

La ruta RAS-ERK como diana antitumoral

PIERO CRESPO BARAJA

RESUMEN

La ruta de señalización mediada por las MAP kinasas ERK1 y 2 desempeña un papel esencial en el control de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular en condiciones fisiológicas. Los fallos acaecidos en la regulación de dicha ruta, contribuyen significativamente a la transformación celular y están incuestionablemente involucrados en la progresión tumoral, además de en otras patologías. Por esta razón, durante las últimas décadas, esta ruta ha sido el sujeto de intensas investigaciones, con el propósito de identificar componentes susceptibles de ser utilizados como dianas terapéuticas en el tratamiento del cáncer. Aunque en muchos casos los resultados no han sido los esperados, algunas de estas iniciativas han producido compuestos que han logrado progresar a través de las distintas fases preclínicas y clínicas, para incorporarse al arsenal del que actualmente disponemos para combatir el cáncer. En este capítulo, resumimos el estado de las distintas estrategias y de los objetivos que se están llevando a cabo, en el desarrollo de inhibidores contra esta ruta de señalización clave en la patología humana.

SUMMARY

MAP kinases ERK1 and 2 play an essential role in the control of proliferation, differentiation and survival, under physiological conditions. Failures in the regulation of this route significantly contribute to cellular transformation, and its involvement in tumor progression, and other pathologies, is unquestionable. For this reason, during the last decades, this route has been subject of extensive investigations aimed at identifying components susceptible of being used as therapeutic targets for the treatment of cancer. Even though, in many cases, the results have not been as

satisfactory as we would have expected, some of these initiatives have yielded compounds that have successfully progressed through the demanding preclinical and clinical phases, to be incorporated to our current arsenal of anti-cancer drugs. In this chapter, we summarize the state of the different strategies and objectives, currently underway, to develop effective inhibitors directed to this key signaling pathway.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, y a pesar de los incuestionables avances acaecidos durante las últimas décadas, el cáncer sigue siendo uno de los mayores retos para los sistemas de salud europeos. En la CE, cada año, se diagnostican aproximadamente unos dos millones de nuevos casos y casi un millón de personas perecen a causa de este conjunto de enfermedades (<http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/geographic/cancerineu/>). Aunque sin ningún género de dudas, hemos logrado grandes progresos en nuestro entendimiento de las bases genéticas, bioquímicas y celulares que subyacen en la patogénesis de estas enfermedades, el gran reto que hoy tienen por delante los investigadores, es cómo traducir todos estos conocimientos en terapias efectivas, que puedan trasladarse a la clínica para su uso cotidiano en el tratamiento de la enfermedad.

Son muchos los que opinan que el éxito en la lucha contra el cáncer se encuentra tras las terapias dirigidas hacia dianas específicas. Bien moléculas individuales, bien sistemas de interacciones moleculares más complejos, cuya implicación en alguno de los procesos críticos para la transformación y/o progresión tumoral, haya quedado constatada fehaciente por la ciencia básica. Como muchas de las alteraciones genéticas encontradas en cáncer afectan a genes cuyos productos están implicados en la transducción de señales (1), el desarrollo de nuevas terapias ha puesto mucho énfasis en la búsqueda de inhibidores de moléculas involucradas en señalización. Dentro de éstas, la ruta Ras-ERK ocupa un lugar destacado, tanto por su incuestionable implicación en los procesos carcinogénicos de muchos tipos de tumores, como por ser, probablemente, la ruta de transducción de señales más estudiada y mejor entendida.

PROTEÍNAS RAS

Los genes *ras* son familia de oncogenes estrechamente relacionados. Inicialmente fueron aislados en virus de sarcomas murinos altamente oncogénicos y posteriormente detectados también en tumores humanos y en células normales, en este caso,

en su forma protooncogénica o salvaje. Tres son los genes *ras*: H, K y N-*ras*, expresados en todos los tejidos y tipos de células aunque en distintas proporciones. Los tres genes *ras* codifican para cuatro proteínas (H-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B y N-Ras) de 21 kDa, con una homología total del 85% (2). Estas proteínas están unidas a la lámina interna de la membrana plasmática, requisito indispensable para su funcionalidad. Dicha unión se realiza mediante adiciones lipídicas post-traduccionales en el extremo carboxilo terminal, en el motivo denominado CAAX box. En esta región, todas las proteínas Ras sufren una farnesilación. Además un segundo anclaje es necesario para localizarlas eficazmente en membranas, dicha señal la proporciona la palmitilación en el caso de H y N-Ras, o una secuencia polibásica, en el caso de K-Ras (3).

Las proteínas Ras unen nucleótidos de guanina y actúan como interruptores moleculares. En función del nucleótido unido, estas proteínas ciclan entre un estado inactivo, unidas a GDP, y un estado activado, al intercambiar el GDP por GTP. En condiciones normales, el ciclo activación-desactivación está íntimamente controlado por, al menos, dos tipos de proteínas: factores de intercambio, que catalizan el intercambio GDP a GTP, y proteínas GAPs (GTPase activating proteins) potenciadoras de la actividad GTPasa de Ras. En el caso de las proteínas Ras oncogénicas, estas portan mutaciones, generalmente en los codones 12 ó 61, que suprimen su sensibilidad hacia las GAPs, manteniéndolas siempre unidas a GTP y por ende constantemente activadas.

Mediante este mecanismo de alternador molecular, las proteínas Ras regulan un amplio espectro de funciones celulares esenciales, entre las que se encuentran la supervivencia, proliferación y diferenciación. Dicha regulación se realiza mediante la interacción directa con proteínas efectoras cuando Ras está unida a GTP, activando de esta manera diversas rutas de señalización intracelular, entre las que se encuentran las mediadas por las serina/treonina kinasas de la familia Raf (c-Raf, B-Raf, A-Raf), algunas PI-3 Kinasas ($p110\alpha$ y β , factores de intercambio de nucleótidos para Ral (Ral-GDS, Rlf, Rgl), factores de intercambio de nucleótidos para Rac (Tiam-1), factores de intercambio de nucleótidos para Rab (Rin), y otras proteínas de funciones no del todo claras todavía (RASSFs, Nore-1, AF-6, etc) (4).

LA RUTA ERK

De todas las proteínas implicadas en la señalización mitogénica, posiblemente unas de las que más interés han despertado en las últimas décadas son las pertenecientes a la familia de las MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases). Esta familia de serina-treonina kinasas cuenta actualmente, con cuatro subfamilias bien caracterizadas: ERKs (Extracellular signal-Regulated Kinases);

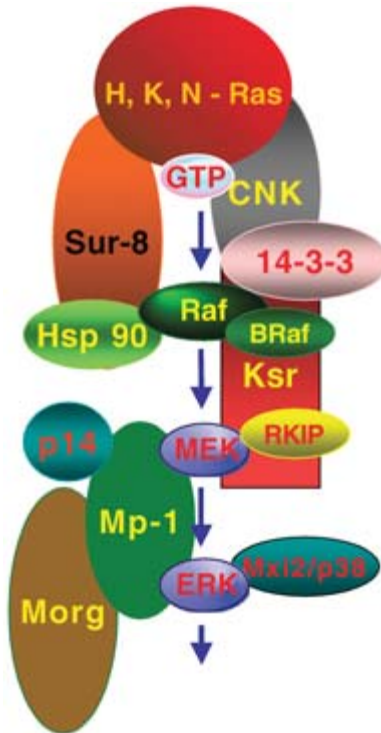


FIGURA 1. Esquema de la vía de transducción de señales Ras-ERK. Además de las proteínas que directamente componen la ruta, se muestran las principales proteínas que mediante distintos mecanismos ejercen funciones reguladoras sobre la ruta.

SAPK/JNKs (Stress-Activated Protein Kinases / Jun N-terminus Kinases); p38 y ERK5/BMK. Las MAPKs son activadas por estímulos de muy diversa naturaleza y son un paso crítico en la traducción de estímulos extracelulares en respuestas intracelulares mediante la fosforilación y consiguiente activación de múltiples substratos. A través de los cuales se regulan procesos como la expresión génica, dinámica citoesquelética, metabolismo celular, entre otros mecanismos esenciales para la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (5).

Las MAPKs de la familia ERK cuentan con dos isoformas: p44 ERK1 y p42 ERK2, con una homología cercana al 80%. Ambas son activadas por gran variedad de estímulos extracelulares, en particular estímulos mitogénicos. Dicha activación se realiza a través de una cascada de fosforilaciones regulada inicialmente por Ras, en la que participan las serina/treoninas citoplasmáticas de la familia Raf (c-Raf y B-Raf, principalmente) y la kinasa de especificidad dual MEK1 y 2 (5) (Figura 1). En estado basal, las ERKs se localizan fundamentalmente en el ci-

toplasma, ancladas al mismo mediante su interacción con MEK. Al ser fosforiladas por MEK se rompe dicha interacción, las ERKs dimerizan y se distribuyen por toda la célula, translocándose también al núcleo. Hasta la fecha se han descrito más de 220 proteínas substratos de ERKs distribuidas en distintos compartimentos celulares, incluidos factores de transcripción nucleares (Myc, Elk y otros de la familia Ets); receptores y otras proteínas de membrana (EGFr, ENaC, Syk, GAB2), proteínas citoplasmáticas de variada naturaleza (Rsk, STAT5, MEK, PLA₂, COX2, SOS); componentes del citoesqueleto (MAPs, calponina); proteínas mitocondriales (Bcl-2) etc (6). Mediante la activación de estos substratos las ERKs llevan a cabo su papel regulador de un sinnúmero de procesos biológicos.

Una de las cuestiones que más atención está recibiendo últimamente, es cómo se consigue la especificidad de señal de ERK en este maremagnum de proteínas reguladoras y substratos. En resumidas cuentas: cómo distintas señales que se transmiten a través de módulos de señalización de componentes similares pueden mantener su fidelidad. Parte de la explicación estribaría en la identificación de las proteínas «scaffold», proteínas cuya función principal sería servir de andamiajes donde se ensamblarían los distintos componentes de las cascadas de señalización de una manera específica, aislando la señal de otras similares (7). Hasta la fecha se han aislado distintas proteínas scaffold que actúan a distintos niveles de la cascada Ras-ERK, entre otras: Sur-8: parece estar involucrada en el ensamblaje de algunas isoformas de Ras con c-Raf. KSR: facilita la interacción entre Raf, MEK, en particular MEK1, y ERKs. MORG-1: ensambla a c-Raf, MEK1 y ERK, preferentemente ERK2, bajo estimulación por ácido lisofosfatídico pero no por EGF. Sef-1: ensambla a MEK y ERK2 y MP-1 que facilita la interacción entre MEK1 y ERK1 pero no afecta a MEK2 o ERK. Además, algunos de estos scaffolds tienen la capacidad de seleccionar substratos. Así, Sef-1 potencia la fosforilación de Rsk por ERKs e inhibe su translocación al núcleo. Por otro lado KSR impide la fosforilación de Elk. Por último, la función de algunas de estas proteínas scaffold podría estar determinada por la sublocalización celular. Se ha visto que KSR modula la sublocalización de MEK en la membrana plasmática, mientras que Sef-1 funciona preferentemente en el complejo de Golgi y MP-1 en endosomas (7) (8) (9).

IMPLICACIONES DE LA RUTA RAS-ERK EN LA CARCINOGENESIS

La implicación de Ras en la carcinogénesis está fehacientemente constatada desde hace décadas. Ras se encuentra activado mutacionalmente en aproximadamente el 30% de los tumores humanos. Destacando los de páncreas (90%), colon (50%), tiroides (50%), pulmón (30%) y melanoma (25%). Estos genes

mutados codifican proteínas que portan substituciones en un solo aminoácido principalmente en G12 o Q 61, lo que hace que dichas proteínas estén en estado GTP constitutivamente y, por ende, constantemente activas(10).

Además de Ras, también se ha constatado la implicación directa en procesos tumorales de otros componentes de la ruta Ras-ERK. Tal es el caso de la serina/treonina quinasa Raf. La importancia de este componente en la oncogénesis, ya se atisbaba al ser identificado Raf como un potente oncogen retroviral. Posteriormente, la generación de mutantes constitutivamente activos de Raf, y también de MEK, demostró su potencial transformante en fibroblastos murinos y otros tipos de células (11). Más recientemente, se ha encontrado B-Raf activado mutacionalmente, fundamentalmente en V600, en diversos tumores humanos y se ha observado que la activación mutacional de Ras y de B-Raf aparece de una manera no solapada en: melanomas, carcinomas colorectales, de ovario, pulmón y tiroides. En conjunto, a tenor de estos datos, se estima que hasta un 50% de los tumores humanos podrían albergar mutaciones en alguno de los componentes de la ruta Ras-ERK.

En los últimos años, también han sido descritas activaciones mutacionales de H-Ras, K-Ras, B-Raf y MEK 1 y 2, en línea germinal, en pacientes de una serie de desordenes del desarrollo, que comprenden los síndromes de Noonan, Costello y el cardio-cutáneo-facial (12). Estos síndromes, se asocian con una mayor incidencia de tumores de distinto tipo. En conjunto, estos datos ponen en evidencia el potencial terapéutico que el bloqueo de la señalización a través de la ruta Ras-ERK puede suponer en el tratamiento del cáncer.

Al margen de los principales componentes de la ruta, entre los distintos tipos de proteínas reguladoras, hasta la fecha, no se han descrito alteraciones presentes en tumores humanos. No obstante, en algunos casos se ha demostrado que sus funciones son esenciales para la activación de la ruta. Por ejemplo, el caso de KSR: cuya función es crítica para la activación de Raf por Ras. Las células deficientes para KSR son resistentes a la transformación por Ras. Además, la supresión de KSR mediante RNA de interferencia impide el crecimiento de células tumorales humanas portadoras de mutaciones en Ras (13), lo que apunta a KSR, en particular, y a las proteínas de andamiaje en general, como potenciales dianas antitumorales.

INHIBIDORES DE RAS

Debido a su condición de oncogen más frecuente en los tumores humanos, Ras ha sido el «Santo Grial» en la búsqueda de agentes antitumorales. Ya que el

defecto presente en las oncoproteínas Ras, las mutaciones en los codones 12,13 y 61, conlleva la pérdida de su sensibilidad hacia las proteínas GAPs y, en consecuencia, su bloqueo en la forma unida a GTP. Los esfuerzos iniciales fueron encaminados, bien a restituir la actividad GTPasa intrínseca de Ras mediante la simulación de los efectos de las GAPs, o bien a antagonizar la unión a GTP. Sin embargo, hasta la fecha, ambas estrategias han sido absolutamente infructuosas. No obstante, Ras ha seguido siendo la diana de intentos de bloqueo alternativos, esta vez dirigidos contra los mecanismos mediante los cuales Ras se inserta en las membranas, requisito indispensable para que Ras pueda ser activa.

Ras se sintetiza en polisomas libres en el citoplasma. Rápidamente es isoprenilado por la acción de farnesil-transferasas (FTasas), lo que resulta en la adición covalente de un grupo farnesilo isoprenoide a la cisteína de su caja CAAX. Mediante esta modificación, Ras se inserta en la superficie del retículo endoplásmico. A continuación, Ras sufre la proteólisis de los residuos AAX, llevada a cabo por endoproteasas de la familia Rce1. Finalmente, la isoprenilcisteína-0-carboxi metiltransferasa (ICMT) lleva a cabo la mutilación de la cisteína terminal (14). Todos y cada uno de estos procesos son importantes para incrementar la afinidad de Ras hacia las membranas. La inhibición del primer paso, la farnesilación, es suficiente para impedir todos los procesos subsiguientes.

A tenor de estos datos, muchos esfuerzos se han dedicado a generar inhibidores de FTasas (FTIs), con la esperanza de que incapacitasen el acceso de Ras a la membrana y, por ende, lo inactivasen. Aunque el uso de FTIs ha tenido cierto éxito en el tratamiento de algunas neoplasias, su utilización se ha complicado por el hecho de que K-Ras y N-Ras, las isoformas que aparecen más habitualmente en tumores, pueden ser geranyl-geraniladas cuando la maquinaria de farnesilación es deficiente (15). Lo que hace que, en realidad, los FTIs no sean eficientes inhibidores de Ras y existen evidencias que indican que su efecto antitumoral no es debido a su acción sobre Ras, sino sobre otros sustratos como, por ejemplo, Rho B (16, 17). No obstante, aunque no sea a través de Ras, algunos FTIs han logrado progresar como antitumorales a través de las fases preclínicas y clínicas. En estos momentos, SHC-66336 (lonafarnib; Sarasar) y R115777 (tipifarnib; Zarnesta) están en ensayos clínicos de fase II/III para neoplasias hematopoyéticas (18).

Siguiendo la misma estrategia, otros tipos de inhibidores se han dirigido hacia otras de las modificaciones post-traduccionales que sufre Ras, como son la inhibición de su proteólisis AAX y la de su carboximetilación (19). En esta línea, recientemente se ha identificado una pequeña molécula inhibidora, la 2-(5-(3 metil fenil) -1- octil-1H indol -3-il) acetamida (cysmetynil), inhibidora

de la ICMT, capaz de inhibir la localización de Ras en membranas y, en consecuencia, la proliferación de distintos tipos celulares (20). Hay que tener en cuenta, que tanto los FTIs, como los inhibidores de proteasas CAAX-específicas y los de ICMTs, no solo afectan a Ras, sino, literalmente, a cientos de proteínas que contienen dicha secuencia. El hecho de que muchas de estas proteínas, por ejemplo las de las familias Rheb, Ral y Rho, también estén implicadas en la regulación de procesos íntimamente relacionados con la carcinogénesis, hace pensar que la promiscuidad de dichos inhibidores pueda, de alguna manera, resultar beneficiosa en la terapia antitumoral. De manera que los esfuerzos en esta vía siguen vigentes.

INHIBIDORES DE RAF.

Distintas clases de compuestos han sido desarrollados como potenciales inhibidores de esta familia de kinasas. Algunos intentos han perseguido el inhibir la expresión de c-Raf, como el inhibidor «antisentido» ISIS-5132. Este fosforato oligonucleotido de DNA, mostró su eficacia antitumoral en ensayos preclínicos de xenotransplantes en ratones, pero fracasó en ensayos clínicos de fase II, al no inducir una buena respuesta antitumoral en pacientes (21). Otro abordaje parecido ha sido realizado con LerafAON, un oligonucleótido antisentido encapsulado en liposomas. Este tratamiento ha superado la fase I y actualmente se encuentra en fase II, tanto como monoterapia, como combinado con radioterapia y otras quimioterapias (22).

Paralelamente, también se han realizado grandes esfuerzos en la búsqueda de pequeñas moléculas inhibitoras de Raf y ya hay en el mercado un número considerable de las mismas. MCP1 es un inhibidor de la interacción Ras / Raf, aunque los mecanismos mediante los que ejerce dicho efecto no están claros. La dilucidación de dichos mecanismos será importante para el futuro diseño de inhibidores de este tipo. Actualmente se encuentra en fase preclínica (23).

Aunque no es un inhibidor directo de Raf, la actividad antitumoral de la benzoquinona geldamicina, está directamente relacionada con el mismo, ya que promueve la degradación de Hsp90, una chaperona esencial para la estabilidad y funcionamiento de c-Raf. De manera que, indirectamente potencia la degradación de c-Raf, aunque también de otras proteínas que requieren de este cofactor. Un derivado, la 17-aliámico, 17-dimetoxi geldamicina (17-AAG) ha demostrado su eficacia en la fase preclínica en el tratamiento del melanoma y actualmente está en ensayos clínicos fase II, aunque asaltado por problemas de solubilidad, estabilidad y hepatotoxicidad (24).

Sin lugar a dudas, hasta la fecha, el inhibidor de Raf más exitoso es el sorafenib (BAY 43-9006; Nexavar). Un compuesto administrable por vía oral que recibió la aprobación de la FDA en 2005, para su uso en carcinoma renal avanzado. Sorafenib fue inicialmente desarrollado como un inhibidor de c-Raf, aunque posteriormente se ha demostrado que también inhibe potentemente a B-Raf. Tanto a la proteína salvaje como al mutante V600E, el más frecuente en tumores humanos (25). No obstante, también muestra efecto inhibitor sobre otras quinasas, en particular las pro-angiogénicas VEGF-r 1 y 2, PDGF-b, Flt-3, c-Kit y FGFr-1, pero no sobre otras como MEK, ERK, p38, EGFr, etc. De manera que es posible que, en cierto grado, sus efectos antitumorales sean independientes de Raf y, más bien, asociados a su efecto antiangiogénico. El tratamiento con sorafenib es seguro y bien tolerado y en los estudios de fase III dobló el periodo libre de enfermedad de 12 a 24 meses, en comparación con el grupo placebo, en 900 pacientes con carcinoma renal avanzado (26). En estos momentos, se están realizando estudios clínicos de su efecto en cánceres de pulmón, próstata, hepatocelular, ovario, páncreas y neoplasias hematológicas. RAF265 y PLX4032 son otros compuestos inhibidores de c-Raf B-Raf y A-Raf, de administración oral y actualmente en ensayos clínicos fase I. Al igual que sorafenib, estos compuestos también muestran potencial anti-angiogénico.

INHIBIDORES DE MEK

Las quinasas duales MEK1 y MEK2, son los únicos sustratos conocidos de las quinasas de la familia Raf y, a su vez, son las únicas quinasas activadoras de las MAP quinasas ERKs. Debido a esto, han atraído gran atención como objetivos terapéuticos para inhibir la activación de la ruta. Al contrario que la mayoría de los inhibidores de quinasas, los inhibidores de MEK no son competidores de ATP. Su mecanismo de acción reside en su capacidad de unirse a MEK y bloquearla en estado catalíticamente inactivo, por lo que son altamente específicos, ya que las secuencias a las que se unen son únicas para esta familia de quinasas. Esto ha quedado demostrado por los dos primeros inhibidores desarrollados, PD98059 y UO126. Estos dos inhibidores han sido de incalculable valor para la ciencia básica y han tenido enorme importancia en la adquisición de muchos de los conocimientos que hoy tenemos sobre la ruta Ras-ERK y su relevancia en el cáncer. Estos compuestos no han podido ser trasladados a la clínica ya que carecen de las propiedades farmacológicas necesarias (27). No obstante, han marcado la base química para el desarrollo de nuevas generaciones de inhibidores de MEK con propiedades farmacológicas muy mejoradas.

El primer inhibidor de MEK que ha entrado en ensayos clínicos ha sido el CI-1040 (PD184352). De administración oral y altamente específico, este compuesto inhibió el desarrollo de tumores colorectales y de melanomas en xenotransplantes en ratones. En posteriores ensayos clínicos de fase I, logró una respuesta de remisión parcial en el 25% de los casos ensayados, sobre una serie de distintos tipos de tumores. Este resultado alentador, impulsó el paso a estudios de fase II donde, desafortunadamente, los resultados fueron negativos. Debido, fundamentalmente, a las pobres propiedades farmacocinéticas del compuesto (27). A pesar de esto, los prometedores resultados obtenidos en fase I, han respaldado en gran medida el uso de MEK como diana terapéutica antitumoral, lo que ha impulsado la aparición de una segunda generación de inhibidores de estas kinasas.

El PD0325901, es un derivado del CI-1040 con modificaciones en su estructura química, que han supuesto un incremento de 50 veces en su potencial inhibitorio sobre MEK, mejor farmacocinética, mayor estabilidad y una prolongación en la supresión de la diana terapéutica. Su actividad antitumoral se ha demostrado sobre distintos tipos de tumores, en xenotransplantes de ratón, y actualmente está siendo evaluado en ensayos clínicos de fase I y II (27).

El AZD6244 (ARRY-142886) es un benzimidazol de administración oral. Evaluaciones preclínicas han demostrado su actividad antitumoral en modelos de xenotransplantes de tumores de colon, páncreas, pulmón y melanoma, por lo que ha pasado a estudios clínicos de fase I (27). Los resultados iniciales en pacientes con tumores sólidos avanzados, han demostrado una buena tolerancia y casi una total ausencia de efectos adversos. Estudios de farmacocinética y farmacodinámica han ratificado una exposición sistémica satisfactoria y unos niveles significativos de inhibición de ERK. La mejor respuesta clínica observada ha sido un 57 % de estabilización de la enfermedad, de los cuales el 19% se prolongó más de cinco meses (28). Recientemente, se ha observado que los tumores que portan mutaciones en B-Raf son mucho más sensibles a la inhibición de MEK que esos que contienen B-Raf salvaje o mutaciones en Ras (29). Lo que probablemente refleja que Ras utilice rutas independientes de Raf para ejercer su efecto oncogénico. A este respecto, la tipificación de los tumores en función de la presencia de mutaciones en B-Raf y Ras, podría servir para identificar esos pacientes potencialmente sensibles a la terapia anti-MEK.

Además de los inhibidores sintéticos, una serie de toxinas bacterianas también han demostrado su potencial como inhibidores de MEK. El Factor Letal del Antrax (LeTX) es un componente de la exotoxina de *Bacillus anthracis*, que tiene la capacidad de inactivar múltiples MAPKKs, incluidas MEK1 y 2, mediante proteólisis (30). LeTX ha demostrado su eficiencia como antitumoral en mo-

de los animales, preferentemente sobre esos tumores que portan mutaciones en B-Raf, en particular melanomas (30). La proteína externa J (YopJ) de *Yersinia pestis*, es otra toxina con actividad inhibitoria sobre MEK. YopJ tiene actividad acetil-transferasa, mediante la cual modifica residuos de serina y treonina presentes en el lazo de activación de MEK, esenciales para su función, bloqueando así su actividad (31). YopJ se está probando actualmente en ensayos preclínicos.

¿INHIBIDORES DE ERK?

A pesar de ser el punto final de la ruta, hasta la fecha, no se han encontrado mutaciones activadoras de ERK1 y 2, ni en tumores, ni en ningún otro tipo de patologías. Tal vez esto sea debido al complejo mecanismo de activación de las ERKs, que requiere dos fosforilaciones secuenciales y en estricto orden. Probablemente la conformación activa resultante no pueda ser simulada por cambios aminoacídicos puntuales. El único cambio relevante que se ha podido observar en algunos tipos de tumores es una deslocalización, encontrándose las ERKs constitutivamente en el núcleo (M. Cobb, comunicación personal).

Hoy en día no existen inhibidores dirigidos hacia la inactivación directa de las ERKs. Sin embargo, recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la inhibición de la dimerización de ERKs es suficiente para impedir la transformación de fibroblastos murinos por distintos tipos de oncogenes. También ralentiza la proliferación de líneas tumorales humanas procedentes de tumores de vejiga, colon y pulmón. Además, la inhibición de la dimerización de ERKs impide el crecimiento y la progresión de los mismos tipos de células tumorales en un modelo de xenotransplantes en ratones (32). Dichos resultados, sumamente prometedores, apuntan hacia la dimerización de ERKs como una potencial diana antitumoral. Es importante resaltar que la inmensa mayoría de los inhibidores para kinasas descritos hasta la fecha, son competidores de ATP. Con la desventaja que supone su inespecificidad, fruto de la alta homología en las regiones de unión a ATP, existente entre las distintas familias de kinasas. Se da la particularidad de que la interfaz de dimerización de las ERKs es una secuencia única, lo que puede resultar en la generación de inhibidores altamente específicos para estas kinasas.

CONCLUSIONES MIRANDO AL FUTURO

Hoy en día, la cantidad de datos que resaltan el papel capital que la ruta Ras-ERK desempeña en la carcinogénesis es, simplemente, abrumadora. Todas estas

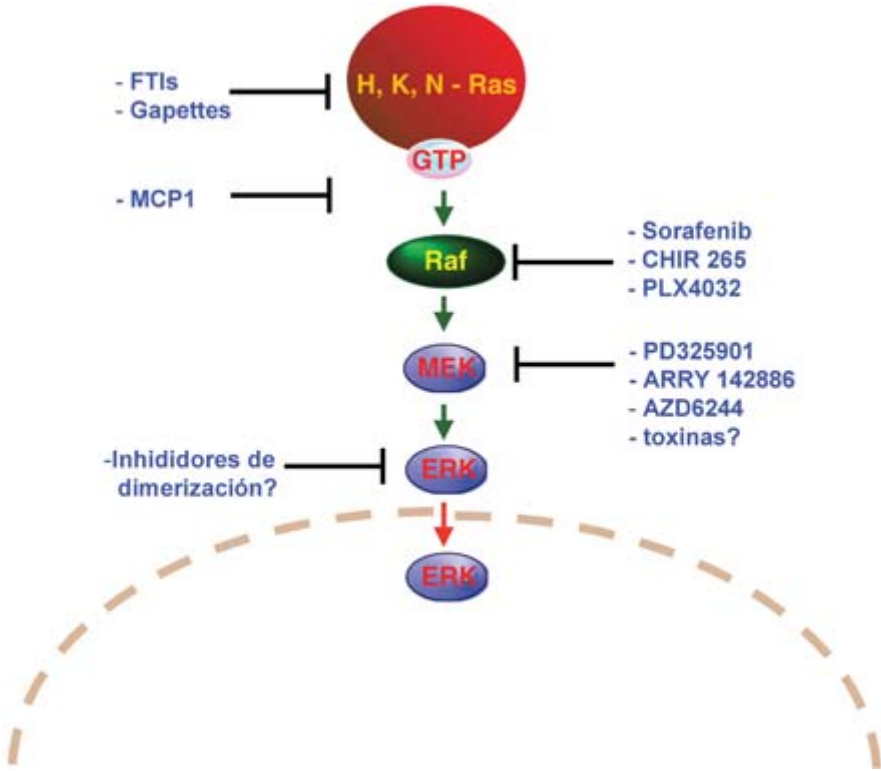


FIGURA 2. Esquema de los principales inhibidores de la ruta Ras-ERK desarrollados hasta la fecha y su diana molecular.

evidencias ponen de manifiesto, y avalan a la vez, la importancia que los inhibidores de esta ruta van, lenta pero inexorablemente, adquiriendo dentro del arsenal de antitumorales de los que disponemos para hacer frente a los distintos tipos de cánceres. Mucho tipos de inhibidores de Ras, Raf y MEK han sido desarrollados y analizados (Figura 2) y aunque sólo muy pocos han logrado su aprobación y su validación en la clínica diaria, estos avalan que la estrategia seguida es correcta. No obstante, muchas cuestiones sin todavía respuesta, permanecen sobre el tablero y si alguno de los inhibidores de esta ruta acabará instaurándose como la «bala mágica» en la lucha contra el cáncer es todavía cuestionable.

Uno de los debates en boga, es si, siendo el cáncer un proceso que requiere la alteración progresiva de muchos factores, el tratamiento mediante la utilización de inhibidores dirigidos hacia una sola diana, es más efectivo que la utilización de inhibidores de amplio espectro. Cabe esperar que un tratamiento

contra el cáncer realmente efectivo, se dirija hacia corregir/inhibir a la vez varios de los sistemas que funcionan aberrantemente. Esta es, en esencia, la filosofía de la quimioterapia combinada. No obstante, lo que parece estar claro es que terapias dirigidas hacia la inhibición de las rutas de señalización mitogénica descontroladas, siempre serán necesarias. Entre estas, la ruta Ras-ERK es una de las principales, si no la esencial. De manera que es de esperar que, en el futuro, los inhibidores de la ruta Ras-ERK siempre tengan su lugar en el arsenal de antitumorales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57-70.
2. Barbacid, M. (1987) Ras genes. *Ann. Rev. Biochem.*, **56** 779-827.
3. Hancock, J. F. (2003) Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 373-384.
4. Campbell, S. J., Khosravi-Far, R., Rossman, K. L., Clark, G. J., y Der, C. J. (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* **17**, 1395-1413.
5. Robinson, M. J., y Cobb, M. H. (1997) Mitogen -Activated Protein kinases pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 180-186.
6. Yoon, S., y Seger, R. (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**, 21-44.
7. Kolch, W. (2005) Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 827-837.
8. Dhanasekaran, D. N., Kashef, K., Lee, C. M., Xu, H., y Reddy, E. P. (2007) Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* **26**, 3185-3202.
9. Morrison, D. K., y Davis, R. J. (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 91-118.
10. Bos, J. L. (1989) Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **49**, 4682-4689.
11. Schreck, R., y Rapp, U. R. (2006) Raf kinases: oncogenesis and drug discovery. *Int J Cancer* **119**, 2261-2271.
12. Aoki, Y., Niihori, T., Narumi, Y., Kure, S., y Matsubara, Y. (2008) The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat* **29**, 992-1006.

13. Kortum, R. L., Johnson, H. J., Costanzo, D. L., Volle, D. J., Razidlo, G. L., Fusello, A. M., Shaw, A. S., y Lewis, R. E. (2006) The molecular scaffold kinase suppressor of Ras 1 is a modifier of RasV12-induced and replicative senescence. *Mol Cell Biol* **26**, 2202-2214.
14. Resh, M. D. (2004) Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Subcell Biochem* **37**, 217-232.
15. Rowinsky, E. K. (2006) Lately, it occurs to me what a long, strange trip it's been for the farnesyltransferase inhibitors. *J Clin Oncol* **24**, 2981-2984.
16. Roberts, P. J., y Der, C. J. (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**, 3291-3310.
17. Roberts, P. J., Mitin, N., Keller, P. J., Chenette, E. J., Madigan, J. P., Currin, R. O., Cox, A. D., Wilson, O., Kirschmeier, P., y Der, C. J. (2008) Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *J Biol Chem* **283**, 25150-25163.
18. Lancet, J. E., Gojo, I., Gotlib, J., Feldman, E. J., Greer, J., Liesveld, J. L., Bruzek, L. M., Morris, L., Park, Y., Adjei, A. A., Kaufmann, S. H., Garrett-Mayer, E., Greenberg, P. L., Wright, J. J., y Karp, J. E. (2007) A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia. *Blood* **109**, 1387-1394.
19. Winter-Vann, A. M., y Casey, P. J. (2005) Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat Rev Cancer* **5**, 405-412.
20. Winter-Vann, A. M., Baron, R. A., Wong, W., dela Cruz, J., York, J. D., Gooden, D. M., Bergo, M. O., Young, S. G., Toone, E. J., y Casey, P. J. (2005) A small-molecule inhibitor of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase with antitumor activity in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4336-4341.
21. Oza, A. M., Elit, L., Swenerton, K., Faught, W., Ghatage, P., Carey, M., McIntosh, L., Dorr, A., Holmlund, J. T., y Eisenhauer, E. (2003) Phase II study of CGP 69846A (ISIS 5132) in recurrent epithelial ovarian cancer: an NCIC clinical trials group study (NCIC IND.116). *Gynecol Oncol* **89**, 129-133.
22. Dritschilo, A., Huang, C. H., Rudin, C. M., Marshall, J., Collins, B., Dul, J. L., Zhang, C., Kumar, D., Gokhale, P. C., Ahmad, A., Ahmad, I., Sherman, J. W., y Kasid, U. N. (2006) Phase I study of liposome-encapsulated c-raf antisense oligodeoxyribonucleotide infusion in combination with radiation therapy in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* **12**, 1251-1259.
23. Kato-Stankiewicz, J., Hakimi, I., Zhi, G., Zhang, J., Serebriiskii, I., Guo, L., Edamatsu, H., Koide, H., Menon, S., Eckl, R., Sakamuri, S., Lu, Y., Chen, Q. Z., Agarwal, S., Baumbach, W. R., Golemis, E. A., Tamanai, F., y Khazak, V. (2002)

- Inhibitors of Ras/Raf-1 interaction identified by two-hybrid screening revert Ras-dependent transformation phenotypes in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14398-14403.
24. Sharp, S. Y., Prodromou, C., Boxall, K., Powers, M. V., Holmes, J. L., Box, G., Matthews, T. P., Cheung, K. M., Kalusa, A., James, K., Hayes, A., Hardcastle, A., Dymock, B., Brough, P. A., Barril, X., Cansfield, J. E., Wright, L., Surgenor, A., Folloppe, N., Hubbard, R. E., Aherne, W., Pearl, L., Jones, K., McDonald, E., Raynaud, F., Eccles, S., Drysdale, M., y Workman, P. (2007) Inhibition of the heat shock protein 90 molecular chaperone in vitro and in vivo by novel, synthetic, potent resorcinolic pyrazole/isoxazole amide analogues. *Mol Cancer Ther* **6**, 1198-1211.
 25. Wan, P. T., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., Jones, C. M., Marshall, C. J., Springer, C. J., Barford, D., y Marais, R. (2004) Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* **116**, 855-867.
 26. Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W. M., Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., Negrier, S., Chevreau, C., Solska, E., Desai, A. A., Rolland, F., Demkow, T., Hutson, T. E., Gore, M., Freeman, S., Schwartz, B., Shan, M., Simantov, R., y Bukowski, R. M. (2007) Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* **356**, 125-134.
 27. Sebolt-Leopold, J. S., y Herrera, R. (2004) Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* **4**, 937-947.
 28. Yeh, T. C., Marsh, V., Bernat, B. A., Ballard, J., Colwell, H., Evans, R. J., Parry, J., Smith, D., Brandhuber, B. J., Gross, S., Marlow, A., Hurley, B., Lyssikatos, J., Lee, P. A., Winkler, J. D., Koch, K., y Wallace, E. (2007) Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. *Clin Cancer Res* **13**, 1576-1583.
 29. Solit, D. B., Garraway, L. A., Pratilas, C. A., Sawai, A., Getz, G., Basso, A., Ye, Q., Lobo, J. M., She, Y., Osman, I., Golub, T. R., Sebolt-Leopold, J., Sellers, W. R., y Rosen, N. (2006) BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* **439**, 358-362.
 30. Bodart, J. F., Chopra, A., Liang, X., y Duesbery, N. (2002) Anthrax, MEK and cancer. *Cell Cycle* **1**, 10-15.
 31. Mukherjee, S., Keitany, G., Li, Y., Wang, Y., Ball, H. L., Goldsmith, E. J., y Orth, K. (2006) Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* **312**, 1211-1214.
 32. Casar, B., Pinto, A., y Crespo, P. (2008) Essential role of ERK dimers in the activation of cytoplasmic but not nuclear substrates by ERK-scaffold complexes. *Mol Cell* **31**, 708-721