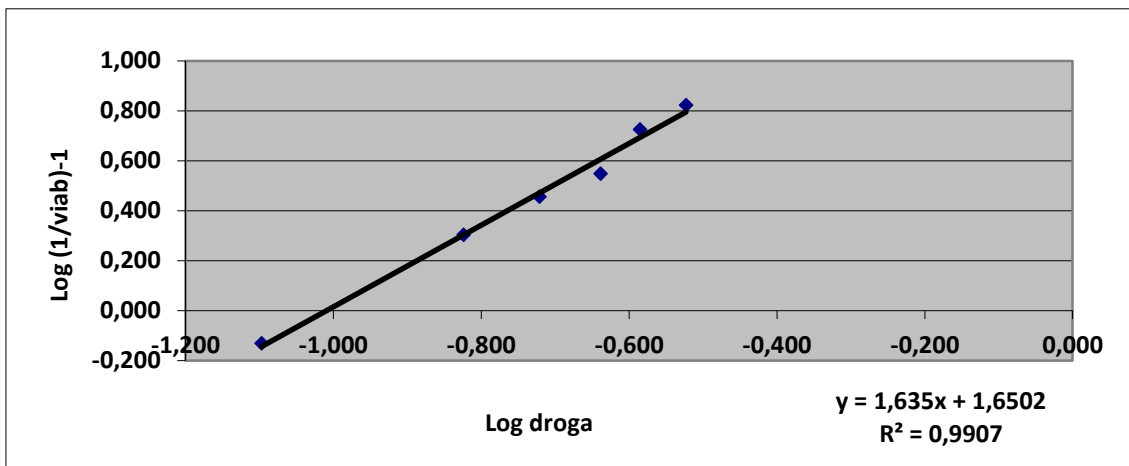


Figura 86: Combinación de dacomitinib con PB1 en H1650.

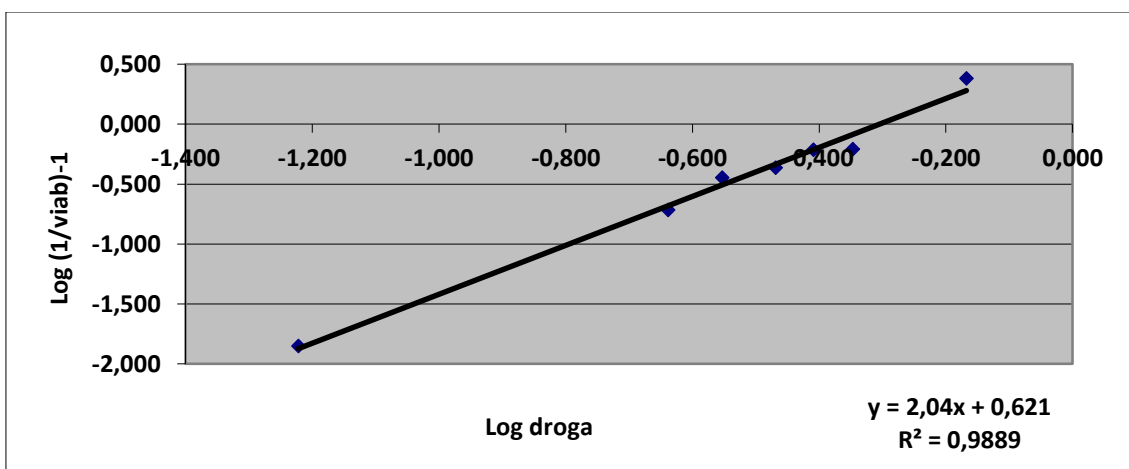


Figura 87:  $IC_{50}$  de PB1 en A549.

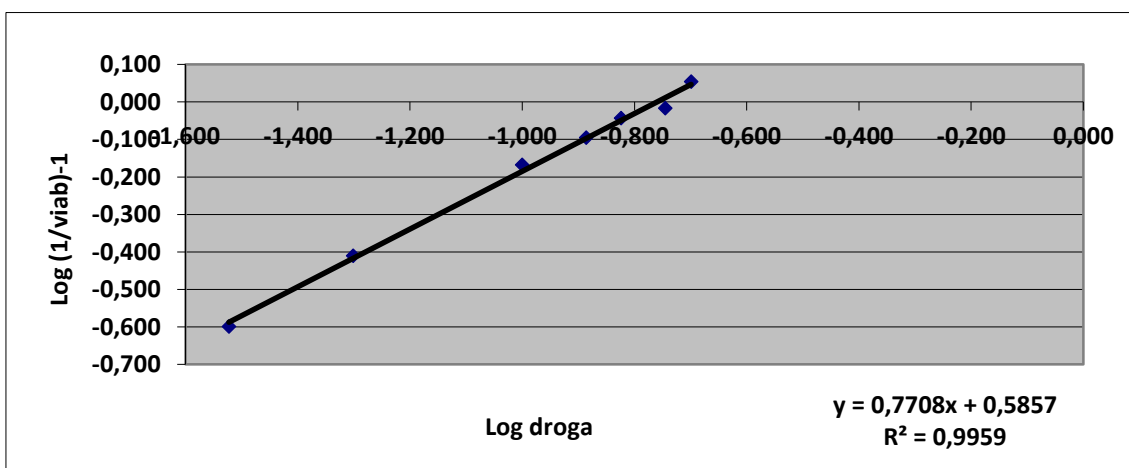


Figura 88:  $IC_{50}$  de selumetinib en A549.

ANEXO

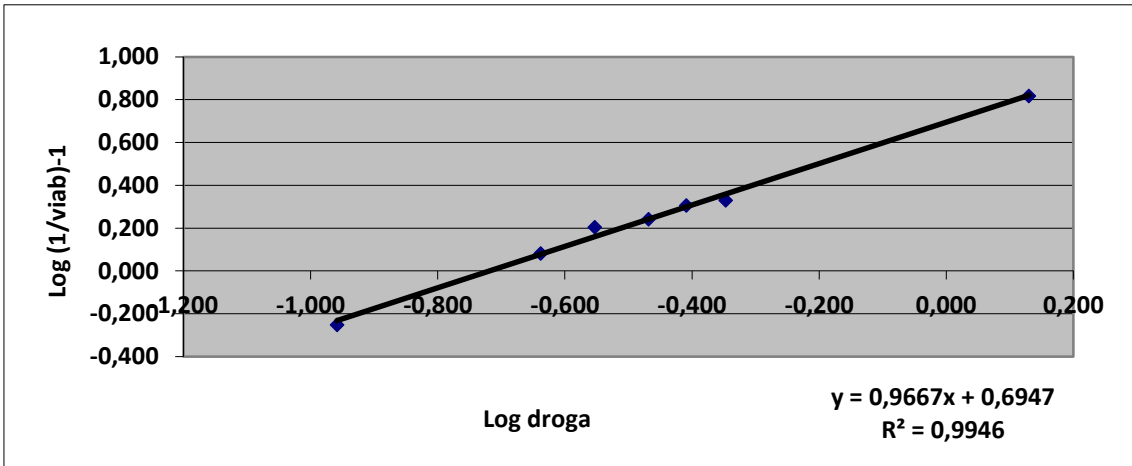


Figura 89: Combinación de PB1 con selumetinib en A549.

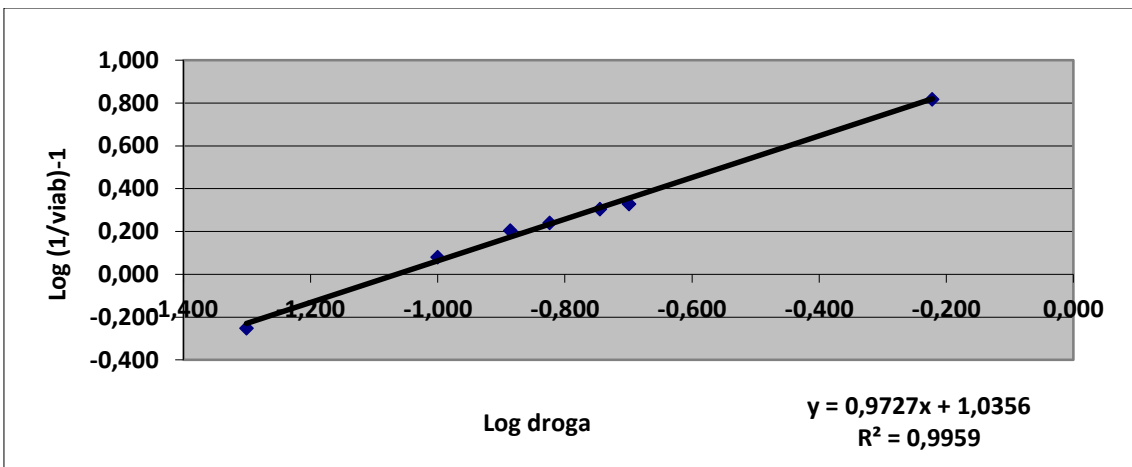


Figura 90: combinación de selumetinib con PB1 en A549.

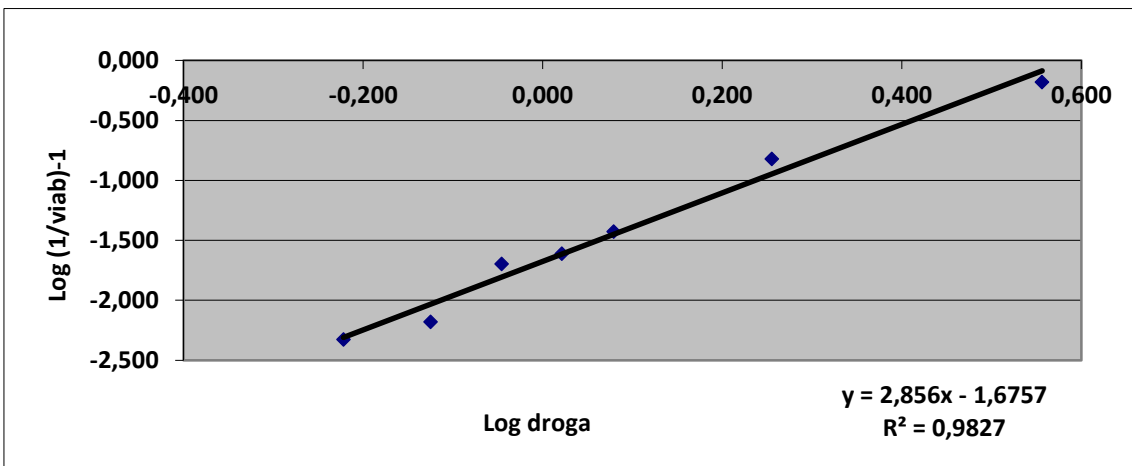


Figura 91: IC<sub>50</sub> de BGB324 en A549.

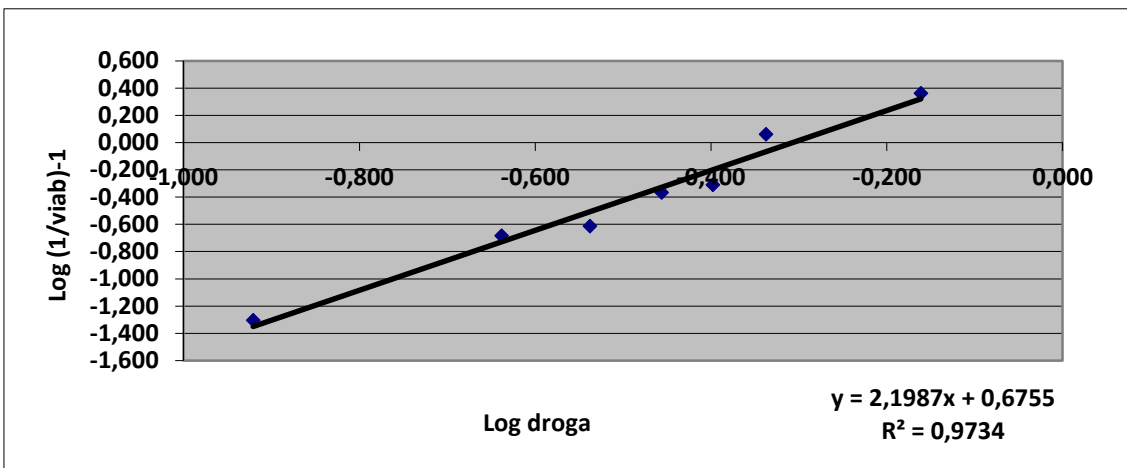


Figura 92: Combinación de PB1 con BGB324 en A549.

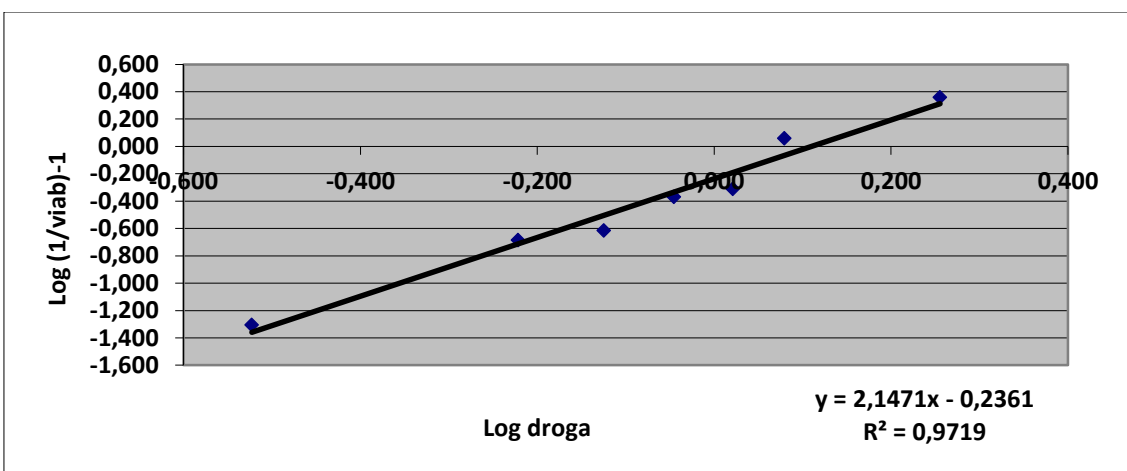


Figura 93: Combinación de BGB324 con PB1 en A549.



## 8.2 Publicaciones



## Chapter 2

# Personalized Medicine in Lung Cancer

**Daniela Morales-Espinosa,<sup>a</sup> Silvia García-Román,<sup>b</sup>  
and Rafael Rosell<sup>a,c</sup>**

<sup>a</sup>*Instituto Oncológico, Quirón-Dexeus University Hospital, C. Sabino Arana 5-19, Consulta-1.1, 08028 Barcelona, Spain*

<sup>b</sup>*Institut Químic Sarriá, Via Augusta, 390, 08017 Barcelona, Spain*

<sup>c</sup>*Catalan Institute of Oncology, Germans Trias i Pujol Health Sciences Institute and Hospital, Autonomous University of Barcelona (UAB), Campus Can Ruti, 08916*

*Badalona, Barcelona, Spain*

rrosell@iconcologia.net

## 2.1 Introduction

Lung cancer remains the leading cause of cancer-related death worldwide.<sup>1</sup> Most non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients are diagnosed at advanced stages, when chemotherapy is generally considered palliative treatment. In recent years, such treatment has proved not only to prolong survival but also to improve quality of life (including reduction of disease-related symptoms) for these patients.<sup>2</sup> Even today, after all the advances in therapeutic oncology, failure to therapy and sometimes extensive side effects remain a challenge. Due to growing knowledge, the generalized, non-individualized, mechanistic use of very expensive treatments is

---

*Cancer Genetics and Genomics for Personalized Medicine*

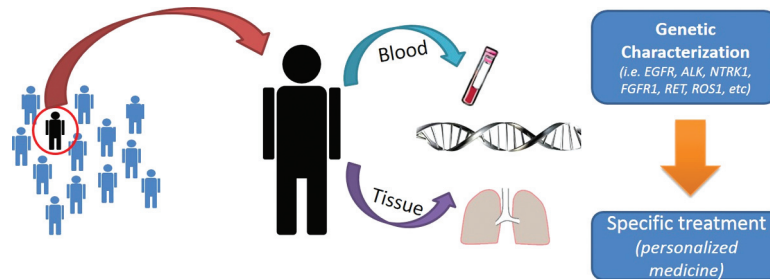
Edited by Il-Jin Kim

Copyright © 2016 Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.

ISBN 978-981-4669-87-0 (Hardcover), 978-981-4669-88-7 (eBook)

www.panstanford.com





**Figure 2.1** Personalized treatment approach.

becoming less acceptable over time. The pursuit of specific targets as an effort to personalize treatment is the preferred therapeutic approach (Fig. 2.1).

### 2.1.1 Predictive Models

There are huge differences in recurrence and survival rates among patients in the same clinicopathologic group, indicating that current treatment approaches result in overtreatment of some patients and undertreatment of others.<sup>3,4</sup>

Recently, molecular expression profiling of the tumor has emerged as a powerful prognostic tool to predict long-term outcomes in many cancers, including breast,<sup>5</sup> colon,<sup>6</sup> and liver cancer.<sup>7</sup> The ability to predict how a patient will respond to a particular treatment regimen is one of the most ambitious goals of personalized oncology. Also, pharmacogenomic-based studies of anti-cancer agents are complicated by the existence of additional somatic mutations within the tumor, as well as by the genetic heterogeneity of the population. One of the most important issues to address in pharmacogenomics is sample size, taking into account both the time required to complete the study population and the costs implied. While certain tools have been designed and approved for genetic testing in lung cancer, Lungscape and other tools for testing in early lung cancer are not readily available. Recently, the Pervenio™ Lung RS (risk score) (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific)—a 14-gene expression assay using quantitative PCR—became available. Pervenio™ is based on two large independent

studies of 1800 patients. In the validation cohort, 5-year overall survival was 49.2% (42.2–55.8) in high-risk patients compared to 58.3% (48.9–66.6) and 71.4% for the intermediate and low-risk groups, respectively.<sup>8</sup> This platform is intended to improve risk stratification of patients with early-stage, non-squamous NSCLC at high risk of mortality after surgical treatment.

### 2.1.2 The Molecular Diagnostics Approach

Individual patients' tumor biology and tumor heterogeneity are increasingly becoming important factors to consider when selecting cancer treatment. Similarly, there is now more emphasis on understanding the mechanisms of carcinogenesis and how these can be exploited when designing new therapeutic agents. Tumorigenesis in humans is a multistep process involving genetic alterations that drive the progressive transformation of normal cells to malignant types. Deregulated processes involved in tumorigenesis, such as regulation of cell cycle progression, angiogenesis, and apoptosis provide rational targets for novel therapies.<sup>9</sup>

Several technologies have been developed to detect cancer without the need for biopsy or surgical procedure; these new techniques also allow tumor cells to be studied at the molecular level.<sup>10</sup> Some of the most commonly used and useful assays are analysis of circulating tumor cells, mutation-specific PCR in circulating DNA, proteomic approaches to study serum or plasma, molecular-level images of tumors in situ, and assessment of autoantibodies specific for tumor cells.<sup>11</sup>

The majority of the molecular alterations we know about today were brought to light using technologies that detect changes in DNA content or sequence, transcription from DNA to messenger RNA or microRNA, production of proteins, or synthesis of various metabolic products. Table 2.1 summarizes the most common technologies and information obtained from each of them.<sup>10,11</sup>

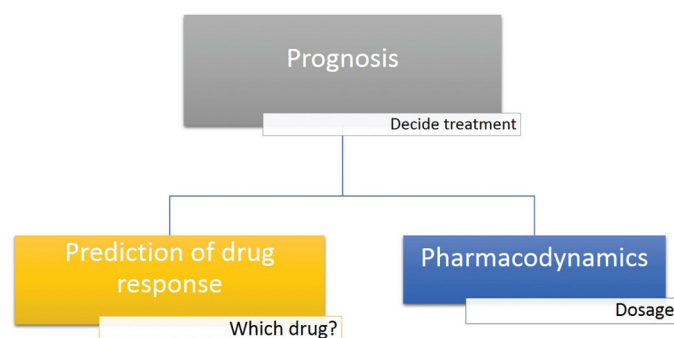
In the past decade, there have been considerable improvements in the way human tumors are characterized. Knowledge of cancer at the molecular level has therefore increased greatly, and this has catalyzed a shift towards targeted therapies for cancer. However, there has been much less progress in the development of clinical

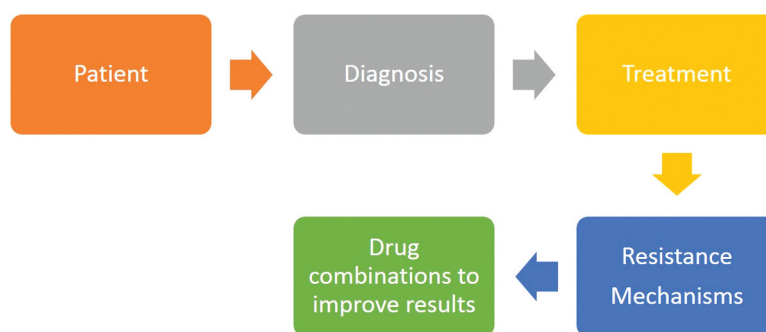
**Table 2.1** Commonly used techniques in cancer research

Technique	Information obtained
DNA copy-number assessment	Comparative genome hybridization to DNA microarrays
Mutation screening	DNA sequencing Mass-spectrometry-based genotyping Mutation-specific PCR
Gene-expression profiling	DNA microarrays Multiplex PCR
MicroRNA-expression profiling	DNA microarrays Multiplex PCR
Proteomic profiling	Mass spectrometry
Phosphoproteomic profiling	Mass spectrometry after immunoprecipitation with phosphotyrosine-specific antibodies
Metabolomic profiling	Mass spectrometry

tools to determine which patients are most likely to benefit from particular targeted therapies or what the optimum dosage could be.

Biomarkers offer an innovative opportunity to obtain more information about each patient<sup>4</sup> and can be classified as prognostic, predictive, or pharmacodynamic biomarkers, depending on their potential use (Fig. 2.2). Prognostic biomarkers provide information

**Figure 2.2** Types of biomarkers.



**Figure 2.3** Envisaging the future of personalized precision medicine for cancer treatment.

about possible patient outcome and guide treatment selection.<sup>12</sup> Predictive biomarkers inform on the probability of positive or negative response to a specific treatment. Finally, pharmacodynamics biomarkers help the specialists to decide the optimum dose.<sup>13</sup> It is therefore possible to use biomarkers to help choose the most beneficial treatment and most suitable dose for each patient.

The solution to the inevitable challenge of polygenic cancer drug-resistance is to identify not only all exploitable molecular abnormalities but also the full range of resistance mechanisms and thereafter to employ precision combinatorial targeted therapy strategies matched specifically to the fully defined tumor profile (shown in Fig. 2.3).<sup>14,15</sup>

## 2.1.3 Conventional Chemotherapy

### 2.1.3.1 Cisplatin

Cisplatin, a platinum-based chemotherapeutic drug, has been used for over 30 years in a wide variety of cancers with varying degrees of success. It was the first member of a class of platinum-containing anti-cancer drugs, which now also includes carboplatin and oxaliplatin. These platinum complexes react *in vivo*, binding to and causing crosslinking of DNA, which ultimately triggers apoptosis (programmed cell death); cells able to remove these

adducts are resistant to the compound. Many proteins involved in DNA damage-response (DDR) machinery have a role in repairing cross-links by platinum.<sup>16</sup> Specifically, cisplatin has been used to treat late stage NSCLC as the standard of care. However, therapeutic outcomes vary from patient to patient. Considerable efforts have been made to identify biomarkers that can be used to predict cisplatin sensitivity.<sup>17</sup>

Excision repair cross-complementing group 1 (ERCC1) has a crucial role in nucleotide excision repair (NER) pathway, which is one of DDR machinery. So far, many studies have suggested that ERCC1 at the level of protein, messenger RNA, or germline DNA could be a prognostic or predictive biomarker in NSCLC patients treated with platinum doublets, though contradictory results have also been reported.<sup>18</sup> A recent report in *The New England Journal of Medicine* by Friboulet and colleagues addressed the elegant validation of ERCC1 protein expression as a biomarker for adjuvant platinum-based chemotherapy and provided insights into the methodology to assess it.<sup>19</sup> Further trials have been performed to validate the predictive or prognostic effect of ERCC1.<sup>20</sup> Nevertheless, in these studies the discordance of ERCC1 H score between old and new batches of the 8F1 antibody and the point that four ERCC1 protein isoforms were heterogeneously expressed by alternative splicing in tumor samples with different functions in repairing platinum-DNA adduct, meant that no conclusive results could be extracted. Therefore the development of a specific antibody for functional isoform (ERCC1-202) will be necessary to more accurately predict the benefit from platinum.<sup>18</sup>

### 2.1.3.2 Pemetrexed

Pemetrexed (Alimta<sup>®</sup>, Ely Lilly) is chemically similar to folic acid and belongs to the class of chemotherapy drugs known as folate antimetabolites. It works by inhibiting three enzymes used in purine and pyrimidine synthesis—thymidylate synthase (TS), dihydrofolatereductase (DHFR), and glycinamideribonucleotideformyl transferase (GARFT).<sup>21</sup> By inhibiting the formation of precursor purine and pyrimidine nucleotides, pemetrexed prevents the formation of DNA and RNA required for growth and survival of both normal and

cancer cells. In 2008, a phase III study by Scagliotti et al. comparing cisplatin/pemetrexed vs. cisplatin/gemcitabine showed for the first time a survival difference in favor of cisplatin/pemetrexed in two histologic groups (adenocarcinoma and large cell carcinoma). The first group had significantly better survival (12.6 vs. 10.9 months),<sup>22</sup> something which may be explained by the fact that thymidylate synthase levels are generally lower in adenocarcinoma. Pre-clinical data suggests that overexpression of TS correlates with reduced sensitivity to pemetrexed;<sup>23</sup> this is corroborated by a recent meta-analysis. The authors concluded that TS may be a suitable marker of sensitivity to pemetrexed-based chemotherapy in NSCLC patients.<sup>24</sup> Nevertheless, this is not yet a standard recommendation for clinical practice.

### 2.1.3.3 Gemcitabine

This chemotherapeutic agent is one of the most widely used pyrimidine analogues, with a very well established role in first-line treatment of advanced NSCLC. Several studies have examined molecular determinants of sensitivity to gemcitabine. Potential candidates to predict response include genes encoding drug metabolism enzymes, transport across membranes, or target proteins. One example is human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1), which transports gemcitabine into cells. hENT1 basal expression levels have been correlated with IC50 values for gemcitabine in several NSCLC cell lines.<sup>25</sup> Also, expression of hENT1 has been analyzed by IHC, suggesting that absence of hENT1 expression may be used to predict response to gemcitabine-based chemotherapy.<sup>26</sup> Nevertheless, prospective studies are still required to validate this and the most accurate determination method remains to be decided.

Personalized treatment of lung cancer, although quite common in daily clinical practice in some parts of the world, is not widespread in others. There is an urgent need to improve treatment strategies, especially for those patients with advanced disease who are not candidates for targeted treatments such as erlotinib for EGFR mutated patients or crizotinib for ALK translocated patients. The Spanish Lung Cancer Group (SLCG) recently presented the results of the BRCA1-RAP80 Expression Customization (BREC) trial, a good

example of the complexity of modern pharmacogenomics. Investigators allocated patients to three different customized therapy arms according to RAP80 and BRCA1 expression and results of the interim analysis were presented at the 15th World Congress on Lung Cancer (WCLC) in Sydney. The study was closed early due to negative results, possibly due to the poor capacity of RAP80 as a predictor.<sup>27</sup> As commented, this illustrates the difficulty of finding accurate biomarkers.

#### **2.1.3.4 Taxanes**

Taxanes agents are diterpenes produced by the plants of the genus *Taxus* (yews), and include paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere). Taxanes present difficulties in formulation as medicines because they are poorly soluble in water due to their lack of acid and basic groups. Their action is based on disruption of microtubule function; microtubules are essential to cell division, and taxanes stabilize guanosinediphosphate (GDP)-bound tubulin in the microtubule, thereby inhibiting the process of cell division. Thus, in essence, taxanes are mitotic inhibitors. Taxanes are well established as potent chemotherapy agents for metastatic breast cancer (MBC) and early breast cancer (EBC). However, their therapeutic usefulness is limited by *de novo* refractoriness or acquired resistance, common drawbacks to most anti-cancer cytotoxics.<sup>28</sup>

Thymidine phosphorylase (TP) allows classification of patients as high-expression and low-expression according to the median value of its expression, with significantly longer time to progression (TTP) in the high-TP group. In some trials, it has been observed that TP expression may be a prognostic factor in breast cancer patients treated with capecitabine-based first-line chemotherapy and  $\beta$ III-tubulin can predict outcome of capecitabine in combination with taxanes as first-line chemotherapy.<sup>29</sup>

Over-expression of the MDR-1 gene product Pgp has been extensively studied *in vitro* in association with taxane resistance, but data are conflicting. Similarly, the target components microtubules failed to confirm such associations. Moreover, little consensus has been reached for reported associations between taxane-sensitivity and mutated p53, or taxane-resistance and overexpression of

Bcl-2, Bcl-xL, or NFκB. In contrast, the most notable finding is that pharmaceutical down-regulation of HER-2 appears to reverse taxane resistance.<sup>29</sup>

## 2.2 Genetic Alterations and New Potential Targets

In NSCLC, numerous genes involved in tumor proliferation are the target of agents currently in various stages of clinical development: EGFR, HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), ROS1 (reactive oxygen species 1), BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homologue B1), MAPK (mitogen-activated protein kinase), c-MET (c-mesenchymal-epithelial transition), PTEN (phosphatase and tensin homolog), FGFR (fibroblast growth factor receptor), DDR2 (discoidin domain receptor 2), PIK3CA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate3-kinase, catalytic subunit alpha), RET (rearranged during transfection), AKT (protein kinase B) and ALK (anaplastic lymphoma kinase), among others. The activity of these oncogenic targets occurs through various pathways such as DRC-signal transduction, phosphoinositide 3-kinase-AKT-mTOR, RAS-RAF-MEK, etc. To date, there are five approved targeted therapies for treatment of advanced or metastatic NSCLC: gefitinib, erlotinib, and afatinib for EGFR mutated patients, crizotinib for ALK translocated patients and bevacizumab which currently lacks a reliable pre-treatment biomarker. Moreover, oncogenic mutant proteins are subject to regulation by protein trafficking pathways, specifically through the heat shock protein 90 system. Drug combinations affecting various nodes in these signaling and intracellular processes have been demonstrated to be synergistic and advantageous in overcoming treatment resistance compared with monotherapy approaches. Understanding the role of the tumor microenvironment in development and maintenance of the malignant phenotype has also provided additional therapeutic approaches. More recently, improved knowledge of tumor immunology has set the stage for promising immunotherapies in NSCLC. The main molecular alterations are listed in Table 2.2.



**Table 2.2** Molecular alterations in NSCLC

Gene	Frequency (%)		Available therapies	Therapies under study
	ADC	SCC		
EGFR <sup>63</sup>	10	2-3	Erlotinib, gefitinib, afatinib	AZD9291, CO-186, HM61713
ALK <sup>64</sup>	3-5	<1	Crizotinib, ceritinib	AP26113, alectinib, ganetesipib, PF-06463922
MET <sup>65</sup>	2-4	NA	Crizotinib	Tivantinib, cabozantinib, INC280, onartuzumab
ROS1 <sup>66</sup>	1-2	NA	Crizotinib	PF-06463922
FGFR1 <sup>67</sup>	NA	20	NA	Dovitinib, ponatinib, AZD4547, BGJ398
FGFR2 <sup>68</sup>	3	3	NA	Dovitinib, ponatinib, AZD4547, BGJ398
NTRK1 <sup>69</sup>	1-2	NA	N/A	Crizotinib, lestaurotinib
RET <sup>70</sup>	1	N/A	N/A	Carbozantinib, vandetanib
HER2 <sup>71</sup>	2-4	N/A	N/A	Neratinib, afatinib, lapatinib, trastuzumab
DDR2 <sup>72</sup>	N/A	2-3	N/A	Dasatinib
BRAF <sup>73</sup>	1-6	4-5	N/A	Vemurafenib, dabrafenib, trametinib
KRAS <sup>74</sup>	15-25	1-2	N/A	Selumetinib + docetaxel

## 2.2.1 Receptor Tyrosine Kinases

### 2.2.1.1 EGFR inhibitors (first and second generation)

In 2000, results from preclinical trials suggested that EGFR inhibitors contrasted proliferation and angiogenesis, promoted or induced apoptosis and may have a synergistic effect with other standard cytotoxic cancer therapies.<sup>30</sup>

Gefitinib [4-(3-chloro-4-fluoroanilino)-7-methoxy-6-(3-morpholinopropoxy) quinazoline] is a low molecular weight synthetic aniline-quinazoline oral selective reversible inhibitor of EGFR tyrosine kinase (TK). Erlotinib [6,7-bis(2-methoxy-ethoxy)-quinazolin-4-yl-(3-ethynylphenyl)amine] is a quinazoline derivative which

reversibly inhibits the kinase activity of purified EGFR and autophosphorylation in intact cells *in vitro*.<sup>31</sup> EGFR tyrosine kinases inhibitors (TKIs) target cytoplasmic-domain phosphorylation,<sup>32</sup> which in turn results in apoptosis and growth arrest of EGFR-dependent cells by inhibition of signaling pathways such as PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)-AKT, Jak (Janus kinase)-STAT (signal transducer and activator of transcription) and MAPK (mitogen-activated protein kinase).<sup>33</sup>

Second-generation EGFR inhibitors (irreversible inhibitors) such as afatinib, dacomitinib, and neratinib are pan-ErbB inhibitors that form covalent bonds to the receptor, and therefore are biologically active even in the presence of the T790M mutation.<sup>34</sup>

#### **2.2.1.2 ALK rearrangement (first and second generation)**

Some types of cancer are sensitive to specific inhibitors targeting a mutated pathway due to specific genetic lesions that work as proliferation drivers in these cells. Activating mutations or translocations of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene have been identified in several types of cancer, including NSCLC. The product of this translocation (EML4-ALK) is a fusion gene that encodes a cytoplasmic chimeric protein with constitutive kinase activity. Therefore, the hypothesis is that patient outcomes may be optimized by testing tumors for specific mutated pathways and directing therapies against those mutant pathways. This methodology led to one of the fastest FDA approvals in history: crizotinib was granted accelerated FDA approval less than five years after the first ALK positive NSCLC patient was included in crizotinib trials. The accelerated approval was based on two single-arm trials, one with 136 and the other with 119 locally advanced or metastatic ALK-positive NSCLC patients. The primary endpoint in both trials was objective response rate (ORR). In the first study this was 50%, while in the second it was 61%. These results included complete responses in 1% of treated patients, irrespective of their performance status or number of prior chemotherapy regimens.<sup>35</sup> Final approval in 2013 was based on the demonstration of better progression-free survival (PFS) and ORR with crizotinib compared to chemotherapy in NSCLC patients harboring ALK rearrangements with disease progression

after standard chemotherapy treatment.<sup>36</sup> Nevertheless, despite impressive results with crizotinib, we now know that most patients will eventually relapse and develop resistance to targeted therapies.

Second-generation ALK inhibitors such as ceritinib (LDK378) and alectinib (AP26113) have been evaluated in clinical trials. Response rates of up to 60% and predicted disease control rates of approximately 90% have been reported in crizotinib-resistant ALK positive NSCLC patients.<sup>37</sup>

LDK378 (ceritinib)—an oral ATP-competitive ALK TKI—achieved a 56% response rate in patients previously treated with crizotinib, both in those with the presence of some ALK-resistance mutations and those without. As expected, accelerated FDA approval was granted to ceritinib in April 2014 for ALK positive patients with metastatic NSCLC intolerant to crizotinib or with progressive disease.

Early clinical results of ganetespib (a HSP90 inhibitor) have demonstrated that it may constitute a different strategy to target ALK by inducing antitumor responses as well as overcoming acquired resistance.<sup>38</sup> The combination of ganetespib with crizotinib showed superior antitumor efficacy compared with monotherapy in *in vivo* experiments.<sup>39</sup>

### 2.2.1.3 ROS1

One to two percent of NSCLC patients have a chromosomal rearrangement involving the ROS1 gene (*c-ros oncogene 1*).<sup>40</sup> The ROS1 (chromosome 6q22) encodes a receptor tyrosine kinase of the insulin receptor family, which has downstream signaling via the MAPK pathway through RAS phosphorylation.<sup>41</sup> ROS1 fusion partners in NSCLC include FIG, CD74, SLC34A2, and SDC4, which lead to oncogenic transformation and constitutive kinase activity in cell culture and/or *in vivo*.<sup>40,42</sup>

According to preclinical data, ROS1 can be targeted by EML4-ALK inhibitors, thus suggesting an off-target effect.<sup>43</sup> So far, no specific ligand has been identified for the ROS1 tyrosine kinase. However, clinical findings of a cohort of patients with the ROS1 rearrangement showed that they share features with EML4-ALK-translocated patients, thus leading to the use of crizotinib as a

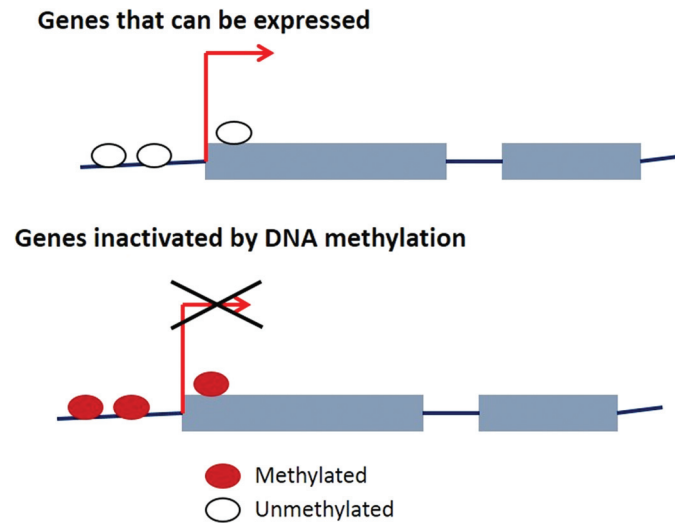
targeted treatment option with high response rates. Nevertheless, little is known regarding the prognostic and predictive value, as well as the clinical presentation of patients harboring a ROS1 rearrangement.

### **2.2.2 Epigenetic Factors**

Epigenetics is the study of cellular and physiological traits not caused by changes in the DNA sequence, i.e., relevant changes to the genome that do not involve a change in the nucleotide sequence.<sup>44</sup> Mechanisms of epigenetic silencing of tumor suppressor genes and activation of oncogenes include alteration in CpG island methylation patterns, histone modifications, and dysregulation of DNA proteins. Understanding epigenetic mechanisms holds great promise for cancer prevention, detection, and therapy.

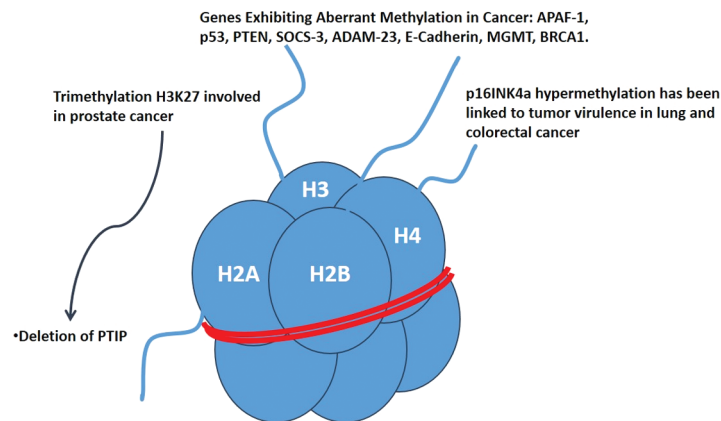
DNA methylation is an important regulator in genes transcription as it is related to non-programmed silencing genes.<sup>45</sup> The most common mechanisms of DNA methylation are hypermethylation and hypomethylation. Hypermethylation occurs when the CpG regions have a high amount of 5-methylcytosine, this produces gene silencing which is strongly involved in certain cancer processes, while hypomethylation has been related to cancer through different mechanisms.<sup>46</sup> CpG regions are areas with high amounts of cytosine and guanines bases bonded by phosphate groups. CpG sites located on encoded regions have unmethylated cytosines and guanine bases and the genes are expressed. However, when these bases are methylated the corresponding genes are silenced (Fig. 2.4). Therefore when these genes act as tumor suppressors and are methylated, development of a tumoral mass is favored.

Histones are highly alkaline proteins found in eukaryotic cell nuclei that package and order the DNA into structural units called nucleosomes located in the nucleus. Within the nucleus DNA is packaged as chromatin in the nucleosome and composed of an octamer of four different histones (H3, H4, H2A, H2B). Therefore histones are the chief protein components of chromatin, acting as spools around which DNA winds, and playing a role in gene regulation.



**Figure 2.4** DNA methylation.

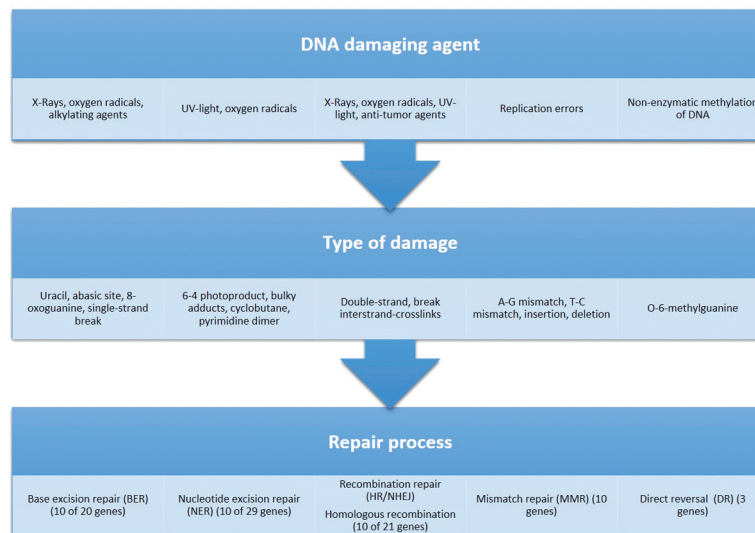
Histone modifications are reversible modifications in the amino-terminal tail of histones which display a large number of modified residues. Acetylation, methylation and phosphorylation are examples of histone modifications (Fig. 2.5). These modifications are catalyzed by distinct enzymes and divide the genome into “active”



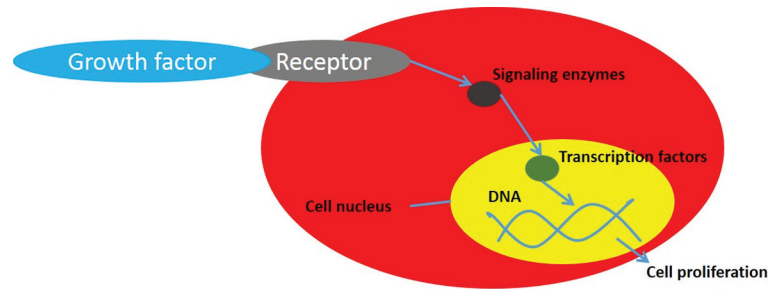
**Figure 2.5** Examples of histone modifications involved in cancer.

or euchromatin, in which DNA is accessible for transcription, and “inactive” or heterochromatin, in which DNA is inaccessible for transcription due to misregulation of some chromatin functions. As an example, prostate cancer has been associated with gene silencing by CpG island hypermethylation. GSTP1, APC, RASSF1a, PTGS2, and MDRI genes have been found to defend prostate cells against genomic damage caused by different oxidants or carcinogens.<sup>47</sup> This suggests that silencing of these genes will permit genetic damage to the prostate by oxidants and carcinogens.

Some epigenetic therapies in cancer include the DNMT inhibitors 5-azacytidine and 5-aza-20-deoxycytidine, which have been approved by the FDA for the treatment of various forms of cancer. These drugs have been shown to reactivate the cellular antitumor systems repressed by cancer, enabling the body to weaken the tumor.<sup>48</sup> Because of their wide ranging effects throughout the entire organism, all of these drugs have major side effects but do significantly increase survival rates. Figure 2.6 shows some of the repair processes following DNA damage.



**Figure 2.6** DNA damage, DNA repair and epigenetic-repair alterations in cancer.



**Figure 2.7** Normal growth pathway.

### 2.2.3 Transcription Factors

A transcription factor is a protein that is involved in the regulation of DNA transcription process but is not part of the RNA polymerase. Activity of these factors can occur through recognition or binding to specific DNA sequences, binding to other factors or direct binding to the RNA polymerase. Transcription factors are stimulated by cytoplasmic signals and are then able to regulate gene expression in the cellular nucleus and activate or suppress gene transcription (Fig. 2.7).

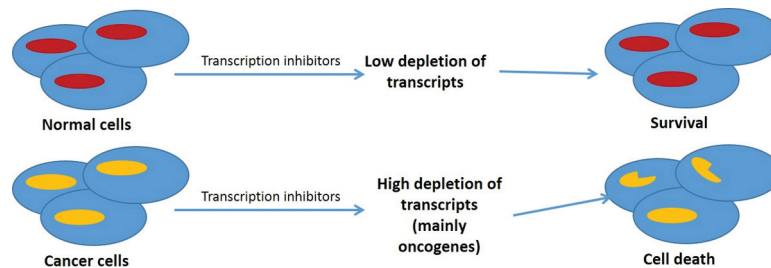
Some oncogenes that cause neoplastic lesions are the result of mutations in transcription factors. These mutations produce constant activity of transcription factors without the external signal requirement so regulation of the cell cycle is out of control. Some oncogenic transcription factors are Myc, STAT, Max, Myb, Fos, Jun, Rel. Traditionally, transcription factors were generally considered too difficult to target, and kinase pathways or cell surface proteins have long been popular alternative therapeutic targets. However, transcription factors are downstream effectors of many pathways and this, coupled with technological advances, has made them an attractive and realistic drug target.<sup>49</sup> Some of the components that could be targeted by drugs include cyclin-dependent kinases (CDKs), RNA polymerases (RNPI and RNPII), or components of associated transcriptional complexes.<sup>50</sup> These components are related to RNP enzymes and, although they are the expected targets for transcription inhibition, only a few drugs that directly affect them have been described, such as  $\alpha$ -amanitin cyclic

octapeptide and TAS-106, a cytidine analog. Their mechanisms of action involve binding to RNP to prevent DNA and RNA translocation in the  $\alpha$ -amanitin case, while TAS-106 is able to induce apoptosis as well as decrease the transcription of several factors required for survival. However, due to its high hepatotoxicity,  $\alpha$ -amanitin is not suitable for cancer treatment.<sup>51</sup>

Many drugs target CDKs as these are deregulated in cancer cells. Their inhibitors compete with ATP for the enzyme active site. Therefore, CDK inhibition results in RNPII hypophosphorylation.<sup>51</sup> The most commonly targeted CDKs are CDK7, CDK8 and CDK9. CDK7 is a component of basal transcription factor TFIIH that phosphorylates Serine 5 and 7 in the C-terminal domain (CTD) of the RNPII, which is important for promoter escape and recruitment of mRNA processing machinery during transcription.<sup>52</sup> CDK9 is also a component of P-TEFb, which, similar to CDK7, phosphorylates CTD of RNPII at serine 2 for transcription elongation.<sup>53,54</sup> The same activity is observed with the CDK8 kinase, which phosphorylates CTD of RNPII, resulting in inhibition of transcription initiation complex.

Finally, transcription can be disrupted via targeting of associated transcriptional complex components. In some cases, agents bind covalently to TFIIH and inhibit its ATPase activity. This action disrupts the opening of double-stranded DNA for RNPII transcription and repair as well as RNPI transcription. Therefore, cytotoxicity of these drugs is associated with transcriptional inhibition of anti-apoptotic factors and induction of apoptotic factors.<sup>55,56</sup> BRD3 and BRD4 are important emerging targets for treatment of various cancers. Displacement of BET bromodomains from chromatin prevents BRD3 and BRD4 reader activity. Inhibition of these factors has a generalized effect on RNPII transcription which causes downregulation of BCL-2, MYC and CDK6, thereby inducing cell cycle arrest and apoptosis.<sup>57-59</sup> Usually, transcription inhibition induces apoptosis by four possible mechanisms: altering the balance of apoptotic and anti-apoptotic factors to favor apoptosis, activating p53 and promoting its translocation to mitochondria, inhibiting DNA replication, and promoting accumulation of aberrant proteins in the nucleus. Moreover, oncogenes that are frequently overexpressed in cancer cells can be suppressed via transcription inhibition without affecting other genes (Fig. 2.8).





**Figure 2.8** Transcription inhibitors affect differentially regulatory sequences of genes and trigger cell death in cancer cells.

### 2.2.4 Repurposing Drugs

Despite great advances to date, failure rates are progressively increasing. Cancer treatments are extremely costly with a lengthy design and testing process with poor safety and bioavailability and often limited efficacy. It is estimated that only one of every 5000 to 10,000 new anticancer agents will receive FDA approval, and a mere 5% of all oncology drugs in phase I trials will be approved. This has highlighted the need for alternative efforts in the development of cancer treatments.<sup>60</sup> Approximately 13 years of research and nearly 1.8 US billion dollars are required to take a new drug all the way from the bench to bed.<sup>61</sup>

We now know that almost every drug has more than one target and therefore can produce off-target side effects. If this interaction with the off-target is potent enough, the same drug could be used to treat more than one disease. Evaluation of established non-cancer drugs approved for other medical conditions but with known cancer targets and reliable biomarkers is known as “drug repurposing.” This approach is predicted to soon become part of the tailored medicine approach and should be considered part of modern pharmacogenomics.<sup>62</sup> Drug repurposing of non-cancer drugs for their potential anticancer activities can provide the opportunity to rapidly advance therapeutic strategies into clinical trials. If this approach is followed, it will not be long before existing drugs known for their analgesic, antidiabetic, or immunosuppressant activities become part of the daily practice in oncology.

## 2.3 Conclusions

Fortunately, discovery of molecular mechanisms underlying lung cancer and development of possible targeted therapies have accelerated in recent years. The knowledge generated has helped to improve both the length and quality of life in NSCLC patients. It is to be hoped that it will not be long before there is a specific treatment available for every patient.

## References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(1):5-29.
2. Scagliotti G, Novello S. Adjuvant chemotherapy after complete resection for early stage NSCLC. *Lung Cancer.* 2003;42(2):47-51.
3. Kobayashi N, Toyooka S, Soh J, et al. Risk factors for recurrence and unfavorable prognosis in patients with stage I non-small cell lung cancer and a tumor diameter of 20 mm or less. *J Thorac Oncol.* 2007;2(9):808-812.
4. Hsu C-P, Hsia J-Y, Chang G-C, et al. Surgical-pathologic factors affect long-term outcomes in stage IB (pT2 N0 M0) non-small cell lung cancer: a heterogeneous disease. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;138(2):426-433.
5. Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 2002;347(25):1999-2009.
6. Eschrich S, Yang I, Bloom G, et al. Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol.* 2005;23(15):3526-3535.
7. Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, et al. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2008;359(19):1995-2004.
8. Kratz JR, He J, Van Den Eeden SK, et al. A practical molecular assay to predict survival in resected non-squamous, non-small-cell lung cancer: development and international validation studies. *Lancet.* 2012;379(9818):823-832.

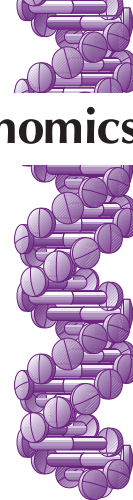
9. Yarden Y, Baselga J, Miles D. Molecular approach to breast cancer treatment. *Semin Oncol*. 2004;31(5 Suppl 10):6–13.
10. Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature*. 2008;452(7187):548–552.
11. Hunter DJ, Khoury MJ, Drazen JM. Letting the genome out of the bottle—will we get our wish? *N Engl J Med*. 2008;358(2):105–107.
12. Ratain MJ, Glassman RH. Biomarkers in phase I oncology trials: signal, noise, or expensive distraction? *Clin Cancer Res*. 2007;13(22 Pt 1):6545–6548.
13. Sharma S V, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(3):169–181.
14. Gonzalez de Castro D, Clarke PA, Al-Lazikani B, Workman P. Personalized cancer medicine: molecular diagnostics, predictive biomarkers, and drug resistance. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;93(3):252–259.
15. Al-Lazikani B, Banerji U, Workman P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nat Biotechnol*. 2012;30(7):679–692.
16. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010;40(2):179–204.
17. Rose MC, Kostyanovskaya E, Huang RS. Pharmacogenomics of cisplatin sensitivity in non-small cell lung cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2014;12(5):198–209.
18. Ryu JS, Memon A, Lee S-K. ERCC1 and personalized medicine in lung cancer. *Ann Transl Med*. 2014;2(4):32.
19. Friboulet L, Olausson KA, Pignon J-P, et al. ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2013;368(12):1101–1110.
20. Winton T, Livingston R, Johnson D, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2005;352(25):2589–2597.
21. McLeod HL, Cassidy J, Powrie RH, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the glycinamide ribonucleotide formyltransferase inhibitor AG2034. *Clin Cancer Res*. 2000;6(7):2677–2684.
22. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(21):3543–3551.

23. Sigmond J, Backus HHJ, Wouters D, Temmink OH, Jansen G, Peters GJ. Induction of resistance to the multitargeted antifolate Pemetrexed (AL-IMTA) in WiDr human colon cancer cells is associated with thymidylate synthase overexpression. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(3):431–438.
24. Wang L, Wang R, Pan Y, Sun Y, Zhang J, Chen H. The pemetrexed-containing treatments in the non-small cell lung cancer is -/low thymidylate synthase expression better than +/high thymidylate synthase expression: a meta-analysis. *BMC Cancer.* 2014;14:205.
25. Achiwa H, Oguri T, Sato S, Maeda H, Niimi T, Ueda R. Determinants of sensitivity and resistance to gemcitabine: the roles of human equilibrative nucleoside transporter 1 and deoxycytidine kinase in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2004;95(9):753–757.
26. Oguri T, Achiwa H, Muramatsu H, et al. The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 expression predicts nonresponse to gemcitabine-containing chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2007;256(1):112–119.
27. Moran T, Cobo M, Domine M, et al. Interim analysis of the Spanish Lung Cancer Group (SLCG) BRCA1-RAP80 Expression Customization (BREC) randomized phase III trial of customized therapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) (NCT00617656/GECP-BREC). *ASCO Meet Abstr.* 2013;31(18\_suppl):LBA8002.
28. Murray S, Briasoulis E, Linardou H, Bafaloukos D, Papadimitriou C. Taxane resistance in breast cancer: mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treat Rev.* 2012;38(7):890–903.
29. Zhao H-Y, Huang H, Hu Z-H, et al. Evaluations of biomarkers associated with sensitivity to 5-fluorouracil and taxanes for recurrent/advanced breast cancer patients treated with capecitabine-based first-line chemotherapy. *Anticancer Drugs.* 2012;23(5):534–542.
30. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, et al. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res.* 2000;6(5):2053–2063.
31. Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res.* 2001;7(10):2958–2970.
32. Dancey J, Sausville EA. Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(4):296–313.

33. Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(14):2787–2799.
34. Ninomiya T, Takigawa N, Ichihara E, et al. Afatinib prolongs survival compared with gefitinib in an epidermal growth factor receptor-driven lung cancer model. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(5):589–597.
35. Camidge DR, Bang Y-J, Kwak EL, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol*. 2012;13(10):1011–1019.
36. Shaw AT, Kim D-W, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2013;368(25):2385–2394.
37. Doebele RC. A nice problem to have: when ALK inhibitor therapy works better than expected. *J Thorac Oncol*. 2014;9(4):433–435.
38. Sang J, Acquaviva J, Friedland JC, et al. Targeted inhibition of the molecular chaperone Hsp90 overcomes ALK inhibitor resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov*. 2013;3(4):430–443.
39. Richards MW, Law EWP, Rennalls LP, et al. Crystal structure of EML1 reveals the basis for Hsp90 dependence of oncogenic EML4-ALK by disruption of an atypical  $\beta$ -propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(14):5195–5200.
40. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. 2012;18(3):378–381.
41. Oxnard GR, Binder A, Jänne PA. New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31(8):1097–1104.
42. Rimkunas VM, Crosby KE, Li D, et al. Analysis of receptor tyrosine kinase ROS1-positive tumors in non-small cell lung cancer: identification of a FIG-ROS1 fusion. *Clin Cancer Res*. 2012;18(16):4449–4457.
43. McDermott U, Iafrate AJ, Gray NS, et al. Genomic alterations of anaplastic lymphoma kinase may sensitize tumors to anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Cancer Res*. 2008;68(9):3389–3395.
44. Ledford H. Language: Disputed definitions. *Nature*. 2008;455(7216):1023–1028.
45. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer*. 2011;2(6):607–617.
46. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. 2013;14(10):R115.

47. Gurel B, Iwata T, Koh CM, Yegnasubramanian S, Nelson WG, De Marzo AM. Molecular alterations in prostate cancer as diagnostic, prognostic, and therapeutic targets. *Adv Anat Pathol*. 2008;15(6):319–331.
48. Kowluru RA, Santos JM, Mishra M. Epigenetic modifications and diabetic retinopathy. *Biomed Res Int*. 2013;2013:635284.
49. Redmond AM, Carroll JS. Defining and targeting transcription factors in cancer. *Genome Biol*. 2009;10(7):311.
50. Villicaña C, Cruz G, Zurita M. The basal transcription machinery as a target for cancer therapy. *Cancer Cell Int*. 2014;14(1):18.
51. Bensaude O. Inhibiting eukaryotic transcription. Which compound to choose? How to evaluate its activity? *Transcription*. 2014;2(3):103–108.
52. Akhtar MS, Heidemann M, Tietjen JR, et al. TFIIH kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell*. 2009;34(3):387–393.
53. Peng J, Liu M, Marion J, Zhu Y, Price DH. RNA polymerase II elongation control. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1998;63:365–370.
54. Fu TJ, Peng J, Lee G, Price DH, Flores O. Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem*. 1999;274(49):34527–34530.
55. Manzo SG, Zhou Z-L, Wang Y-Q, et al. Natural product triptolide mediates cancer cell death by triggering CDK7-dependent degradation of RNA polymerase II. *Cancer Res*. 2012;72(20):5363–5373.
56. Vispé S, DeVries L, Créancier L, et al. Triptolide is an inhibitor of RNA polymerase I and II-dependent transcription leading predominantly to down-regulation of short-lived mRNA. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(10):2780–2790.
57. Luo Z, Lin C, Guest E, et al. The super elongation complex family of RNA polymerase II elongation factors: gene target specificity and transcriptional output. *Mol Cell Biol*. 2012;32(13):2608–2617.
58. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, et al. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*. 2010;468(7327):1067–1073.
59. Dawson MA, Prinjha RK, Dittmann A, et al. Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia. *Nature*. 2011;478(7370):529–533.
60. Zamboni WC, Torchilin V, Patri AK, et al. Best Practices in Cancer Nanotechnology: Perspective from NCI Nanotechnology Alliance. *Clin Cancer Res*. 2012;18(12):3229–3241.

61. Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(3):203–214.
62. Gupta SC, Sung B, Prasad S, Webb LJ, Aggarwal BB. Cancer drug discovery by repurposing: teaching new tricks to old dogs. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(9):508–517.
63. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004;304(5676):1497–1500.
64. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448(7153):561–566.
65. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science.* 2007;316(5827):1039–1043.
66. Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell.* 2007;131(6):1190–1203.
67. Weiss J, Sos ML, Seidel D, et al. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med.* 2010;2(62):62ra93.
68. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature.* 2012;489(7417):519–525.
69. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat Med.* 2013;19(11):1469–1472.
70. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med.* 2012;18(3):375–377.
71. Stephens P, Hunter C, Bignell G, et al. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature.* 2004;431(7008):525–526.
72. Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, et al. Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov.* 2011;1(1):78–89.
73. Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):2046–2051.
74. Mascaux C, Iannino N, Martin B, et al. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2005;92(1):131–139.



## Pharmacogenomics in the treatment of lung cancer: an update

Significant advances have been made in the analysis of the human genome in the first decades of the 21st century and understanding of tumor biology has matured greatly. The identification of tumor-associated mutations and the pathways involved has led to the development of targeted anticancer therapies. However, the challenge now in using chemotherapy to treat nonsmall-cell lung cancer is to identify more molecular markers predictive of drug sensitivity and determine the optimal drug sequences in order to tailor treatment to each patient. This approach could permit selection of patients who could benefit most from a specific type of chemotherapy by matching their tumor and individual genetic profile. Nevertheless, this potential has been limited so far by reliance on the single biomarker approach, though this is now on the way to being overcome through whole genome studies.

**Keywords:** DNA repair • drug metabolism • lung cancer • personalized medicine • pharmacogenomics • tailored therapy • targeted therapy

### Introduction

Lung cancer remains the leading cause of cancer-related death worldwide [1,2]. Most patients with nonsmall-cell lung cancer (NSCLC) are diagnosed in advanced stages, when chemotherapy is generally considered palliative treatment. In recent years, such treatment has proved not only to prolong survival but also improve quality of life (including reduction of disease-related symptoms) for these patients [3]. Even today, after all the advances in therapeutic oncology, both therapeutic failure and – sometimes extensive – side effects of the drugs employed remain a challenge. Due to growing knowledge, the generalized, nonindividualized, mechanistic use of very expensive treatments is becoming less acceptable over time.

Pharmacogenomics has emerged as a means of individualizing treatment by taking into account hereditary genetic information and has become essential to modern medical oncology (Figure 1). It first became a scientific discipline in 1959 in order to investigate the unequal responses observed in different

patients treated with the same medication, particularly in terms of clinical efficacy and adverse reactions [4]. The term pharmacogenomics [5] was first referred to in the literature in 1998. However, ‘pharmacogenetics’ is also commonly found and both terms are acceptable. Advances in drug development, pharmacogenomics and molecular characterization of tumors have become key tools for individualized treatment selection. In recent years, sequencing the genome of several human cancers has shed light on this issue by revealing a series of alterations, such as somatic gene mutations, microsatellites, deletions or insertions resulting either from loss of gain of DNA segments, and variations in copy number by loss and gain of large portions of DNA (aneuploidy, loss of heterozygosity). Single nucleotide polymorphisms (SNPs), a somatic mutation, have appeared as the most common variation detected.

In general, cancer therapy is based on the concept that patients with specific types and stages of cancer should be treated according to standardized, predetermined protocols [6].

Daniela Morales-Espinosa<sup>\*1,2,3,4</sup>, Silvia García-Román<sup>5</sup>, Niki Karachaliou<sup>4</sup> & Rafael Rosell<sup>1,4,5,6</sup>

<sup>1</sup>Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology, Hospital Universitari Germans Trias I Pujol, Ctra Canyet s/n, Badalona, 08916 Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Fundación Clínica, Médica Sur, Mexico City, Mexico

<sup>3</sup>Carcinogenesis Laboratory, National Cancer Institute, Mexico City, México

<sup>4</sup>Dr Rosell Oncology Institute, Quirón Dexeus University Hospital, Barcelona, Spain

<sup>5</sup>Pangaea Biotech S.L., Barcelona, Spain

<sup>6</sup>Molecular Oncology Research (MORE) Foundation, Barcelona, Spain

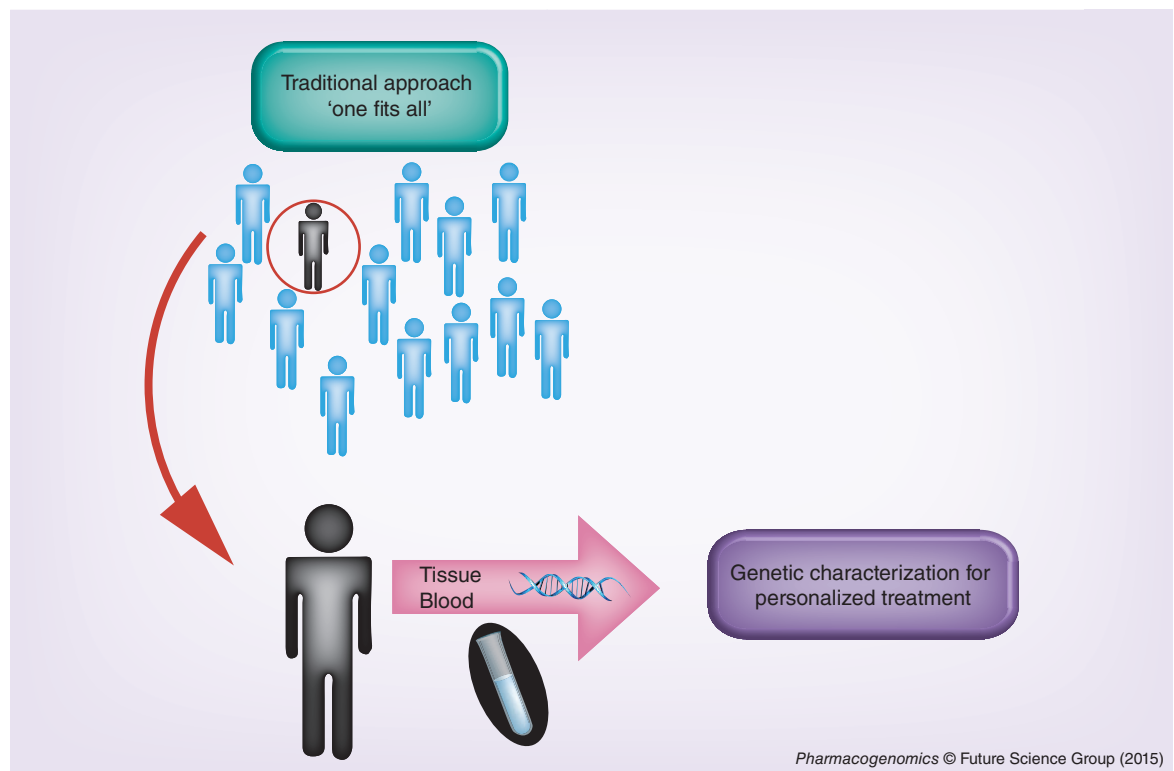
\*Author for correspondence:

Tel.: +34 93 497 8925

Fax: +34 93 497 8950

[dra.dana.morales@gmail.com](mailto:dra.dana.morales@gmail.com)





**Figure 1. Approach for personalized treatment in nonsmall-cell lung cancer.** The traditional ‘one fits all’ approach has changed to personalized treatment through genetic characterization.

Most patients present with advanced stages of disease, mainly due to lack of symptoms at an early stage. However, even among those in whom the disease is detected at early, resectable stages, most will die due to disease recurrence. The fact that long-term survival of NSCLC patients is still disappointing may be a reflection of our limited knowledge of the specific molecular abnormalities harbored by the neoplastic tissue of each patient.

The activity of cell membrane receptors and their intracellular signal transduction pathways is strongly associated with disease progression. These signaling pathways regulate several cell functions including angiogenesis, motility, adhesion and apoptosis [7,8]. The role of SNPs, variations in copy number and mutations in a number of genes has recently been emphasized by various studies.

### Predictive models

The ability to predict how a cancer patient will respond to a particular treatment regimen is one of the most ambitious goals of personalized oncology. Also, pharmacogenomic-based studies of anticancer agents are complicated by the existence of additional somatic mutations within the tumor, as well as by the genetic heterogeneity of the population [9]. One of the most important issues to address in pharmacogenomics is sample size, taking into account both the time required

to complete the study population and the costs this implies. There are few tools which have been designed and approved for genetic testing in lung cancer; Lungscape and other tools for testing in early lung cancer are not readily available. Recently, the Pervenio™ Lung RS (risk score) – a 14-gene expression assay using quantitative PCR – became available. Pervenio is based on two large independent studies that included 1800 patients. In the validation cohort, 5-year overall survival was 49.2% (42.2–55.8) in high-risk patients compared with 58.3% (48.9–66.6) and 71.4% for the intermediate and low-risk groups, respectively [10]. This platform is intended to improve risk stratification of patients with early-stage, nonsquamous NSCLC at high risk of mortality after surgical treatment.

### Genome-wide association study

A different approach that has recently gained attention is the genome-wide association study (GWAS). These are aimed to identify genetic associations to absence or presence of a disease through the entire human genome [11]. In GWAS, a large quantity (hundreds of thousands) of SNPs are tested for association with a specific condition in large cohorts of individuals [12].

GWAS has been performed in order to identify prognostic factors such as one evaluating 906,703 SNPs in early-stage Chinese NSCLC patients showed

that CAMK2D rs10023113 has a combined response rate (RR) of 2.3 in two independent populations [13]; and another one analyzing SNPs associated to overall survival (OS) in small cell lung cancer (SCLC) patients from Korea treated with cisplatin-irinotecan as first-line therapy [14] just to mention a couple of examples.

## Conventional chemotherapy

### Cisplatin

Platinum-based chemotherapy has shown to improve both overall survival and quality of life in NSCLC patients [15]. Nevertheless, response to these treatments is not homogenous. Many patients have an unsatisfactory response and results in patients with similar clinical conditions vary greatly. *Cis*-diamminedichloroplatinum (cisplatin) is one of the most widely used chemotherapy agents and was the first member of this class of compounds to be developed [15,16]. Cisplatin exerts its antineoplastic activity by forming DNA adducts (cross-linking) that will ultimately lead to apoptosis. Several resistance mechanisms such as increased drug inactivation and DNA adduct repair have been described [17].

*ERCC1* is a rate-limiting enzyme responsible for incision cleaving the damaged strand of the DNA lesion. Therefore, patients with high levels of *ERCC1* expression are supposed to be resistant to platinum agents and have diminished survival. It has been shown that NSCLC patients with low expression of *ERCC1* receiving cisplatin-based chemotherapy have longer overall survival [18]. Not only have *ERCC1* mRNA expression levels been studied but also a Phase III study by Bepler *et al.* measured *ERCC1* and ribonucleotide reductase subunit M1 (RRM1) protein levels in patients with advanced NSCLC. Patients were randomly allocated to either the molecular analysis directed (experimental group) or the control arm. The experimental group was further divided according to protein levels of *ERCC1* and RRM1 (gemcitabine/carboplatin if RRM1 and *ERCC1* were low, docetaxel/carboplatin if RRM1 was high and *ERCC1* was low, gemcitabine/docetaxel if RRM1 was low and *ERCC1* was high, and docetaxel/vinorelbine if both were high). The control arm received standard chemotherapy (gemcitabine/carboplatin). Nevertheless, the trial failed to prove its objective: no survival or response rate benefit was observed with individualized therapy [19].

Recently, a Phase II trial addressing use of customized adjuvant therapy was published. The authors customized adjuvant treatment according to the presence of *ERCC1* by immunohistochemistry (IHC) in stage II or IIIA NSCLC. Patients with mutations in the *EGFR* gene received erlotinib, *ERCC1*-negative patients

received four cycles of cisplatin plus pemetrexed and *ERCC1* positive patients underwent follow-up. The Phase III of the trial was canceled due to the lack of reliability of the IHC readouts of *ERCC1* [20], illustrating the difficulty in finding a reliable biomarker, a common problem in personalized medicine.

SNPs in *ERCC1* have also been studied and have been associated to response to cisplatin duplets in NSCLC patients [21]. In this study, CDA Lys [22] was suggested as a possible predictive marker of overall survival, time to progression and activity as well as toxicity in NSCLC patients that received cisplatin and gemcitabine as treatment. Also, it has been reported that patients with a SNPs in *ERCC1* (118C/T) have longer survival [23]. The DNA repair mechanisms involved in the removal of DNA adducts may be impaired by SNPs through nucleotide excision repair, DNA double-strand recombination repair and base excision repair [24].

### Pemetrexed

Another example of pharmacogenomics in systemic chemotherapy is pemetrexed. This agent (Alimta<sup>®</sup>, Eli Lilly) is an antifolate inhibitor of thymidilate synthase (TS), dihydrofolate reductase (DHFR) and glycinamide ribonucleotide formyltransferase (GARFT) [25]. In 2008, a Phase III study by Scagliotti *et al.* comparing cisplatin/pemetrexed versus cisplatin/gemcitabine showed for the first time a survival difference in favor of cisplatin/pemetrexed in two histologic groups (adenocarcinoma and large cell carcinoma). The first group had significantly better survival (12.6 vs 10.9 months) [26], something which may be explained by the fact that TS levels are generally lower in adenocarcinoma [27]. Preclinical data suggest that overexpression of TS correlates with reduced sensitivity to pemetrexed [22]; this is corroborated by a recent meta-analysis. The authors concluded that TS may be a suitable marker of sensitivity to pemetrexed-based chemotherapy in NSCLC patients [28]. Most studies are retrospective and the results – despite being encouraging for the use of TS – were not consistent. Some studies such as the published by Chang *et al.* did not show statistically significant results supporting the use of TS as a potential biomarker [29]. A very recent prospective study stratified the patients according to TS expression by IHC showed better response rate and progression-free survival for pemetrexed/cisplatin in the group lacking TS expression [30]. Nevertheless, this is not yet a standard recommendation for clinical practice.

Another enzyme involved in the pyrimidine synthesis pathway, the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) increases the activity of TS, therefore promoting a lower therapeutic effect of antifolate in

patients [31]. This among other polymorphisms has been suggested as molecular predictive markers by some publications in both SCLC and NSCLC [32,33]; but the results are not encouraging enough to promote these tests in the regular practice.

### Gemcitabine

This chemotherapeutic agent is one of the most widely used pyrimidine analogues, with a very well-established role in first-line treatment of advanced NSCLC. Several studies have examined molecular determinants of sensitivity to gemcitabine. Potential candidates to predict response include genes encoding drug metabolism enzymes, transport across membranes or target proteins. One example is human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1), which transports gemcitabine into cells. hENT1 basal expression levels have been correlated with  $IC_{50}$  values for gemcitabine in several NSCLC cell lines [34]. Also, expression of *hENT1* has been analyzed by IHC, suggesting that absence of *hENT1* expression may be used to predict response to gemcitabine-based chemotherapy [35]. Nevertheless, prospective studies are still required to validate this and the most accurate method to determine it remains to be decided.

RRM1 is an enzyme involved in the metabolism of gemcitabine. Patients with NSCLC tumors treated with a cisplatin/gemcitabine duplet overexpressing *RRM1* mRNA have been found to have a shorter median overall survival when compared with patients with low expression levels of this enzyme in retrospective studies [36–38]. Prospective studies are needed to validate these data.

About 90% of gemcitabine is inactivated by cytidine deaminase (*CDA*) [39]. In 2007, the role of *CDA* polymorphisms was brought out in a study reporting that the *CDA* 208A allele variant was associated with lower gemcitabine clearance, hence greater hematological toxicity [40]. Another three functional polymorphisms of *CDA* related to clinical outcome in patients treated with gemcitabine have been found following Sugiyama's report [41–43].

### Taxanes

Taxanes agents are diterpenes produced by the plants of the genus *Taxus* (yews), and include paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere). Their action is based on disruption of microtubule function; microtubules are essential to cell division, and taxanes stabilize guanosinediphosphate (GDP)-bound tubulin in the microtubule, thereby inhibiting the process of cell division. Thus, in essence, taxanes are mitotic inhibitors [44,45].

*BRCA1* has a crucial role in DNA damage repair, control of transcription, regulation of the cell cycle

and apoptosis; decreased *BRCA1* mRNA expression is known to be related to hereditary and sporadic cancers such as breast [46,47]. *BRCA1* has been long studied in retrospective and prospective trials, whose findings suggest its great value as a potential biomarker [47,48]. The Spanish Lung Cancer Group (SLCG) recently presented the results of the BREC trial, a good example of the complexity of modern pharmacogenomics. Investigators allocated patients to three different customized therapy arms according to *RAP80* and *BRCA1* expression and results of the interim analysis were presented last year at the 50th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology. The study was closed early due to negative results, possibly due to the poor capacity of *RAP80* as a predictor [49]. As commented, this illustrates the difficulty of finding accurate biomarkers.

Thymidine phosphorylase (TP) allows classification of patients as high-expression and low-expression according to the median value of its expression, with significantly longer time to progression in the high-TP group. In some trials, it has been observed that TP expression may be a prognostic factor in breast cancer patients treated with capecitabine-based first-line chemotherapy and  $\beta$ III-tubulin can predict outcome of capecitabine in combination with taxanes as first-line chemotherapy [50].

Overexpression of the *MDR-1* gene product Pgp has been extensively studied *in vitro* in association with taxane resistance, but data are conflicting. Similarly, the target components microtubules failed to confirm such associations. Moreover, little consensus has been reached for reported associations between taxane-sensitivity and mutated *p53*, or taxane-resistance and overexpression of *Bcl-2*, *Bcl-xL* or *NFkB*. In contrast, the most notable finding is that pharmaceutical downregulation of *HER-2* appears to reverse taxane resistance [50].

### Targeted therapy

Personalized treatment of lung cancer, although quite common in daily clinical practice in some parts of the world is not in widespread use in others. There is an urgent need to improve treatment strategies, especially for those patients with advanced disease who are not candidates for targeted treatments such as erlotinib for *EGFR*-mutated patients, crizotinib for *ALK*-translocated patients, among others (Table 1).

For early-stage disease, surgery remains the treatment of choice and offers the best opportunities for long-term survival. In patients with advanced NSCLC, cytotoxic chemotherapy is associated with a response rate of approximately 20–35% and median survival of 12 months, despite the improvement in overall sur-

Table 1. Currently used pharmacogenomic biomarkers to select treatment in nonsmall-cell lung cancer.		
Biomarker	Genetic alteration	Therapeutic agent
<i>EGFR</i>	Tumor-activating <i>EGFR</i> mutations (exons 18–21)	Gefitinib Erlotinib Afatinib Dacomitinib <sup>†</sup> AZD9291 <sup>†</sup> Rociletinib <sup>†</sup>
<i>ALK</i>	<i>EML4-ALK</i> rearrangement	Crizotinib Ceritinib Alectinib <sup>†</sup> Brigatinib <sup>†</sup> PF-06463922 <sup>†</sup>
<i>ROS1</i>	<i>ROS1</i> rearrangement	Crizotinib PF-06463922 <sup>†</sup>
<i>BRAF</i>	<i>BRAF</i> V600E mutation	Vemurafenib <sup>†</sup> Dabrafenib <sup>†</sup>

<sup>†</sup>Agents used under clinical trials.

vival attained with multiple drug regimens. Despite the success of targeted cancer therapy, most patients eventually develop lethal drug resistance and disease progression. The biological basis of resistance remains incompletely characterized since only a small number of preclinical models and specific genes in resistant tumors have been analyzed to date.

### Tyrosine kinase inhibitors

NSCLC is one of the patient populations that has benefited most from molecular analysis-directed selection of therapeutic agents; this approach has resulted in a benefit in progression-free survival [51–53]. Nevertheless, in solid tumors potentially actionable molecular alterations are rare and resistance is known to develop within a relatively short period of time. Current use of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in lung cancer is based on targeting specific molecular abnormalities present in neoplastic cells, making it crucial to have molecular-targeted dependence and detailed patient selection.

### *EGFR* inhibitors

The clearest example of this is use of TKIs against *EGFR* such as gefitinib (Iressa®, Astra-Zeneca) and erlotinib (Tarceva®, Roche). *EGFR* – also known as *ErbB1* or *HER1* – is another member of the HER family and plays an important role in proliferation of neoplastic cells and development of metastasis; *EGFR* has been shown to be overexpressed in NSCLC [54] and

pre-malignant tissue [55,56]. Gefitinib was first approved by the US FDA in May 2003 as third-line treatment for NSCLC. Tumors with a gain-of-function somatic mutation in *EGFR* can account for response to *EGFR* TKIs in some NSCLC patients [51]. This finding has made identification of such mutations essential to guide therapeutic approaches in some NSCLCs. Several clinical trials have been performed in order to evaluate the effect of *EGFR* TKIs when compared with chemotherapy in the first-line setting, the results obtained made it possible for these agents (erlotinib and gefitinib) to be considered as first-line treatment [57,58].

Although most *EGFR*-mutated patients have great responses to *EGFR* TKIs, most will present progressive disease within 1–2 years [57–59]. Second-generation *EGFR* inhibitors (irreversible inhibitors) such as afatinib, dacomitinib and neratinib are pan-*ErbB* inhibitors that form covalent bonds to the receptor, and therefore are biologically active [60]. About 60% of the patients will develop the presence of T790M mutation as the mechanism of resistance [61]. Two third-generation *EGFR* TKIs – AZD9291 and Rociletinib – have been recently shown activity in patients harboring the T790M *EGFR* mutation [62,63].

### *ALK* rearrangement

Some types of cancer are sensitive to specific inhibitors targeting a mutated pathway due to specific genetic lesions that work as proliferation drivers in these cells. Activating mutations or translocations of

the *ALK* gene have been identified in several types of cancer, including NSCLC. The product of this translocation (*EML4-ALK*) is a fusion gene that encodes a cytoplasmic chimeric protein with constitutive kinase activity [64,65]. Therefore, the hypothesis is that patient outcomes may be optimized by testing tumors for specific mutated pathways and directing therapies against those mutant pathways. This methodology led to one of the fastest FDA approvals in history: crizotinib was granted accelerated FDA approval less than 5 years after the first *ALK*-positive NSCLC patient was included in crizotinib trials. The accelerated approval was based on two single-arm trials, one with 136 and the other with 119 locally advanced or metastatic *ALK*-positive NSCLC patients. The primary end point in both trials was objective response rate (ORR). In the first study, this was 50%, while in the second it was 61%. These results included complete responses in 1% of treated patients, irrespectively of their performance status or number of prior chemotherapy regimens [66,67]. Final approval in 2013 was based on the demonstration of better progression-free survival (PFS) and ORR with crizotinib compared with chemotherapy in NSCLC patients harboring *ALK* rearrangements with disease progression after standard chemotherapy treatment [68].

In NSCLC, numerous genes involved in tumor proliferation are the target of agents currently in various stages of clinical development: *EGFR*, *HER2*, *ROS1*, *BRAF*, *MAPK*, *c-MET*, *PTEN*, *FGFR*, *DDR2*, *PIK3CA*, *RET*, *AKT* and *ALK* among others. The activity of these oncogenic targets occurs through various pathways such as DRC-signal transduction, phosphoinositide 3-kinase-AKT-mTOR, *RAS-RAF-MEK*, among others. To date, there are five approved targeted therapies for treatment of advanced or metastatic NSCLC: gefitinib, erlotinib and afatinib for *EGFR*-mutated patients; crizotinib for *ALK*-translocated patients and bevacizumab (which currently lacks a reliable pretreatment biomarker). Moreover, oncogenic mutant proteins are subject to regulation by protein trafficking pathways, specifically through the heat shock protein 90 (Hsp90) system [69–71]. Drug combinations affecting various nodes in these signaling and intracellular processes have been demonstrated to be synergistic and advantageous in overcoming treatment resistance compared with monotherapy approaches. Understanding the role of the tumor microenvironment in development and maintenance of the malignant phenotype has also provided additional therapeutic approaches.

### Reactive oxygen species 1

Also, *ROS1* receptor tyrosine kinase rearrangements have identified a subset of NSCLC patients sensitive

to crizotinib. This alteration is present in about 2% of NSCLC patients. A Phase I study demonstrated dramatic antitumor activity of crizotinib in *ROS1*-positive NSCLC patients, with high ORR (56%) and a generally tolerable and manageable adverse effect profile [72]. Few data are available regarding prognosis, treatment response among this population. A recent series showed that *ROS1*-translocated patients have – in general – good prognoses, with an overall survival of 36.7 months for those in stage IV [73]. Prospective studies evaluating this population are currently ongoing.

### Other markers

Other potentially actionable molecular alterations have been recently described [74,75]. Most currently ‘druggable’ genetic alterations occur mainly in rare adenocarcinomas in never smokers and are uncommon in former smokers with other histologic subtypes such as squamous cell lung cancer (SCC). No therapeutically treatable targets have yet been identified for this specific type of cancer; in general, therapeutic options for SCC are scarce. As recently described, frequent high-level amplification of *FGFR1* is present in SCC in smokers and it is interesting that this amplification has been found to sensitize tumors to *FGFR1* inhibition [74]. The alteration was previously described in lobular breast carcinomas and shown to drive endocrine resistance in such tumors [76,77]. The activation of *FGFR1* (a member of the FGFR family) leads to downstream signaling through *RAS-RAF-MEK-MAPK* and *PI3K-AKT* pathways [74]. All four FGFR members carry mutations but occur less frequently individually. *FGFR* gene fusions have been also described in NSCLC patients: *FGFR2-KIAA1967*, *BAG4-FGFR1*, *FGFR3-TACC3* and *FGFR2-CIT* [78]. A high prevalence of *FGFR1* amplification was found in SCC (≈10%) when compared with other lung cancer types (1%), suggesting it to be one of the hallmark alterations in this subset of patients, similar to amplification of *SOX2*. In SCC, *FGFR1* amplification induces a strong *FGFR1* dependency suggesting that therapeutic inhibition of *FGFR* would result in induction of apoptosis. Clinical trials with *FGFR1* inhibitors are currently ongoing [79].

*BRAF* is a serine/threonine kinase that lies downstream of *RAS* in the *RAS-RAF-MEK-ERK* signaling pathway, a key molecular cascade that regulates cell growth. These mutations are detected in 1–3% of NSCLC patients [80]; in about 40–50% of the cases, non-V600E mutations are distributed in exons 11 and 15 [81]. Currently, there are several clinical trials evaluating *BRAF* inhibition and dual *BRAF-MEK* inhibition in NSCLC bearing *BRAF* mutations; their

results may validate a new therapeutic target for this population [82].

*DDR2* has been shown to promote proliferation, survival and cell migration when activated by ligand binding and phosphorylation. Somatic mutations in the *DDR2* tyrosine kinase gene were found at a frequency of 3.8% (n = 11) in a set of 290 lung SCC samples. This rate is comparable to the fraction of lung adenocarcinoma patients bearing *ALK* translocations. An early-phase clinical trial using dasatinib or the combination of dasatinib plus erlotinib in advanced-stage lung cancer patients showed a significant reduction in tumor size 2 months after starting treatment with the combination in one of seven SCC patients without evidence of an *EGFR* mutation [83].

## Conclusion & future perspective

The use of a pharmacogenomic approach is – little by little – becoming an accepted practice in oncology (i.e., *EGFR* mutations and *ALK* translocations used to select treatment for lung cancer). New genetic markers are being discovered every day though the clinical relevance of most of them remains to be determined. However, there remains some reluctance to transfer the knowledge generated to clinical practice. This could be due to a number of reasons: issues regarding clinical methodology (retrospective studies, small number of subjects included in clinical trials, inaccurate study designs, heterogeneity of the populations studied) or laboratory problems (difficulty to standardize some tests, lack of standardized methods, current gene

### Executive summary

- Lung remains the leading cause of cancer-related death worldwide. Pharmacogenomics has emerged as one of the most promising approaches to treat oncologic diseases.

#### Predictive models

- The ability to predict treatment response is one of the main goals of personalized oncology.
- Pervenio™ Lung RS (risk score) is a platform intended to improve risk stratification of patients with early-stage, nonsquamous, non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients with high risk of mortality after surgical treatment.

#### Conventional chemotherapy

- Cisplatin:
  - Platinum-based chemotherapy remains one of the treatments of choice in NSCLC;
  - Platinum-based agents exert their antineoplastic activity by forming DNA adducts. Response to these agents is not homogeneous;
  - *ERCC1* is a rate-limiting enzyme responsible for incision cleaving the damaged strand of the DNA lesion. It is therefore thought to predict response to platinum-based agents. It remains as a nonconsistent biomarker due to the lack of reliability of immunohistochemistry readouts.
- Pemetrexed:
  - Antifolate inhibitor of thymidilate synthase, dihydrofolate reductase and glycinamide ribonucleotide formyltransferase;
  - Preclinical data suggest that overexpression of thymidilate synthase correlates with reduced sensitivity to pemetrexed;
  - This is not yet standard recommendation for clinical practice.
- Gemcitabine:
  - One of the most widely used pyrimidine analogues with a well-established role in first-line treatment of advanced NSCLC;
  - Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) has been proposed as a potential response predictor. Prospective validation studies are required and the most accurate method to determine its role remains to be decided.

#### Targeted therapy

- Tyrosine kinase inhibitors:
  - In the last decade, these agents have become the backbone treatment for advanced NSCLC patients harboring specific mutation profiles.
- *EGFR* inhibitors:
  - Tumors with gain-of-function somatic mutation in *EGFR* can account for response to *EGFR*-directed tyrosine kinase inhibitors.
- Anaplastic lymphoma kinase rearrangement:
  - Activating mutations or translocations of the *ALK* gene have been identified in NSCLC. The product of this translocation is a fusion gene encoding a cytoplasmic chimeric protein with constitutive kinase activity;
  - Crizotinib has proven activity in patients carrying this translocation conferring a benefit in both PFS and objective response rate.
- Reactive oxygen species 1:
  - Rearrangement identified in a subset of NSCLC patients sensitive to crizotinib.

approaches based on prior knowledge of gene function). With the results from more recent and well-designed prospective clinical trials, it is to be hoped that controversy surrounding results from previous trials of certain pharmacogenetic markers will soon be overcome.

More widespread uptake of novel techniques, such as Whole Genome Sequencing, together with serial rebiopsy programs, can provide the tools needed to improve pharmacogenomic research. Drug repurposing also offers a promising approach and it may not be long before we see common and older noncancer drugs used in clinical oncology practice.

## References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest; •• of considerable interest

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA. Cancer J. Clin.* 65, 5–29 (2015).
- Globocan, fact sheets by cancer. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
- Scagliotti G, Novello S. Adjuvant chemotherapy after complete resection for early stage NSCLC. *Lung Cancer* 42, 47–51 (2003).
- Vogel F. Moderne probleme der humangenetik. *Ergeb. Inn. Med. Kinderheilkd.* 12, 52–125 (1959).
- Meyer UA. Pharmacogenetics – five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat. Rev. Genet.* 5, 669–676 (2004).
- **Comprehensive review with the basis of pharmacogenomics today.**
- Gazdar AF. Personalized medicine and inhibition of EGFR signaling in lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 361, 1018–1020 (2009).
- **A considered editorial on EGFR and personalized medicine in nonsmall-cell lung cancer (NSCLC).**
- Huang YT, Heist RS, Chirieac LR *et al.* Genome-wide analysis of survival in early-stage non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 27, 2660–2667 (2009).
- Zhang Y, Martens JW, Yu JX *et al.* Copy number alterations that predict metastatic capability of human breast cancer. *Cancer Res.* 69, 3795–3801 (2009).
- Savonarola A, Palmirotra R, Guadagni F, Silvestris F. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: role of mutational analysis in anti-cancer targeted therapy. *Pharmacogenomics J.* 12, 277–286 (2012).
- Kratz JR, He J, Van Den Eeden SK *et al.* A practical molecular assay to predict survival in resected non-squamous, non-small-cell lung cancer: development and international validation studies. *Lancet* 379, 823–832 (2012).
- Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA* 299, 1335–1344 (2008).
- Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N. Engl. J. Med.* 363, 166–176 (2010).
- 13 Tang S, Pan Y, Wang Y *et al.* Genome-wide association study of survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 22, 630–635 (2014).
- 14 Han JY, Lee YS, Shin ES *et al.* A genome-wide association study of survival in small-cell lung cancer patients treated with irinotecan plus cisplatin chemotherapy. *Pharmacogenomics J.* 14, 20–27 (2013).
- 15 Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel).* 3, 1351–1371 (2011).
- 16 Long DF, Repta AJ. Cisplatin: chemistry, distribution and biotransformation. *Biopharm. Drug Dispos.* 2, 1–16 (1981).
- 17 Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22, 7265–7279 (2003).
- 18 Olaussen KA, Dunant A, Fouret P *et al.* DNA repair by *ERCC1* in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 355, 983–991 (2006).
- **A positive study of *ERCC1* and platinum sensitivity in lung cancer.**
- 19 Bepler G, Williams C, Schell MJ *et al.* Randomized International Phase III Trial of *ERCC1* and *RRM1* expression-based chemotherapy versus gemcitabine/carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 31, 2404–2412 (2013).
- 20 Wislez M, Barlesi F, Besse B *et al.* Customized adjuvant Phase II trial in patients with non-small-cell lung cancer: IFCT-0801 TASTE. *J. Clin. Oncol.* 32, 1256–1261 (2014).
- 21 Tibaldi C1, Giovannetti E, Vasile E *et al.* Correlation of *CDA*, *ERCC1*, and *XPD* polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 14, 1797–1803 (2008).
- 22 Sigmond J, Backus HH, Wouters D *et al.* Induction of resistance to the multitargeted antifolate pemetrexed (ALIMTA) in WiDr human colon cancer cells is associated with thymidylate synthase overexpression. *Biochem. Pharmacol.* 66, 431–438 (2003).
- 23 Zhou C, Ren S, Zhou S *et al.* Predictive effects of *ERCC1* and *XRCC3* SNP on efficacy of platinum-based chemotherapy in advanced NSCLC patients. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 40, 954–960 (2010).

## Financial & competing interests disclosure

D Morales-Espinosa's work is supported with grants from IASLC's Lung Cancer Research Fellowship Award and ESMO's Translational Research Fellowship Award. Work in R Rosell's Laboratory is partially supported by a grant from Fundació La Caixa. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

- 24 Matullo G, Palli D, Peluso M *et al.* *XRCCI*, *XRCC3*, *XPB* gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis* 22, 1437–1445 (2001).
- 25 Britten CD, Izbicka E, Hilsenbeck S *et al.* Activity of the multitargeted antifolate LY231514 in the human tumor cloning assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 44, 105–110 (1999).
- 26 Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J *et al.* Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 26, 3543–3551 (2008).
- **The first prospective Phase III trial in NSCLC that showed a survival difference based on histological type.**
- 27 Tanaka F, Wada H, Fukui Y, Fukushima M. Thymidylate synthase (TS) gene expression in primary lung cancer patients: a large-scale study in Japanese population. *Ann. Oncol.* 22, 1791–1797 (2011).
- 28 Wang L, Wang R, Pan Y, Sun Y, Zhang J, Chen H. The pemetrexed-containing treatments in the non-small cell lung cancer is -/low thymidylate synthase expression better than +/high thymidylate synthase expression: a meta-analysis. *BMC Cancer* 14, 205 (2014).
- 29 Chang MH, Ahn JS, Lee J *et al.* The efficacy of pemetrexed as a third- or fourth-line therapy and the significance of thymidylate synthase expression in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 69, 323–329 (2010).
- 30 Sun JM, Ahn JS, Jung SH *et al.* Pemetrexed plus cisplatin versus gemcitabine plus cisplatin according to thymidylate synthase expression in nonsquamous non-small-cell lung cancer: a biomarker-stratified randomized Phase II trial. *J. Clin. Oncol.* 33(22), 2450–2456 (2015).
- 31 Tiseo M, Giovannetti E, Tibaldi C *et al.* Pharmacogenetic study of patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with second-line pemetrexed or pemetrexed-carboplatin. *Lung Cancer* 78, 92–99 (2012).
- 32 Krawczyk P, Kucharczyk T, Kowalski DM *et al.* Polymorphisms in *TS*, *MTHFR* and *ERCC1* genes as predictive markers in first-line platinum and pemetrexed therapy in NSCLC patients. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 140, 2047–2057 (2014).
- 33 Smit EF, Socinski MA, Mullaney BP *et al.* Biomarker analysis in a Phase III study of pemetrexed-carboplatin versus etoposide-carboplatin in chemo-naïve patients with extensive-stage small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 23, 1723–1729 (2012).
- 34 Achiwa H, Oguri T, Sato S, Maeda H, Niimi T, Ueda R. Determinants of sensitivity and resistance to gemcitabine: the roles of human equilibrative nucleoside transporter 1 and deoxycytidine kinase in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 95, 753–757 (2004).
- 35 Oguri T, Achiwa H, Muramatsu H *et al.* The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 expression predicts nonresponse to gemcitabine-containing chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 256, 112–119 (2007).
- 36 Rosell R, Danenberg KD, Alberola V *et al.* Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 10, 1318–1325 (2004).
- 37 Rosell R. Pharmacogenomics and gemcitabine. *Ann. Oncol.* 17, v13–v16 (2006).
- 38 Dong X, Hao Y, Wei Y, Yin Q, Du J, Zhao X. Response to first-line chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer according to RRM1 expression. *PLoS ONE* 9, e92320 (2014).
- 39 Wong A, Soo RA, Yong WP, Innocenti F. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine. *Drug Metab. Rev.* 41, 77–88 (2009).
- 40 Sugiyama E, Kaniwa N, Kim SR *et al.* Pharmacokinetics of gemcitabine in Japanese cancer patients: the impact of a cytidine deaminase polymorphism. *J. Clin. Oncol.* 25, 32–42 (2007).
- 41 Gilbert JA, Salavaggione OE, Ji Y *et al.* Gemcitabine pharmacogenomics: cytidine deaminase and deoxycytidylate deaminase gene resequencing and functional genomics. *Clin. Cancer Res.* 12, 1794–1803 (2006).
- 42 Joerger M, Burgers JA, Baas P *et al.* Gene polymorphisms, pharmacokinetics, and hematological toxicity in advanced non-small-cell lung cancer patients receiving cisplatin/gemcitabine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 69, 25–33 (2012).
- 43 Okazaki T, Javle M, Tanaka M, Abbruzzese JL, Li D. Single nucleotide polymorphisms of gemcitabine metabolic genes and pancreatic cancer survival and drug toxicity. *Clin. Cancer Res.* 16, 320–329 (2010).
- 44 Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature* 277, 665–667 (1979).
- 45 Yared JA, Tkaczuk KHR. Update on taxane development: new analogs and new formulations. *Drug Des. Devel. Ther.* 6, 371–384 (2012).
- 46 Kennedy RD, Quinn JE, Johnston PG, Harkin DP. BRCA1: mechanisms of inactivation and implications for management of patients. *Lancet* 360, 1007–1014 (2002).
- 47 Taron M1, Rosell R, Felip E *et al.* BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2443–2449 (2004).
- 48 Rosell R, Perez-Roca L, Sanchez JJ *et al.* Customized treatment in non-small-cell lung cancer based on *EGFR* mutations and BRCA1 mRNA expression. *PLoS ONE* 4, e5133 (2009).
- 49 Moran T, Cobo M, Domine M *et al.* Interim analysis of the Spanish Lung Cancer Group (SLCG) BRCA1-RAP80 Expression Customization (BREC) randomized Phase III trial of customized therapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) (NCT00617656/GECP-BREC). *ASCO Meet. Abstr.* 31, LBA8002 (2013).
- 50 Zhao HY, Huang H, Hu ZH *et al.* Evaluations of biomarkers associated with sensitivity to 5-fluorouracil and taxanes for recurrent/advanced breast cancer patients treated with capecitabine-based first-line chemotherapy. *Anticancer Drugs* 23, 534–542 (2012).
- 51 Lynch TJ, Bell DW, Sordella R *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 350, 2129–2139 (2004).



- 52 Paez JG, Jänne PA, Lee JC *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497–1500 (2004).
- 53 Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR *et al.* Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 363, 1693–1703 (2010).
- **One of the first publications on ALK inhibitors in NSCLC.**
- 54 Hirsch FR, Scagliotti GV, Langer CJ, Varella-Garcia M, Franklin WA. Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: perspectives for targeted therapies. *Lung Cancer* 41(Suppl. 1), S29–S42 (2003).
- 55 Kurie JM, Shin HJ, Lee JS *et al.* Increased epidermal growth factor receptor expression in metaplastic bronchial epithelium. *Clin. Cancer Res.* 2, 1787–1793 (1996).
- 56 Franklin WA, Veve R, Hirsch FR, Helfrich BA, Bunn PA. Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *Semin. Oncol.* 29, 3–14 (2002).
- 57 Mok TS, Wu YL, Thongprasert S *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* 361, 947–957 (2009).
- 58 Rosell R, Carcereny E, Gervais R *et al.* Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised Phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 13, 239–246 (2012).
- 59 Yang JC, Hirsh V, Schuler M *et al.* Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J. Clin. Oncol.* 31, 3327–3334 (2013).
- 60 Ninomiya T, Takigawa N, Ichihara E *et al.* Afatinib prolongs survival compared with gefitinib in an epidermal growth factor receptor-driven lung cancer model. *Mol. Cancer Ther.* 12, 589–597 (2013).
- 61 Costa C, Molina MA, Drozdowskyj A *et al.* The impact of EGFR T790M mutations and BIM mRNA expression on outcome in patients with EGFR-mutant NSCLC treated with erlotinib or chemotherapy in the randomized Phase III EURTAC trial. *Clin. Cancer Res.* 20, 2001–2010 (2014).
- 62 Sequist LV, Soria JC, Goldman JW *et al.* Rociletinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 372, 1700–1709 (2015).
- 63 Jänne PA, Yang JC, Kim DW *et al.* AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 372, 1689–1699 (2015).
- 64 Soda M, Choi YL, Enomoto M *et al.* Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448, 561–566 (2007).
- 65 Takeuchi K, Soda M, Togashi Y *et al.* RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat. Med.* 18, 378–381 (2012).
- 66 Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL *et al.* Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a Phase I study. *Lancet Oncol.* 13, 1011–1019 (2012).
- 67 Kim DW, Ahn MJ, Shi Y *et al.* Results of a global Phase II study with crizotinib in advanced ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC). *ASCO Meet. Abstr.* 30, 7533 (2012).
- 68 Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K *et al.* Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 368, 2385–2394 (2013).
- 69 Zhong LI, Peng X, Hidalgo GE *et al.* Antibodies to HSP70 and HSP90 in serum in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Detect. Prev.* 27, 285–290 (2003).
- 70 Shimamura T, Shapiro GI. Heat shock protein 90 inhibition in lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 3, S152–S159 (2008).
- 71 Pillai RN, Ramalingam SS. Heat shock protein 90 inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 26, 159–164 (2014).
- 72 Ou SHI, Bang YJ, Camidge DR *et al.* Efficacy and safety of crizotinib in patients with advanced ROS1-rearranged non-small cell lung cancer (NSCLC). *ASCO Meet. Abstr.* 31, 8032 (2013).
- 73 Scheffler M, Schultheis A, Teixido C *et al.* ROS1 rearrangements in lung adenocarcinoma: prognostic impact, therapeutic options and genetic variability. *Oncotarget* 6, 10577–10585 (2015).
- 74 Weiss J, Sos ML, Seidel D *et al.* Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci. Transl. Med.* 2, 62ra93 (2010).
- 75 Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH *et al.* Mutations in the *DDR2* kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov.* 1, 78–89 (2011).
- 76 Reis-Filho JS, Simpson PT, Turner NC *et al.* FGFR1 emerges as a potential therapeutic target for lobular breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 12, 6652–6662 (2006).
- 77 Turner N, Pearson A, Sharpe R *et al.* FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* 70, 2085–2094 (2010).
- 78 Wu YM, Su F, Kalyana-Sundaram S *et al.* Identification of targetable *FGFR* gene fusions in diverse cancers. *Cancer Discov.* 3, 636–647 (2013).
- 79 Search of: FGFR1 NSCLC – list results – ClinicalTrials.gov. [www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term](http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term)
- 80 Chen D, Zhang LQ, Huang JF *et al.* BRAF mutations in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 9, e101354 (2014).
- 81 Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S *et al.* Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *J. Clin. Oncol.* 29, 3574–3579 (2011).
- 82 Cardarella S, Ogino A, Nishino M *et al.* Clinical, pathologic, and biologic features associated with BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 19, 4532–4540 (2013).
- 83 Haura EB, Tanvetyanon T, Chiappori A *et al.* Phase I/II study of the Src inhibitor dasatinib in combination with erlotinib in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 1387–1394 (2010).

# Immunotherapy meets targeted therapy: will this team end the war against cancer?

Daniela Morales-Espinosa<sup>1\*</sup>, Silvia García-Román<sup>2,3\*</sup>, Cristina Teixidó<sup>2</sup>, Niki Karachaliou<sup>2</sup>, Rafael Rosell<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Rosell Oncology Institute, Quirón-Dexeus University Hospital, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Pangaea Biotech, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Institut Quimic de Sarriá, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Institut Catalá d'Oncologia, Badalona, Spain

*Contributions:* (I) Conception and design: D Morales-Espinosa, S García-Román; (II) Administrative support: None; (III) Provision of study materials or patients: None; (IV) Collection and assembly of data: None; (V) Data analysis and interpretation: None; (VI) Manuscript writing: All authors; (VII) Final approval of manuscript: All authors.

\*These two authors contribute equally to this work.

*Correspondence to:* Daniela Morales-Espinosa. Rosell Oncology Institute, Quirón-Dexeus University Hospital, Barcelona, Spain.

Email: dra.dana.morales@gmail.com.

**Abstract:** Cancer treatment as we know it today has dramatically changed over the last couple of decades. It has moved from non-specific treatment to personalized approaches. As oncologist, we now have further understanding of the processes leading to carcinogenesis; this has led to develop new therapeutic options. We have cytotoxic treatments, targeted therapy and in recent years, immunotherapy; the time to “mix and match” has begun.

**Keywords:** Immunotherapy; targeted therapy; cancer; combination therapy; personalized treatment

Submitted Nov 09, 2015. Accepted for publication Nov 23, 2015.

doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2015.12.05

**View this article at:** <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2015.12.05>

## Introduction

Cancer remains one of the main causes of morbidity and mortality worldwide; with lung cancer as the leading cause of cancer-related death for the last years (1,2). Targeted therapies have become part of our daily armamentarium against lung and other types of cancer. A new era since the development of immunotherapy has arrived, where the most widely studied scenario is melanoma. Most of the works mentioned in this review relate to this particular disease; but time has shown that those finding most of the time can be adapted to lung cancer (3).

## Immunotherapy

The immune system recruitment may represent a powerful and innovative strategy in cancer therapy; cancer immunotherapy is likely to become a fundamental part of modern oncology. The number of clinical trials involving immunotherapy has skyrocketed. As previously mentioned, its main goal is to suppress the mechanisms of resistance of cancer cells to tyrosine kinase inhibitors (TKIs) restore

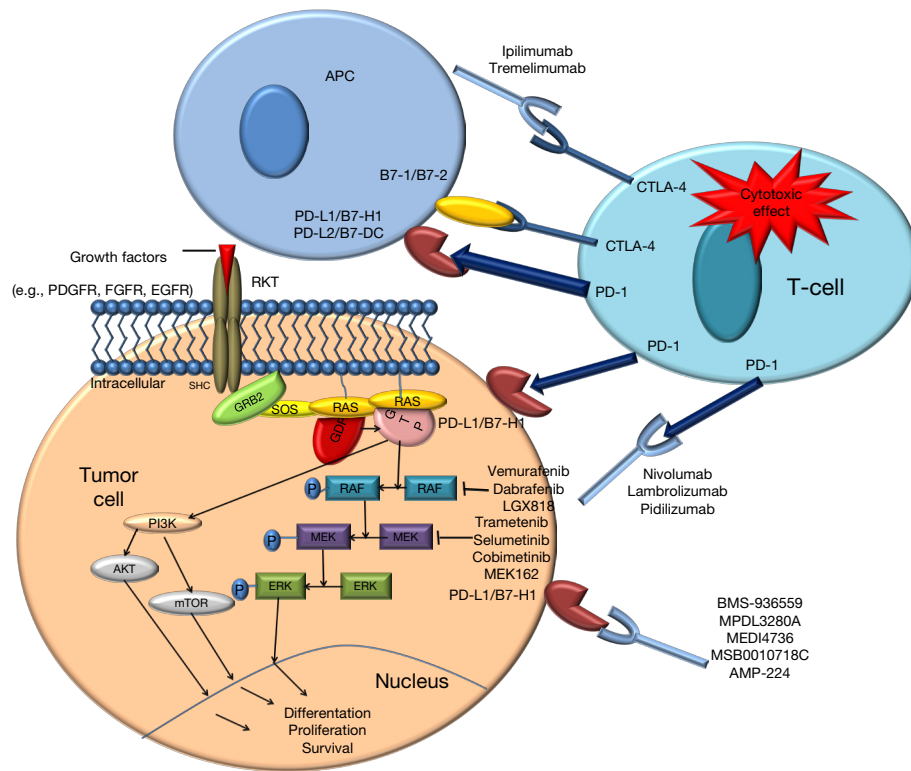
the availability of antigens to cytotoxic T lymphocytes and antigen presenting cells (APCs) and to restore the function of these cells and T lymphocytes (4).

The first effective immunotherapies approved by the US Food and Drug Administration in melanoma included interleukin-2 for metastatic disease and interferon alpha in the adjuvant setting. These were followed by a group of new therapies, including checkpoint-blocking antibodies targeting cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 and programmed cell death protein 1 due to their relevance in the maintenance of peripheral immune tolerance (5).

One of the new standards of care in melanoma—Ipilimumab—showed enhanced overall survival with durable responses, lasting even longer than 30 months in about 20% of the treated population (6,7).

However, its combination with other antibodies such as Nivolumab has shown to have complementary activity in metastatic melanoma. This combination resulted in significantly longer progression-free survival than ipilimumab alone (8,9).

Nivolumab and Pembrolizumab are two FDA-approved



**Figure 1** Interactions between immunotherapy and targeted therapy. T-cell activation is a consequence of two simultaneous processes, the expression of protein B7 and antigen presentation by antigen presenting cells (APCs) to T-cell receptor. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway is responsible for differentiation, proliferation, and survival of the cells. Mutations on particular stages of the pathway lead to uncontrolled enhancements of these processes. The abrogation of the MAPK cascade causes cell death and the inhibition of activated T-cells occurs as a result of the expression of CTLA-4 and PD-1 receptor on T-cells' surface. The combination of both theoretically improves treatment success.

monoclonal antibodies that block the programmed death-1 receptor (PD-1, CD279), resulting in dis-inhibition of tumor-specific immune responses. They show highly durable response rates and long-term safety, validating the importance of the programmed cell death protein 1 pathway blockade for treatment of several malignances (10,11).

Although drug-related adverse events have been reported in a majority of patients receiving either Pembrolizumab or Nivolumab, only 8% to 15% experienced significant side effects (grade 3–5). Serious immune related events such as dermatitis, diarrhea/colitis, hepatitis, and pancreatitis have been reported in relatively few patients (up to 2%) (12-14).

### A glance at targeted therapy

Targeted therapies exert their activity by blocking an essential mutant protein or pathway required for tumor survival and growth (15). These treatments had become

familiar assets in our daily practice. We all have seen their effects, the striking regressions in some patients defined by their molecular profiles (i.e., *EGFR* mutated and *EML4-ALK* translocated patients); nevertheless, such impressive responses are followed by progressive disease due to drug-resistance variants in most cases (16-18).

### Rationale for the combination of both strategies

By looking at the weaknesses and strengths of both approaches, it seems that their combination may be synergistic against cancer. Among the properties of targeted therapies that enhance immunotherapy are promotion of dendritic cell maturation; trigger of both activation and differentiation of memory T-cells; an increase in the expression of death receptors and a diminution of survival signals that sensitizes malignant cells to immune-mediated death (*Figure 1*).

Not only are the responses to the combination of these approaches under evaluation; but is also of great interest to find the appropriate dose, timing and best sequence of them in order to achieve successful results. Not to forget that the intensification of the response might lead to higher toxicity.

Moreover, the oncogene addiction held by malignant tumors is broken by targeted therapies; this effect may potentiate the immune response against the tumor and thus facilitate tumor clearance by T-cells (19,20).

## Conclusions

Decades of research are now leading to what seems the ultimate strategy against cancer. The understanding of the molecular pathways involved in the development of malignancies and the discovery of specific targets and targeted therapies against them; as well as the widespread understanding of the role of immunotherapy in cancer has led to a progress in the development of new treatments. The gap between “bench and bed” is getting smaller. The combination of both strategies seems to be synergistic and in the future, we will know if it truly leads to the awaited cure. Many clinical trials are ongoing whose results are highly expected.

## Acknowledgements

D. Morales-Espinosa's work is supported with grants from IASLC's Lung Cancer Research Fellowship Award and ESMO's Translational Research Fellowship Award. Work in R. Rosell's Laboratory is partially supported by a grant from Fundació La Caixa.

## Footnote

*Conflicts of Interest:* The authors have no conflicts of interest to declare.

## References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015;65:5-29.
2. Globocan, fact sheets by cancer. Available online: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
3. Pennell NA. Understanding the Rationale for Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Semin Oncol* 2015 Oct;42 Suppl 2:S3-S10.
4. Talmadge JE. Development of immunotherapeutic strategies for the treatment of malignant neoplasms. *Biotherapy* 1992;4:215-36.
5. Snyder A, Zamarin D, Wolchok JD. Immunotherapy of Melanoma. *Prog Tumor Res* 2015;42:22-9.
6. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:711-23.
7. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011;364:2517-26.
8. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 2015;373:23-34.
9. Somasundaram R, Herlyn M. Nivolumab in combination with ipilimumab for the treatment of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2015;15:1135-41.
10. Wolchok JD. PD-1 Blockers. *Cell* 2015;162:937.
11. Faghfuri E, Faramarzi MA, Nikfar S, et al. Nivolumab and pembrolizumab as immune-modulating monoclonal antibodies targeting the PD-1 receptor to treat melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2015;15:981-93.
12. Robert C, Ribas A, Wolchok JD, et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet* 2014;384:1109-17.
13. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2443-54.
14. Robert C, Long GV, Brady B, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* 2015;372:320-30.
15. Druker BJ. David A. Karnofsky Award lecture. Imatinib as a paradigm of targeted therapies. *J Clin Oncol* 2003;21:239s-245s.
16. Costa C, Molina MA, Drozdowskyj A, et al. The impact of EGFR T790M mutations and BIM mRNA expression on outcome in patients with EGFR-mutant NSCLC treated with erlotinib or chemotherapy in the randomized phase III EURTAC trial. *Clin Cancer Res* 2014;20:2001-10.
17. Morales-Espinosa D, García-Román S, Karachaliou N, et al. Pharmacogenomics in the treatment of lung cancer: an update. *Pharmacogenomics* 2015;16:1751-60.
18. Rosell R, Karachaliou N, Morales-Espinosa D, et al. Adaptive resistance to targeted therapies in cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2013;2:152-9.
19. Chiarle R, Martinengo C, Mastini C, et al. The anaplastic lymphoma kinase is an effective oncoantigen for lymphoma

- vaccination. *Nat Med* 2008;14:676-80.
20. Farsaci B, Higgins JP, Hodge JW. Consequence of dose scheduling of sunitinib on host immune response elements and vaccine combination therapy. *Int J Cancer* 2012;130:1948-59.

**Cite this article as:** Morales-Espinosa D, García-Román S, Teixidó C, Karachaliou N, Rosell R. Immunotherapy meets targeted therapy: will this team end the war against cancer?. *Transl Lung Cancer Res* 2015. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2015.12.05

## A critical question for cancer therapy: what new targets exist?

Rafael Rosell<sup>1,2</sup>, Niki Karachaliou<sup>3</sup>, Jordi Codony<sup>4</sup>, Cristina Teixido<sup>4</sup>, Silvia Garcia-Roman<sup>5</sup>, Daniela Morales<sup>6</sup>, María González Cao<sup>3</sup>, Santiago Viteri<sup>3</sup>, Ignacio Veliz<sup>7</sup>, Yong Loo<sup>7</sup>, Omar Castillo<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Cancer Biology and Precision Medicine Program, Catalan Institute of Oncology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; <sup>2</sup>Molecular Oncology Research (MORe) Foundation, Sabino Arana 5-19, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Instituto Oncológico Dr Rosell, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Pangaea Biotech S.L, Sabino Arana 5-19, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Institut Químic de Sarrià, Via Augusta 390, Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Fundació Institut de Investigació Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; <sup>7</sup>Instituto Oncológico Nacional, Calle Gorgas, Ancon, Panamá

Correspondence to: Rafael Rosell, MD. Director, Cancer Biology & Precision Medicine Program, Catalan Institute of Oncology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain. Email: rrosell@iconcologia.net.

**Abstract:** Designing molecular targeted therapy with high specificity based on novel tumor biomarkers is a high priority in lung cancer research. Several molecular aberrations have been already identified in non-small cell lung cancer (NSCLC), with subsequent development of drugs targeted to these aberrations. A more recent actionable target is MET, a multifaceted receptor tyrosine kinase which frequently interacts with other key oncogenic tyrosine kinases including epidermal growth factor receptor (EGFR) and ERBB3 leading to resistance to anti-EGFR therapies. However a phase III trial enrolling only patients with MET-positive tumors was stopped in early March due to futility since there was no evidence that the addition of onartuzumab to erlotinib has any positive effect. From the results of the MET lung phase III trial, we provide new pieces of information that can contribute to further preclinical validation and also be part of the armamentarium for clinical translational research.

**Keywords:** Epidermal growth factor receptor (EGFR); non-small cell lung cancer (NSCLC); MET; targeted therapy

Submitted Jul 28, 2014. Accepted for publication Jul 30, 2014.

doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2014.08.10

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2014.08.10>

Lung cancer is still a common disease with dismal prognosis. However, several driver lesions have been identified which can permit the use of targeted therapy. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations, ALK and ROS1 translocations have become part of the molecular diagnosis of patients, particularly in lung adenocarcinoma (1). Triple negative lung adenocarcinomas (EGFR, ALK and ROS1 negative) should be examined for other potentially druggable mutations such as HER2, BRAF, PIK3CA and NRAS among others (2). KRAS is also a common alteration for which no specific therapy yet exists. We still do not know how to take advantage of the fact that many non-small cell lung cancers (NSCLC) exhibit oncogenic kinase signaling through several receptor protein tyrosine kinases (RTKs), not only EGFR but also MET and RON, EPHA2, AXL, RET, TRKA and FGFR1 (3). In NSCLC, MET can be overexpressed along with hepatocyte growth factor (HGF).

Several MET inhibitors (4) have been tested in combination with EGFR inhibitors. However, no difference in overall survival (OS) was observed either with the combination of tivantinib plus erlotinib *vs.* erlotinib alone (5). Neither was any benefit shown in OS with an anti-MET antibody (onartuzumab) in combination with erlotinib in a phase II randomized trial (6). The same authors did not find any difference in OS in the phase III randomized trial in MET-positive NSCLC (7). However, it is possible that a subset of MET expressing tumors can respond to anti-MET therapeutics as has been recently demonstrated in some NSCLC cell lines (8). Crosstalk of MET with its family member RON (3) has been observed (*Table 1, Figure 1*). MET/RON complexes are present on the cell surface and ligand-stimulated MET activation results in direct transphosphorylation of RON (21). A MET/RON dual kinase inhibitor (LY2801653) was more efficacious than

**Table 1** Potential novel targets in lung cancer

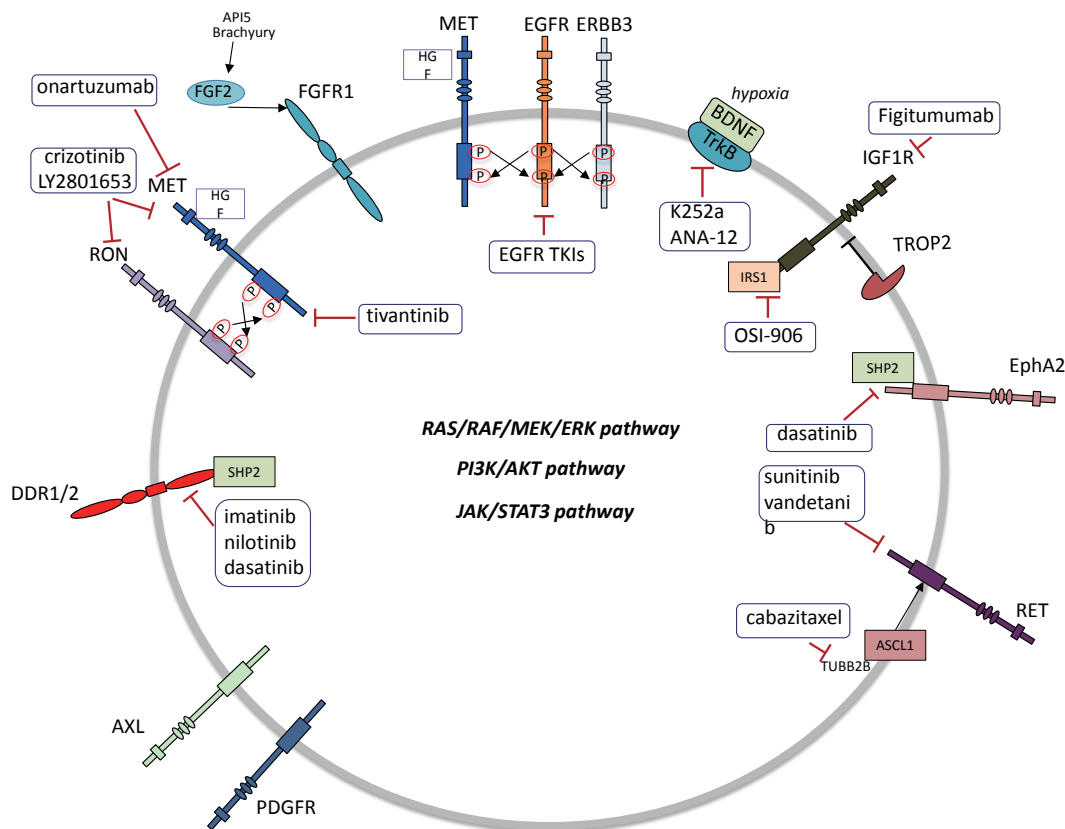
Signaling	Biomarker	Subtype of lung cancer	Available or potential targeted therapies	Evidence	
				Preclinical	Clinical
MAPK/PI3K/STAT3	MET	EGFR mutant ADC resistant to EGFR TKIs	Tivantinib + erlotinib (negative trial), onartuzumab + erlotinib (negative trial)	(8)	(5-7)
MAPK/PI3K/STAT3/ CBL	MET/RON	KRAS (G12S) mutations PDGFR amplification MET amplification	LY2801653	(8)	–
Maintenance of PI3K/AKT activity	EGFR/MET/ERBB3	EGFR mutant ADC resistant to EGFR TKIs	MET inhibitors	(9)	–
	IGFR1/EGFR	EGFR mutant ADC resistant to EGFR TKIs	Figitumumab + chemotherapy (negative trial), OSI-906	(10)	(11)
	loss of TROP2	SCC	+/- erlotinib (maintenance, NCT01186861)		
	TrkB (NTRK2)	wt EGFR ADC wt KRAS ADC	K252a (pan Trk inhibitor), ANA-12 (TrkB specific inhibitor)	(12)	(12) (predictive of metastases)
STAT3	RET/ASCL1 (TUBB2B)	ADC with NE differentiation	Sunitinib, vandetanib, cabazitaxel	–	(13) (ASCL1, marker for NE differentiation)
MAPK/PI3K/STAT3	EPHA2	ADC with KRAS mutations SCC	Dasatinib	(14)	–
MAPK/PI3K/STAT3	DDR2/SHP2	SCC	Imatinib, nilotinib, dasatinib	(15)	–
PKC $\delta$ /ERK	FGF2-FGFR1- brachyury-API5-BIM	EGFR mutant ADC resistant to EGFR SCC	FGFR tyrosine kinase inhibitors, monoclonal antibodies, and an FGF ligand trap	(16-19)	(20)

EGFR, epidermal growth factor receptor.

crizotinib (a MET/ALK/RON/ROS inhibitor) in A549 (KRAS G12S), H1703 (PDGFRA amplified), and H1993 (MET amplified) NSCLC cell lines. Also LY2801653 was effective in in vivo models. Inhibition of MET and RON was associated with decreased phosphorylation of CBL, PI3K and STAT3 (8). Since NSCLC is a heterogeneous group of diseases it is important to understand which biomarkers can model the activity of MET and specific inhibition of MET and RON could become clinically relevant, even in tumors harboring KRAS mutations. It is important to highlight that co-activation of several RTKs occur in many tumors. For example, the A549 NSCLC cell line coexpresses EGFR, MET, ERBB3, EPHA2 and AXL. The 8988T pancreatic adenocarcinoma cell line coexpresses EGFR, MET, ERBB2, RON, INSR, EPHA2 and AXL (22). The type of ALK

inhibitor also matters in the mechanism of resistance that can be developed in EML4-ALK NSCLC cells. Paracrine receptor activation by ligands from the microenvironment may trigger resistance to ALK inhibitors in EML4-ALK lung cancer cells. Fibroblasts produce HGF which activates MET/Gab1 and triggers resistance to TAE684 but not to crizotinib which also inhibits MET, as explained above). Conversely, endothelial cells which produce EGFR ligands decrease sensitivity to crizotinib (23).

Intriguingly, in MET amplified cells, MET signaling through ERBB3 maintains PI3K/AKT cell survival signaling despite EGFR inhibition (24). In spite of the negative studies combining MET inhibitors with erlotinib, it has been shown that EGFR-MET signaling is critical for aggressive behavior of NSCLC and provides the basis for further investigations



**Figure 1** The crosstalk between receptor tyrosine kinases-potential novel therapeutic targets.

into therapeutic target combinations. It has been determined that EGFR activation by ligand or mutation is sufficient to induce MET phosphorylation. In addition, ERBB3 enhances EGFR-driven phosphorylation of MET and activates MET itself (9). A seminal study identified two pathways leading to PI3K/AKT signaling in A431 gefitinib resistant cells: the EGFR/ERBB3 and the IGF1R/IRS1 pathways. Combining therapeutic inhibition of EGFR and IGF1R abrogates this acquired mechanism of drug resistance (10) (*Table 1, Figure 1*). IGF1R inhibitors are reviewed in Gold *et al.* (11). TROP2 modulates IGF-1R signaling in lung adenocarcinoma and low levels of expression of TROP2 in NSCLC cells are related to resistance to EGFR TKIs (25). Intriguingly, IGF1R/PI3K signaling is enhanced in resistant melanomas and combined treatment with IGF1R/PI3K and MEK inhibitors induced death of BRAF inhibitor-resistant cells (26).

Tropomyosin-related kinase B (TrkB) (3) expression is regulated by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and TrkB is required for AKT activation during lung tumor cell migration. Importantly, TrkB expression is more

frequent in NSCLC wild-type for KRAS and EGFR. These observations suggest that TrkB could be an alternative way for tumors to enhance PI3K signaling. Therefore targeting TrkB could be a useful strategy in patient subsets for whom there is no currently available targeted therapy (12). Moreover, ASCL1 and RET expression define a clinically relevant subgroup of 10% of lung adenocarcinomas characterized by neuroendocrine differentiation. ASCL1 acts upstream of RET. Also, STAT3 levels are reduced in ASCL1 depleted cells, suggestion potential activation of the JAK/STAT3 pathway. Currently available drugs targeting RET, such as sunitinib or vandetinib, could be appropriate for this subgroup of patients, as well as drugs targeting TUBB2B such as cabazitaxel since TUBB2B is also associated with high levels of ASCL1 (13) (*Table 1, Figure 1*).

Also of great clinical relevance is the fact that EPHA2 expression (3) is increased in patients harboring KRAS mutations (27). EPHA2 expression also positively correlates with history of smoking and poor survival (27). Therefore, EPHA2 is a therapeutic target for NSCLC and dasatinib is a multi-target kinase inhibitor with significant activity



against EPHA2 (14). EPHA2 mutations have been reported in squamous cell lung carcinoma (SCC) (28). Discoidin domain receptors, particularly DDR2 (3), are activated in lung cancer and DDR2 mutations have been reported in lung SCC (29). Inhibition of DDR1 and 2 can be achieved with different multi-target kinase inhibitors such as imatinib, nilotinib and dasatinib (15). SHP2 is a key signaling node downstream of the DDR2 receptor which leads to activation of multiple signaling pathways (29) (Table 1, Figure 1).

FGFR expression also matters in lung cancer (3). An important new finding is that FGFR1 mRNA levels may serve as a better biomarker of FGFR1 TKI response in lung cancer than FGFR1 gene copy number (30). Also, activation of FGF2-FGFR1 was described as a mechanism of acquired resistance to gefitinib in NSCLC (16). Brachyury, described as a driver of epithelial to mesenchymal transition, was reported to be overexpressed in NSCLC and suggested to offer an opportunity for novel therapeutic interventions (17). More recently, it has been shown that FGFR phosphorylation activates MEK/ERK resulting in increased Brachyury expression. Brachyury in turn promotes secretion of FGF and enhances again FGF-FGFR signaling (18). Brachyury levels could be a new biomarker for therapeutic interventions with FGF pathway inhibitors. The list of inhibitors is reviewed in Corn *et al.* (20). Also the anti-apoptotic gene AP15 mediates resistance by upregulating FGF2 signaling through FGFR1/PKC $\delta$ /ERK effector pathway which triggers degradation of the pro-apoptotic molecule BIM (19) (Table 1, Figure 1).

In summary, in NSCLC patients pan-negative for druggable driver genetic alterations, selection for multi-target kinase inhibitors also warrants selection based on the expression of one or more than one RTKs (3,22). In addition, several new biomarkers could be candidates for incorporation in customizing treatment for NSCLC patients negative for the most common driver mutations.

## Acknowledgements

Work in Dr. Rosell's laboratory is partially supported by a grant from Fundació La Caixa.

*Disclosure:* The authors declare no conflict of interest.

## References

- Rosell R, Bivona TG, Karachaliou N. Genetics and biomarkers in personalisation of lung cancer treatment. *Lancet* 2013;382:720-31.
- Pillai RN, Ramalingam SS. Advances in the diagnosis and treatment of non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther* 2014;13:557-64.
- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001;411:355-65.
- Goyal L, Muzumdar MD, Zhu AX. Targeting the HGF/c-MET pathway in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2013;19:2310-8.
- Scagliotti GV, Novello S, Schiller JH, et al. Rationale and design of MARQUEE: a phase III, randomized, double-blind study of tivantinib plus erlotinib versus placebo plus erlotinib in previously treated patients with locally advanced or metastatic, nonsquamous, non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2012;13:391-5.
- Spigel DR, Ervin TJ, Ramlau RA, et al. Randomized phase II trial of Onartuzumab in combination with erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:4105-14.
- Spigel DR, Edelman MJ, O'Byrne K, et al. Onartuzumab plus erlotinib versus erlotinib in previously treated stage IIIb or IV NSCLC: Results from the pivotal phase III randomized, multicenter, placebo-controlled METLung (OAM4971g) global trial. *ASCO Annual Meeting. Abstract 8000.* Presented June 2, 2014.
- Kawada I, Hasina R, Arif Q, et al. Dramatic antitumor effects of the dual MET/RON small-molecule inhibitor LY2801653 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2014;74:884-95.
- Breindel JL, Haskins JW, Cowell EP, et al. EGF receptor activates MET through MAPK to enhance non-small cell lung carcinoma invasion and brain metastasis. *Cancer Res* 2013;73:5053-65.
- Guix M, Faber AC, Wang SE, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins. *J Clin Invest* 2008;118:2609-19.
- Gold KA, Wistuba II, Kim ES. New strategies in squamous cell carcinoma of the lung: identification of tumor drivers to personalize therapy. *Clin Cancer Res* 2012;18:3002-7.
- Sinkevicius KW, Kriegel C, Bellaria KJ, et al. Neurotrophin receptor TrkB promotes lung adenocarcinoma metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:10299-304.
- Kosari F, Ida CM, Aubry MC, et al. ASCL1 and RET expression defines a clinically relevant subgroup of lung adenocarcinoma characterized by neuroendocrine differentiation. *Oncogene* 2014;33:3776-83.
- Chang Q, Jorgensen C, Pawson T, et al. Effects of

- dasatinib on EphA2 receptor tyrosine kinase activity and downstream signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2008;99:1074-82.
15. Day E, Waters B, Spiegel K, et al. Inhibition of collagen-induced discoidin domain receptor 1 and 2 activation by imatinib, nilotinib and dasatinib. *Eur J Pharmacol* 2008;599:44-53.
  16. Terai H, Soejima K, Yasuda H, et al. Activation of the FGF2-FGFR1 autocrine pathway: a novel mechanism of acquired resistance to gefitinib in NSCLC. *Mol Cancer Res* 2013;11:759-67.
  17. Roselli M, Fernando RI, Guadagni F, et al. Brachyury, a driver of the epithelial-mesenchymal transition, is overexpressed in human lung tumors: an opportunity for novel interventions against lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18:3868-79.
  18. Hu Y, Mintz A, Shah SR, et al. The FGFR/MEK/ERK/brachyury pathway is critical for chordoma cell growth and survival. *Carcinogenesis* 2014;35:1491-9.
  19. Noh KH, Kim SH, Kim JH, et al. API5 confers tumoral immune escape through FGF2-dependent cell survival pathway. *Cancer Res* 2014;74:3556-66.
  20. Corn PG, Wang F, McKeehan WL, et al. Targeting fibroblast growth factor pathways in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19:5856-66.
  21. Follenzi A, Bakovic S, Gual P, et al. Cross-talk between the proto-oncogenes Met and Ron. *Oncogene* 2000;19:3041-9.
  22. Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, et al. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science* 2007;318:287-90.
  23. Yamada T, Takeuchi S, Nakade J, et al. Paracrine receptor activation by microenvironment triggers bypass survival signals and ALK inhibitor resistance in EML4-ALK lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 2012;18:3592-602.
  24. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316:1039-43.
  25. Lin JC, Wu YY, Wu JY, et al. TROP2 is epigenetically inactivated and modulates IGF-1R signalling in lung adenocarcinoma. *EMBO Mol Med* 2012;4:472-85.
  26. Villanueva J, Vultur A, Lee JT, et al. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* 2010;18:683-95.
  27. Brannan JM, Dong W, Prudkin L, et al. Expression of the receptor tyrosine kinase EphA2 is increased in smokers and predicts poor survival in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:4423-30.
  28. Faoro L, Singleton PA, Cervantes GM, et al. EphA2 mutation in lung squamous cell carcinoma promotes increased cell survival, cell invasion, focal adhesions, and mammalian target of rapamycin activation. *J Biol Chem* 2010;285:18575-85.
  29. Iwai LK, Payne LS, Luczynski MT, et al. Phosphoproteomics of collagen receptor networks reveals SHP-2 phosphorylation downstream of wild-type DDR2 and its lung cancer mutants. *Biochem J* 2013;454:501-13.
  30. Wynes MW, Hinz TK, Gao D, et al. FGFR1 mRNA and protein expression, not gene copy number, predict FGFR TKI sensitivity across all lung cancer histologies. *Clin Cancer Res* 2014;20:3299-309.

**Cite this article as:** Rosell R, Karachaliou N, Codony J, Teixido C, Garcia-Roman S, Morales D, González Cao M, Viteri S, Veliz I, Loo Y, Castillo O. A critical question for cancer therapy: what new targets exist? *Transl Lung Cancer Res* 2014;3(6):384-388. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2014.08.10