

Gaceta Médica de México

Volumen
Volume 139

Suplemento
Supplement 4

Noviembre-Diciembre
November-December 2003

Artículo:

Nuevas estrategias para el tratamiento
de varios cánceres con análogos
citotóxicos de LH-RH, somatostatina y
bombesina

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Academia Nacional de Medicina de México, A.C.

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*



Medigraphic.com

Nuevas estrategias para el tratamiento de varios cánceres con análogos citotóxicos de LH-RH, somatostatina y bombesina*

Andrew V. Schally, ** Attila Nagy**

Resumen

Se revisa el desarrollo de análogos citotóxicos dirigidos de péptidos hipotalámicos en el tratamiento de varios cánceres y se resumen diversos estudios oncológicos en tumores experimentales. Las nuevas modalidades para el tratamiento de cánceres mamario, prostático y ovárico se basan en la utilización de análogos citotóxicos dirigidos de LH-RH que contienen doxorubicina (DOX) o 2-pirrolino-DOX. Los mismos radicales se han incorporado en análogos citotóxicos de somatostatina, pudiendo también ser dirigidos a receptores para este péptido, en cánceres prostático, mamario, ovárico, renal y pulmonar, así como en tumores de cerebro y sus metástasis. Igualmente, un análogo citotóxico dirigido de bombesina que contiene 2-pirrolino-DOX se ha sintetizado y probado con éxito en modelos experimentales de cáncer de próstata, carcinoma pulmonar de células pequeñas y tumores de cerebro. El desarrollo de estos nuevos análogos peptídicos debería dar lugar a un tratamiento más eficaz de diversos cánceres.

Palabras clave: Tratamiento de cánceres mamario, ovárico, prostático, renal y pulmonar, Análogos citotóxicos dirigidos

Summary

The development of targeted cytotoxic analogs of hypothalamic peptides for the therapy of various cancers is reviewed and various oncological studies on experimental tumors are summarized. Novel therapeutic modalities for breast, prostate and ovarian cancer consist of the use of targeted cytotoxic analogs of LH-RH containing doxorubicin (DOX) or 2-pyrrolino-DOX. The same radicals have been incorporated into cytotoxic analogs of somatostatin which can be also targeted to receptors for this peptide in prostatic, mammary, ovarian, renal cancers, brain tumors and their metastases. A targeted cytotoxic analog of bombesin containing 2-pyrrolino-DOX has been also synthesized and successfully tried in experimental models of prostate cancer, small cell lung carcinoma and brain tumors. The development of these new classes of peptide analogs should lead to a more effective treatment for various cancers.

Key words: Breast cancer therapy, ovarian cancer therapy, prostate cancer therapy, renal cancer therapy, lung cancer therapy, targeted cytotoxic analogs

Introducción

La quimioterapia es la principal modalidad en el tratamiento sistémico de los cánceres avanzados o metastásicos y también puede aplicarse como un adyuvante de la cirugía y la radioterapia.¹ No obstante, la quimioterapia para el cáncer está restringida por la toxicidad de los agentes quimioterapéuticos y una administración más selectiva de los agentes citotóxicos a los tumores primarios y sus metástasis, permitiría la escalación de las dosis y reduciría la toxicidad periférica.

La quimioterapia dirigida representa una estrategia oncológica moderna diseñada para mejorar la efectividad de los fármacos citotóxicos y disminuir la toxicidad periférica. Los receptores de las hormonas peptídicas de las células tumorales pueden servir de blancos de los ligandos peptídicos que pueden unirse a diversos agentes citotóxicos. Durante los últimos 10 años sintetizamos y evaluamos análogos citotóxicos de LHRH, somatostatina, y bombesina, que pueden dirigirse hacia diversos tumores.²⁻⁷ En esta presentación revisaremos los efectos antitumorales de nuestros análogos citotóxicos en modelos experimentales de cáncer, (Cuadros I y II).

* Reimpreso de Life Sciences, Vol. 72, páginas 2305-2320 y traducido al español con algunas modificaciones Copyright 2003, Elsevier Science Inc., con permiso del Editor.

** Endocrine, Polypeptide, and Cancer Institute, Veterans Affairs Medical Center, New Orleans, LA, 70112; and Section of Experimental Medicine, Department of Medicine, Tulane University, School of Medicine, New Orleans, LA 70112.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Andrew V. Schally, Endocrine, Polypeptide and Cancer Institute, VA Medical Center, 1601 Perdido St., New Orleans, LA 70112-1262, U.S.A. Tel: 001 (504) 589-5230; Fax 001 (504) 566-1625.

Análogos Citotóxicos de la Hormona Liberadora de la Hormona Lutelinizante (LHRH)

En los últimos 30 años se han sintetizado varios miles de análogos de LHRH.⁸⁻¹² Los análogos agonistas han encontrado importantes aplicaciones clínicas en la ginecología y la oncología.⁸⁻¹² También se han sintetizado potentes antagonistas de LHRH, como el Cetrorelix.^{9,10}

Las acciones de los análogos de LHRH son mediadas por los receptores de LHRH que se encuentran en los gonadotrofos hipofisarios.⁹⁻¹³ La retroregulación de los receptores de LHRH, producida por la administración sostenida de los agonistas de LHRH, conduce a una supresión de los niveles circulantes de LH y de esteroides sexuales. Los antagonistas de LHRH producen un bloqueo competitivo, así como una retroregulación de los receptores hipofisarios de LHRH, y causan una inhibición inmediata de la liberación de gonadotropinas y esteroides sexuales. Estos mecanismos constituyen la base de los efectos terapéuticos de los análogos de LHRH en la oncología.⁹⁻¹³

No obstante, los análogos de LHRH también ejercen efectos directos sobre las células tumorales, mismos que están mediados por los receptores de LHRH.¹²⁻¹⁷ Los receptores específicos de LHRH se encuentran en diversos cánceres. Por ende, se detectaron sitios de fijación de LHRH de alta afinidad en el 86% de las muestras de cáncer de próstata humano,¹⁸ en más del 50% de los cánceres de mama,¹⁹ en el 78% de las muestras de cáncer ovárico epitelial humano y en casi el 80% de los carcinomas endometriales humanos.^{13,15,20,21}

La expresión del gen del receptor de LHRH en tumores humanos de próstata, mama, endometrio y ovario también fue demostrada por RT-PCR.^{2,10-12,14,16-18} En consecuencia, partimos de la base de la presencia de receptores específicos de LHRH en las células tumorales para desarrollar una nueva clase de agentes antitumorales dirigidos enlazando diversos radicales citotóxicos a los análogos de LHRH.^{2,3,7}

La primera serie de moléculas híbridas citotóxicas de LHRH fue sintetizada en nuestro instituto a fines de la década de 1980. A mediados de la década de 1990, desarrollamos una clase novedosa de análogos citotóxicos de LHRH dirigidos que contienen doxorubicina (DOX) o su intensamente potente derivado 2-pirrolino-DOX (AN-201), que es de 500 a mil veces más activo *in vitro* que el compuesto del cual se origina. AN-201 también puede caracterizarse como un derivado no-cardiotóxico y sin resistencia cruzada, de DOX.^{6,7} Dos de nuestros conjugados, AN-152, que consta de [D-Lys⁶]LHRH enlazado a DOX-14-O-hemiglutarato, y AN-207, su contraparte superactiva que contiene 2-pirrolino-DOX (Figura 1), se han probado extensamente en estudios pre-clínicos, (Cuadro I). Se demostró que ambos análogos tienen una

alta afinidad por los receptores LHRH en diversos tumores.^{2,7} Además, ambos análogos retuvieron las poderosas actividades citotóxicas de sus respectivos radicales citotóxicos. Está programado iniciar este año estudios clínicos de Fase 1 con AN-152.

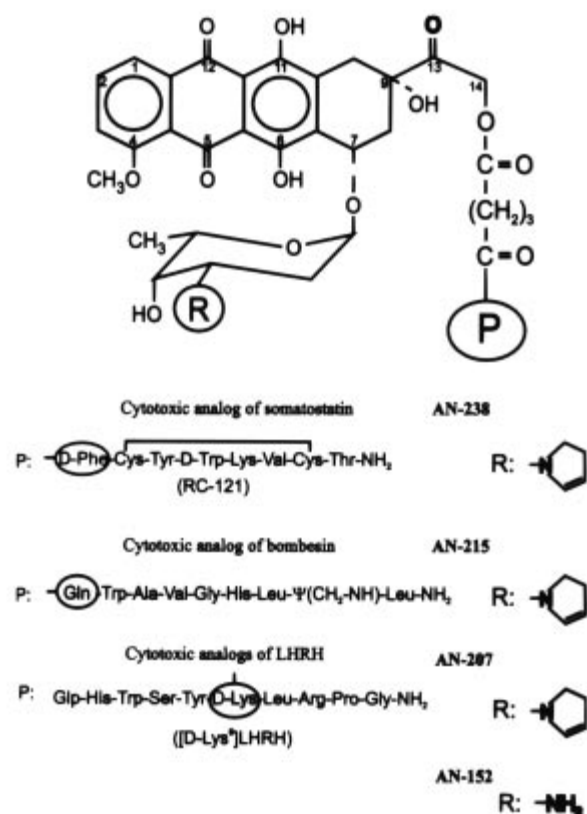


Figura 1. Estructura molecular de análogos citotóxicos de somatostatina (AN-238), bombesina (AN-215), y LHRH (AN-152 y AN-207). Los radicales citotóxicos: doxorubicina (R=NH₂) y 2-pirrolinodoxorubicina (R=2-pirrolino), están enlazados a los grupos amino libres de los amino ácidos (en círculo) de los transportadores de péptidos (P), por medio de un espaciador de ácido glutámico. Tomado de Proc. Natl. Acad. Sci, USA 97,830,2000. Reimpreso con permiso de la Academia Nacional de Ciencias, USA, Copyright Natl. Acad. Sci. USA. 2000.

Cáncer de Próstata

El tratamiento primario preferido para los hombres con cáncer de próstata avanzado se basa en el uso de agonistas de LHRH con o sin antiandrógenos. Los agonistas de LHRH proporcionan una terapia paliativa efectiva que se traduce en una enfermedad estable objetiva o en remisión parcial.⁹⁻¹¹ La castración médica producida por la administración crónica de agonistas o

antagonistas de LHRH explica la mayoría de los beneficios derivados de este tratamiento. Sin embargo, todas las terapias hormonales basadas en la ablación androgénica, incluidos los análogos de LHRH, sólo proporcionan una remisión de duración limitada y la mayoría de los pacientes experimentan recidiva a la larga debido al cáncer de próstata andrógeno-independiente.¹¹ El pronóstico de los pacientes con cáncer de próstata refractario a los andrógenos es muy malo y por el momento no existe una terapia efectiva.¹¹ Por ende, el tratamiento del cáncer de próstata recurrente andrógeno-independiente sigue siendo un importante reto oncológico. El uso de análogos de péptidos citotóxicos dirigidos pudo inhibir el crecimiento de los cánceres de próstata andrógeno-independientes y mejorar el desenlace del tratamiento tumoral. La investigación reciente de un mayor número de muestras de adenocarcinomas de próstata humanos mostró que el 86% de los cánceres tuvieron sitios de unión de alta afinidad por LHRH y expresaron el mRNA de los receptores de LHRH.¹⁸ Esto proporciona un razonamiento para el desarrollo de métodos de tratamiento de esta patología maligna basados en análogos citotóxicos dirigidos.^{2,7}

Se realizaron investigaciones con análogos citotóxicos de LHRH en diversos modelos de cáncer de próstata. En ratas con carcinomas de próstata Dunning R-3327 hormono-dependientes, los tumores tuvieron una regresión hasta la mitad de su volumen inicial después de 3 inyecciones intraperitoneales de AN-207.²² El compuesto 2-pirrolino-DOX (AN-201) fue tóxico y, después de la segunda aplicación, todos los animales murieron.

También probamos los efectos de AN-201 y AN-207 sobre el crecimiento de los cánceres de próstata Dunning R-3327-AT-1 andrógeno-independientes, con receptores de LHRH positivos en ratas Copenhague. Tres semanas después de una sola inyección I.V. de 150 nmol/kg de AN-207, se observó una inhibición tumoral significativa. En contraste, todos los animales que recibieron AN-201 a la misma dosis se murieron en los siguientes 8 días (resultados no publicados).

En un estudio de cánceres de próstata humanos PC-82 que fueron xenoinjertados en ratones desnudos, hubo una reducción importante en el volumen tumoral y una caída en los niveles del antígeno específico prostático (PSA) sérico después de la administración del análogo citotóxico AN-207.²³ El radical citotóxico AN-201 ocasionó sólo una reducción menor del volumen tumoral y mató al 40% de los ratones debido a la toxicidad. La inyección de AN-207 ocasionó una caída en los leucocitos, que se normalizó 2-3 semanas después del tratamiento. La mayor inhibición tumoral y una mucho menor toxicidad de AN-207, comparado con AN-201, pudieron atribuirse a una entrega más selectiva a las células tumorales.²³

También demostramos que el análogo de LHRH AN-207 inhibe el crecimiento de los cánceres de próstata

MDA-Pca-2B xenoinjertados subcutáneamente en ratones desnudos.²⁴ AN-207 inhibió el volumen tumoral final en un 63%, en comparación con los controles, y los niveles del PSA en ratones tratados con AN-207 disminuyeron en un 65%.²⁴ Ninguno de los animales se murió después de la administración de AN-207 a la dosis total de 350 nmol/kg y, al final del experimento, el peso corporal de los ratones que recibieron AN-207 no difirió significativamente de los controles. Una sola inyección del radical citotóxico AN-201 a 200 nmol/kg ocasionó una mortalidad del 43%. Nuestro trabajo apoya el concepto de que la quimioterapia dirigida basada en los análogos citotóxicos de LHRH debería ser más eficaz y menos tóxica que los actuales esquemas de quimioterapia sistémica y debería permitir la escalación de la dosis. Los análogos citotóxicos dirigidos de LHRH pueden usarse para el tratamiento del cáncer de próstata avanzado después de la recidiva. Además, los análogos citotóxicos de LHRH también podrían estar indicados como tratamiento primario de los pacientes con cáncer de próstata avanzado, extendiendo así los usos oncológicos de los análogos de LH-RH de la actual paliación a una cura futura.

Cuadro I. Efficacy of treatment with targeted cytotoxic LHRH analogs AN-152 containing DOX, and AN-207 containing 2-pyrrolino-DOX on various LHRH receptor-positive human experimental cancers

Tumor models	Efficacy of AN-207 ¹	Efficacy of AN-152
Prostate		
Dunning R3327H (rat)	xxxxx ²	ND ³
PC-82 (human)	xxxx	ND
MDA-PCa-2b (human)	xxx	ND
Breast		
MXT(mouse)	xxxx	xxxx
MX-1 (human)	xxxxx	ND
MDA-MB-231 (human)	xxxx	ND
MDA-MB-435 (human)	xxx	ND
Ovarian		
OV-1063 (human)	xxx	xxxx
ES-2 (human)	xxx	xx
NIH:OVCAR-3 (human)	ND	xxxxx
Endometrial		
HEC-1b (human)	ND	xxxxx
Melanoma	BD ⁴	BD

¹ The effective doses of AN-207 are about 100 times lower than those of AN-152.

² xxxxx = regression/cure, xxxx = > 70% growth inhibition, xxx = 50-70% growth inhibition, xx = < 50% growth inhibition.

³ Not determined.

⁴ Being determined.

Cáncer de Mama

El cáncer de mama es la patología maligna más común en las mujeres. Las mujeres con tumores estrógeno-dependientes pueden ser tratadas con manipulaciones hormonales como tamoxifen, raloxifen u ovariectomía. Los agonistas de LHRH también pueden usarse para el tratamiento del cáncer de mama estrógeno-dependiente.¹⁰ Klijn et al.²⁵ mostraron, en mujeres premenopáusicas con cáncer de mama avanzado, que el tratamiento combinado con agonistas de LHRH y tamoxifén fue más efectivo y se traduciría en una supervivencia general más prolongada que el tratamiento con cualquiera de los dos fármacos solos. El principal efecto de los agonistas LHRH sobre los carcinomas mamarios se basa en la ablación androgénica, pero también existen efectos antitumorales directos. Varios grupos encontraron receptores LHRH en líneas de cáncer de mama. Alrededor del 52% de las muestras de cáncer de mama tienen receptores de LHRH positivos.¹⁹ Más del 50% de las muestras con receptores estrogénicos negativos tienen receptores de LHRH.

Los tumores estrógeno-independientes tienen un mal pronóstico. Las opciones terapéuticas disponibles no son satisfactorias y deben explorarse nuevas modalidades terapéuticas.^{9,10,26,27} La quimioterapia es una importante modalidad para el tratamiento de los pacientes con cáncer de mama. Sin embargo, los agentes quimioterapéuticos tienen efectos secundarios de toxicidad. En consecuencia, existe la necesidad de agentes citotóxicos dirigidos.

Los análogos citotóxicos dirigidos de LHRH se unen con alta afinidad a los receptores de LHRH en los cánceres de mama humanos.²⁸ En ratones con cánceres de mama murinos MXT estrógeno-independientes, los análogos citotóxicos AN-207 y AN-152 produjeron una inhibición de alrededor del 90% del crecimiento tumoral.²⁹ La ventaja de AN-207 es que es efectivo en dosis de alrededor de 100 veces menores que AN-152.²⁹ En otro estudio, una sola administración de AN-207 ocasionó la regresión completa de los cánceres de mama humanos MX-1 hormono-independientes, resistentes a doxorubicina en ratones desnudos que permanecieron libres de tumor durante cuando menos 60 días después del tratamiento.²⁶ Además, AN-207 inhibió el crecimiento de cáncer de mama humano MDA-MB-231 estrógeno-independiente en ratones desnudos durante 3 semanas.³⁰ Dado que los receptores de LHRH reaparecieron 60 días después de la administración de AN-207, esto proporciona una razón lógica para el uso de terapia repetida. El tratamiento con AN-207 también previno la diseminación metastásica del cáncer de mama humano ortotópico MDA-MB-435 estrógeno-dependiente.²⁷ Los resultados sugieren que los análogos citotóxicos dirigidos de LHRH podrían considerarse para el tratamiento de cánceres de mama humanos que expresan receptores de LHRH.

Cáncer Ovárico Epitelial

El cáncer ovárico epitelial es la cuarta causa principal de mortalidad por cáncer en las mujeres.²⁰ El tratamiento basado en cirugía o quimioterapia no es muy efectivo y se requieren nuevos abordajes. Los receptores de membrana específicos de LHRH se han detectado en el 78% de los carcinomas ováricos humanos extirpados quirúrgicamente y en diversas líneas de células de cáncer de ovario humano.¹³ En consecuencia, intentamos el abordaje basado en análogos citotóxicos dirigidos de LHRH. En el primer estudio,³¹ demostramos que el análogo citotóxico AN-152 inhibe el crecimiento de los tumores de ovario humanos OV-1063 con receptores de LHRH positivos en ratones desnudos durante al menos 4 semanas. AN-152 no inhibió el crecimiento de los carcinomas ováricos humanos UC1-107 con receptores de LHRH negativos, lo que demuestra que la presencia de receptores es esencial. AN-152 también demostró ser más efectivo y menos tóxico que DOX en cánceres de ovario humanos OVCAR-3 con receptores de LHRH positivos en ratones desnudos, pero en cánceres de ovario humanos SK-OV-3 con receptores de LHRH negativos.³² En dos estudios posteriores, demostramos que el crecimiento de los cánceres de ovario OV-1063 y ES-2 podía suprimirse con la administración del análogo de LHRH citotóxico AN-207 a dosis 100 veces menores que las de AN-152.^{33,34} La quimioterapia dirigida basada en análogos como AN-152 y AN-207 puede mejorar el manejo del cáncer de ovario.

Cáncer Endometrial

El cáncer endometrial es una malignidad ginecológica común en el mundo occidental. La cirugía o la radioterapia es exitosa en el 75% de los casos, pero se requieren nuevos métodos para tratar los cánceres avanzados o las recidivas.¹³ En vista de la presencia de receptores de LHRH en casi el 80% de los cánceres endometriales, se han investigado los análogos citotóxicos dirigidos.^{2,10,21} De esta manera, se encontró que AN-152 es más eficiente y menos tóxico que DOX en el tratamiento de los cánceres endometriales humanos HEC-1B en ratones desnudos.³² Se obtuvieron resultados similares con AN-207 vs. AN-201 en cánceres endometriales humanos HEC-1A (datos no publicados).

Efectos Secundarios

Dado que las células productoras de LH de la hipófisis anterior expresan niveles altos de receptores de LHRH, el tratamiento con AN-152 y AN-207 se traducirá en la acumulación de DOX y AN-201, respectivamente, en este órgano. Para determinar si la terapia dirigida basada

en LHRH ocasionaría un daño permanente a la hipófisis, probamos los efectos de AN-207 y su radical AN-201 en ratas. Encontramos que AN-207 a una dosis de 150 nmol/kg ocasionó un daño selectivo a las células del gonadotrofo una semana después de una inyección I.V. No obstante, la función hipofisiaria se recuperó totalmente una semana más tarde.³⁵ De manera similar, se observó apenas una disminución transitoria de la expresión génica de los receptores de LHRH en hipófisis de ratas, después de la inyección de AN-207 a 175 nmol/kg, que es la dosis máxima tolerada de AN-207 en ratas.³⁶ En vista de que los receptores de LHRH no se expresan en concentraciones altas en la mayoría de los tejidos normales, no se esperan otros efectos secundarios relacionados con el tratamiento dirigido después del tratamiento con AN-207 o AN-152.³² La falta de toxicidad de AN-207 en las células hipofisiarias, que son de lenta proliferación, puede explicarse por la naturaleza del radical citotóxico AN-201, que es un fuerte agente intercalante del DNA que mata selectivamente los tipos celulares de rápida proliferación, como las células cancerosas y las células de la médula ósea. De hecho, la toxicidad limitante de la dosis de AN-207 probablemente sea la mielotoxicidad, ocasionada por el AN-201 liberado por las enzimas carboxilesterasas del conjugado no unido que permanece en la circulación. Dado que la actividad de las enzimas carboxilesterasas es alrededor de 10 veces más elevada en ratones que en humanos, podemos esperar menos efectos secundarios adversos característicos de DOX o AN-201 en pacientes que en ratones desnudos.³⁷

Análogos Citotóxicos de la Somatostatina

En los últimos 20 años se han desarrollado potentes análogos octapéptidos de la somatostatina, que incluyen el octreótido (Sandostatina),³⁸ y el vapreótido (RC-160).³⁹ La somatostatina y sus análogos octapéptidos ejercen sus efectos a través de receptores específicos de membrana. Se han clonado y caracterizado cinco subtipos diferentes de receptores (ss_{1-5}).⁴⁰ La somatostatina nativa muestra una elevada afinidad similar por ss_{1-5} , pero los octapéptidos sintéticos como RC-160 y octreótido se unen preferencialmente a ss_2 y ss_3 . RC-160 también se une a ss_3 . Los análogos de somatostatina se usan para el tratamiento de la acromegalia y los tumores endócrinos del sistema gastroenteropancreático, incluidos los tumores carcinoides.⁴¹ RC-160 y otros análogos demostraron suprimir el crecimiento tumoral en modelos experimentales de diversos cánceres,⁴² pero los intentos por usar los análogos de somatostatina para el tratamiento de cánceres humanos, como los de próstata, mama, páncreas y pulmón, han mostrado pocos efectos benéficos. Los resultados terapéuticos deficientes con los análogos

octapéptidos de la somatostatina probablemente se deben al hecho de que en diversos cánceres hay pérdida de la expresión génica de ss_2 , que es el subtipo preferido de estos análogos.⁴³ No obstante, la expresión de ss_5 y ss_3 debe posibilitar la terapia con análogos de la somatostatina marcados con diversos radioisótopos o análogos de la somatostatina citotóxicos.

La presencia de receptores de somatostatina permite la localización de algunos tumores y metástasis usando técnicas de centellografía.⁴⁴ Los análogos de somatostatina radiomarcados, como [¹¹¹In]-octreótido (OctreoScan) se usan clínicamente para la localización de los tumores que expresan los receptores de somatostatina. Los tumores neuroendócrinos que pudieron localizarse con OctreoScan incluyen los carcinoides y el cáncer pulmonar de células pequeñas SCLC. Los tumores no-neuroendócrinos que pudieron localizarse con centellografía incluyen el cáncer de mama, el cáncer renal, los tumores cerebrales, los astrocitomas y el cáncer pulmonar de células no pequeñas, como el carcinoma de células escamosas.⁴⁴ También se está trabajando en la aplicación de análogos de la somatostatina marcados con los radionúclidos apropiados, por ejemplo, ⁹⁰Itrio, al tratamiento del cáncer.⁶ El abordaje que usamos consiste en dirigir los agentes quimioterapéuticos relacionados con los análogos de la somatostatina a los receptores de la somatostatina en ciertos cánceres.

Desarrollamos una serie de novedosos conjugados citotóxicos dirigidos de somatostatina, que constan de los análogos transportadores RC-121 y RC-160 acoplados a DOX o 2-pirrolino-DOX.^{5,6} De estos conjugados citotóxicos híbridos, el análogo AN-238 que contiene AN-201, demostró ser muy efectivo en los modelos experimentales de cáncer (Figura 1).^{2,5,6}

Cáncer de Próstata

En el 65% de las muestras de cáncer de próstata primario se demostró una fijación de RC-160 radiomarcado con elevada afinidad y encontramos la expresión de ss_2 en el 14% y de ss_5 en el 64% de las 22 muestras analizadas.⁴⁵ El análogo citotóxico de somatostatina AN-238 fue evaluado inicialmente en el muy agresivo carcinoma de próstata andrógeno-independiente Dunning R-3327-AT-1 en ratas Copenhague. Una dosis no tóxica de 300 nmol/kg de AN-238 administrado I.V. produjo una disminución >80% en el peso tumoral cuatro semanas después del tratamiento y una prolongación de la sobrevivencia, mientras que a dosis de 115-125 nmol/kg, AN-201 fue letal.⁴⁶

Después del tratamiento con una sola dosis o dos inyecciones consecutivas de AN-238, se obtuvo una fuerte inhibición del crecimiento de cánceres de próstata andrógeno-independientes humanos PC-3 que expresan ss_2 y ss_5 y que fueron xenoinjertados en ratones desnudos.⁴⁷ En estos

experimentos, AN-238 redujo el volumen tumoral final, el peso tumoral y la carga tumoral en más del 60%, mientras que AN-201 a una dosis equimolar no tuvo ningún efecto. En un modelo metastático de PC-3 el tratamiento con AN-238 inhibió el peso de los tumores ortotópicos y produjo una reducción del 77%. Además, no se observaron metástasis ni retroperitoneales ni a distancia a 4 semanas después del inicio de la terapia con AN-238.^{2,6,47} Cuatro inyecciones de AN-238 también prácticamente detuvieron la proliferación del cáncer de próstata andrógeno-independiente DU-145 en ratones desnudos, mientras que AN-201 fue menos efectivo y menos tóxico.

Nuestros resultados sugieren que la quimioterapia con AN-238 dirigida a los receptores de somatostatina en los tumores podría mejorar el manejo de los pacientes con cáncer de próstata con enfermedad metastásica que ya no responden a la ablación androgénica.

Cáncer de Mama

La presencia de subtipos de los receptores de somatostatina en muestras de cáncer de mama humano ha sido establecida por varios grupos de investigadores.⁴⁸ Nosotros investigamos la eficacia de dirigir el tratamiento a los receptores de somatostatina en líneas de cáncer de mama humano. Ratones desnudos con xenotransplantes de diversas líneas de cáncer de mama fueron tratados con una sola inyección I.V. de AN-238. En el modelo MCF-7-MIII, varios tumores mostraron una constante regresión y 60 días después de la administración de AN-238, el volumen tumoral de todos modos disminuyó en gran medida. En el modelo estrógeno-independiente MDA-MB-231 y en el modelo DOX-resistente MX-1, muchos tumores también mostraron una regresión después del tratamiento con AN-238.⁴⁸ En los 3 modelos el radical AN-201 fue, de nuevo, más tóxico y menos efectivo que AN-238. En las tres líneas tumorales se encontraron receptores de somatostatina de alta afinidad y mRNA de ambos subtipos, sst₂, sst₅. Es así que las pacientes con cáncer de mama metastático estrógeno-independiente podrían beneficiarse del tratamiento con análogos de la somatostatina citotóxicos, como AN-238.

Cáncer Ovárico Epitelial

La mayoría de las piezas quirúrgicas de cáncer ovárico epitelial humano muestran sitios de unión de alta afinidad por RC-160 radiomarcado y también se demostró la expresión de mRNA de sst₂, sst₃, y sst₅.^{10,49} Por ende, los cánceres de ovario también podrían ser el blanco de los análogos citotóxicos de somatostatina. En cánceres de ovario humanos UCI-107 con receptores de somatostatina positivos, xenotransplantados a ratones desnudos, el

volumen y el peso tumorales se redujeron un 67.3% después de dos inyecciones I.V. de AN-238,³⁰ mientras que AN-201 fue tóxico e inactivo. AN-238 puede proporcionar una modalidad terapéutica para las pacientes con carcinoma de ovario avanzado.

Cuadro II. Efficacy of treatment with targeted cytotoxic somatostatin analog AN-238, and cytotoxic bombesin analog AN-215, both containing 2-pyrrolino-DOX, on various human experimental cancers

Tumor models	Efficacy of AN-238	Efficacy of AN-215
Prostate		
Dunning R3327H (rat)	xxxx ¹	ND ²
PC-3 (human)	xxxx	xxx
DU-145 (human)	xxx	ND
Breast		
MX-1 (human)	xxxxx	ND
MDA-MB-231 (human)	xxx ³	ND
MCF-7 MIII (human)	xxx ³	ND
Ovarian		
UCI-107 (human)	xxx	ND
Renal		
SW-839 (human)	xxx	ND
786-0 (human)	xxxx	ND
Brain		
U87-MG (human)	xxxxx	xxx
Lung		
H-69 (human SCLC)	xxxx	xxxx
H-157 (human non-SCLC)	xxxx	ND
Pancreatic		
SW-1990 (human ductal)	xxxx	ND
Colorectal		
HCT-15 (human)	xxxx	ND
HT-29 (human)	xxxx	ND
Melanoma	BD ⁴	-
Lymphoma	BD ⁴	

¹ xxxxx = regression/cure, xxxx = > 70% growth inhibition, xxx = 50-70% growth inhibition, xx = < 50% growth inhibition.

² Not determined.

³ After initial regression.

⁴ Being determined

Carcinoma de Células Renales (CCR)

El pronóstico de los pacientes con CCR es malo debido a su resistencia tanto a la quimioterapia como a la radioterapia.¹⁰ Los métodos actuales del tratamiento del CCR deben ser mejorados. En vista de que más del 70% de los CCR expresan sitios de unión de alta afinidad por la somatostatina,⁵¹ evaluamos los efectos de AN-238 sobre el crecimiento de xenoinjertos de líneas de CCR humano en ratones desnudos.⁵² En preparaciones de membrana de

las líneas cancerosas SW-839 y 786-0 se encontró la unión de AN-238 con alta afinidad y una inhibición muy potente con CCR metastático 786-9 implantado ortotópicamente. Tres de los 7 ratones tratados con AN-238 estaban libres de tumores al final del experimento y sólo un ratón desarrolló metástasis a ganglios linfáticos.

En contraste, se observaron metástasis en 5 de 6 animales, tanto en el grupo control como en el grupo tratado con AN-201. No se observó un efecto antitumoral significativo de AN-238 sobre los xenoinjertos CAKI-1 con receptores de somatostatina negativos. Este estudio demuestra que el análogo citotóxico dirigido de somatostatina AN-238 proporciona un tratamiento efectivo para el CCR. Esta modalidad terapéutica podría ser especialmente beneficiosa para los pacientes con enfermedad metastásica.

Tumores Cerebrales

En Estados Unidos, alrededor de 13,000 muertes se atribuyen cada año a tumores cerebrales. Los glioblastomas representa la forma más común de los tumores cerebrales primarios y se consideran como incurables. Los glioblastomas de grado bajo (astrocitomas) expresan ss_{t_2} , lo que hace que esta patología maligna sea susceptible de quimioterapia con análogos de somatostatina.⁵³ Dado que los glioblastomas humanos U-87 MG expresan receptores de somatostatina, probamos AN-238 en modelos subcutáneos y ortotópicos en ratones desnudos. Una sola inyección de AN-238 indujo una inhibición del 82% del crecimiento de los tumores subcutáneos. En ratones con tumores U-87 MG cultivados ortotópicamente, AN-238 produjo una prolongación significativa de la supervivencia, lo que indica que la barrera hematoencefálica tumoral es penetrable por el análogo citotóxico de somatostatina AN-238. Los análogos citotóxicos de somatostatina podrían considerarse para el desarrollo de la terapia dirigida en algunos tumores cerebrales.

Carcinoma Pulmonar de Células Pequeñas y de Células No-Pequeñas

El cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad por cáncer en el mundo occidental y se requieren nuevas modalidades terapéuticas tanto para el cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC), como para el cáncer pulmonar de células no-pequeñas. El SCLC representa alrededor del 20% de todos los cánceres pulmonares y la mayoría de los casos ya son metastáticos al momento del diagnóstico. La quimioterapia puede usarse para el tratamiento, pero la tasa de supervivencia de largo plazo es baja.¹⁰ Un elevado porcentaje de los tumores primarios de SCLC y de las lesiones metastásicas expresan los receptores de somatostatina.⁴⁴

Cuando tratamos a ratones desnudos portadores de injertos de SCLC-H-69 con AN-238, una sola dosis produjo una inhibición >50% del crecimiento tumoral.⁵⁴ Tres dosis de AN-238 inhibieron el crecimiento tumoral durante más de 42 días. Los tumores H-69 expresaron altos niveles de mRNA de ss_{t_2} . El tratamiento con AN-238 también produjo una muy potente inhibición (91%) del crecimiento del cáncer pulmonar de células no-pequeñas H-157 debido a la presencia del receptor murino de ss_{t_2} y ss_{t_5} en la vasculatura tumoral.⁵⁴ Estos resultados son un ejemplo de una terapia dirigida exitosa basada en los receptores de somatostatina en la vasculatura tumoral, cuando las células tumorales mismas tienen receptores de somatostatina negativos.

Cáncer de Páncreas

El pronóstico de los pacientes con carcinoma ductal de páncreas es muy malo y es esencial desarrollar terapias más efectivas. Algunos estudios indican la fijación de un octapéptido radionúclido de somatostatina a los cánceres pancreáticos y también se reportó la expresión de mRNA de ss_{t_3} y ss_{t_5} .⁴³ En consecuencia, probamos AN-238 en líneas de cáncer de páncreas humano xenoinjertado en ratones desnudos.⁵⁵ El crecimiento de cánceres pancreáticos humanos SW-1990 que contienen ss_{t_3} y ss_{t_5} fue inhibido de manera significativa por AN-238. Nuestros resultados sugieren que los pacientes con cánceres de páncreas exócrinos que expresan los subtipos de receptores 5 y/o 3 podrían beneficiarse del tratamiento con el análogo citotóxico de somatostatina AN-238. La imagen centellográfica con Octreoscan puede ayudar a la selección de los pacientes apropiados para la terapia dirigida con AN-238. También se demostró en cánceres de páncreas PC-1.0 de hamsters inducidos químicamente, que una transfección estable de estas células con ss_{t_2} (PC-1.0/ ss_{t_2}) reduce significativamente la tasa de crecimiento *in vitro* y en un modelo ortotópico.⁵⁶ El tratamiento de hamsters portadores de aloinjertos ortotópicos de células PC-1.0/ ss_{t_2} con AN-238 redujo todavía más el crecimiento de este cáncer, lo que indica que AN-238 podría usarse en combinación con la terapia génica a base de ss_{t_2} para el tratamiento de esta patología maligna que actualmente es incurable.⁵⁶

Cánceres Colorrectales

El cáncer colorrectal es un importante problema en los países occidentales. El cáncer de colon avanzado es difícil de tratar. La resistencia al tratamiento de los cánceres colorrectales avanzados muchas veces se relaciona con las mutaciones en el gen supresor de tumores *p53*.⁵⁷ Dado que el subtipo 5 de los receptores de

somatostatina (sst₅) está presente en los carcinomas colorrectales, probamos el análogo citotóxico dirigido a somatostatina AN-238.⁵⁷ AN-238 inhibió el crecimiento de los cánceres colorrectales HCT-15 y HT-29 que expresan la p53 mutante, mientras que AN-201 y DOX no mostraron ningún efecto. Entonces, el análogo citotóxico de somatostatina AN-238 puede inhibir el crecimiento de cánceres de colon experimentales que expresan los sst, independientemente de su estado en términos de p53.

Todos estos estudios demuestran diferencias importantes en la eficacia entre un análogo convencional como RC-160 y un análogo citotóxico como AN-238. Por ende, es posible que análogos citotóxicos muy potentes o somatostatina como AN-238 puedan ser dirigidos incluso a tumores con una baja concentración de receptores de somatostatina, y puedan producir respuestas clínicas efectivas.

Efectos Secundarios

Como los receptores de somatostatina están ampliamente distribuidos en diversos tejidos, incluidas las células del tubo digestivo que proliferan rápidamente, se preveían algunos efectos secundarios del tratamiento con análogos citotóxicos y radiomarcados de somatostatina. No obstante, en los numerosos estudios realizados con AN-238 en roedores, no hubo ninguna toxicidad específica del tubo digestivo, la hipófisis o los riñones. En consecuencia, en dos estudios no encontramos cambios significativos en la función hipofisiaria al determinar los niveles basales de hormona del crecimiento (GH) o los niveles de GH estimulados por la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) antes de finalizar los experimentos, lo que está de acuerdo con nuestros estudios sobre el efecto del análogo citotóxico de LHRH AN-207 sobre la función hipofisiaria de las ratas.^{35,47,48} Además, algunos estudios en ratas y en ratones desnudos con supresión de la actividad de la esterasa mostraron que estos animales toleran dosis de AN-238 hasta tres veces mayores que la de AN-201.^{37,46} Por ende, los ratones desnudos libres de tumores con supresión de la actividad de la esterasa pudieron tolerar dos inyecciones consecutivas de AN-238 a una dosis de 400 nmol/kg i.v. mientras que una dosis de 400 nmol/kg de AN-201 fue letal. Esta mayor tolerancia de AN-238 pudo ser revertida bloqueando los receptores con una dosis alta del octapéptido de somatostatina RC-160 antes de la inyección de AN-238 a 400 nmol/kg, lo que mató al 50% de los animales dentro de los 11 días siguientes a una sola inyección. Estos resultados indican que el posible daño ocasionado por AN-238 a los tejidos normales que tienen receptores de somatostatina positivos es menos perjudicial que el daño causado por la liberación sistémica del radical AN-201. La ausencia del daño permanente ocasionado por AN-238 en la hipófisis puede explicarse por el hecho de que

AN-238 es menos dañino para las células de proliferación lenta. En el caso de las células de proliferación rápida del tubo digestivo, hay que suponer que las células no diferenciadas en reposo pueden reemplazar a las células dañadas sin efectos secundarios aparentes. Puede ser importante señalar que uno de nuestros primeros análogos citotóxicos de somatostatina que contenía el antimetabolito metotrexato, ocasionó una diarrea aún más severa que el metotrexato mismo en ratones desnudos portadores de tumores pancreáticos MIA-PaCa-2.³⁸ En general, nuestros hallazgos sobre la toxicidad de AN-238 están de acuerdo con las observaciones clínicas en el sentido de que no hubo toxicidad o sólo hubo toxicidades de grado bajo en los riñones y la hipófisis después de la terapia exitosa con análogos radionúclidos de somatostatina.⁴⁶

Análogos Citotóxicos de Bombesina/Péptido Liberador de Gastrina

El péptido liberador de gastrina (GRP) tiene 27 aminoácidos y su decapeptido de la terminal carboxilo es similar al tetradecapéptido bombesina.⁵⁹ GRP está ampliamente distribuido en los pulmones y el tubo digestivo, es producido en SCLC, cáncer de mama, de próstata y de páncreas, y funciona como factor de crecimiento.^{10,59,60} Se han identificado cuatro subtipos de receptores asociados con la familia de péptidos similares a la bombesina.^{4,10,60,61,62}

El hallazgo de que la bombesina o GRP puede funcionar como un factor de crecimiento autócrino de diversos tumores estimuló el desarrollo de los antagonistas de bombesina/GRP y en nuestro laboratorio se sintetizaron diversos antagonistas, incluidos RC-3095 y RC-3940-II, que están siendo sometidos a pruebas clínicas.^{10,63}

Dado que los receptores de bombesina/GRP se expresan en varios tumores, también se ha propuesto la aplicación de análogos de bombesina radiomarcados para la detección de tumores.⁶⁴ Los análogos de bombesina marcados con ¹¹¹In permiten la visualización de los tumores. Sintetizamos conjugados citotóxicos dirigidos de bombesina usando antagonistas de la bombesina como transportadores.⁴ Así, se preparó el conjugado citotóxico superactivo de bombesina AN-215 enlazando el radical AN-201 a la terminal amino de des-D-Tpi-RC-3095. Este análogo se probó en diversos modelos de tumores, (Cuadro II).

Carcinoma pulmonar

Los receptores de los péptidos similares a la bombesina se encuentran en varias líneas de cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC).^{60,61} Los mecanismos de los receptores de bombesina/GRP pueden desempeñar una

función en el desarrollo de los cánceres pulmonares en los fumadores. Se reportó que el gen del receptor GRP está activado en las células del epitelio bronquial después de la exposición prolongada al tabaco y vuelve a las células susceptibles al desarrollo de cáncer.⁶⁵ Demostramos que el crecimiento de tumores H-69 de SCLC en ratones desnudos es inhibido en gran medida con el tratamiento con AN-215.⁶¹ El radical AN-201 fue tóxico y no produjo más que una inhibición tumoral menor. El análogo citotóxico de bombesina AN-215 podría considerarse para la terapia dirigida de tumores que expresan los receptores de bombesina, como el SCLC.

Cáncer de Próstata

Los neuropéptidos como el GRP producidos por las células neuroendócrinas en la próstata pueden activar las vías mitogénicas. La interferencia con GRP puede mejorar el manejo del cáncer de próstata resistente a los andrógenos.¹⁰ La expresión de los receptores de GRP en la próstata puede correlacionarse con la transformación neoplásica del tejido.⁶⁴ Los receptores de alta afinidad por bombesina/GRP fueron detectados en muestras de cáncer de próstata humano y en las líneas de cáncer de próstata humano PC-3 y DU-145.^{10,62} Se probó el análogo citotóxico de bombesina AN-215 en ratones desnudos portadores de cánceres de próstata humanos PC-3 andrógeno-independientes.⁶⁶ El tratamiento con AN-215 ocasionó una reducción de alrededor del 70% del volumen tumoral y prolongó considerablemente el tiempo de duplicación tumoral. El radical citotóxico AN-201 no fue efectivo y fue más tóxico. Dado que los receptores de bombesina están presentes en los cánceres de próstata metastásicos, la quimioterapia dirigida con AN-215 debería beneficiar a los pacientes con carcinoma prostático avanzado que ya no responden a la ablación androgénica.

Tumores Cerebrales

Diversos tumores cerebrales y líneas de células de glioblastoma humanas contienen receptores de bombesina/GRP. El tratamiento de glioblastoma humano U-87MG experimental en ratones desnudos con AN-215 inhibió efectivamente el crecimiento tumoral.⁶⁷ El radical citotóxico AN-201 a la misma dosis no fue efectivo. El efecto antitumoral de AN-215 pudo ser bloqueado por el pre-tratamiento con una dosis excesiva de un antagonista de la bombesina, lo que indica que la acción de este análogo citotóxico está mediada por los receptores. En consecuencia, los pacientes con tumores cerebrales inoperables, como los gliomas malignos, también podrían ser tratados con quimioterapia dirigida basada en el análogo citotóxico de bombesina AN-215.

Efectos Secundarios

De manera similar a los receptores de somatostatina, los receptores de bombesina/GRP están ampliamente distribuidos en el cuerpo, incluido el tubo digestivo. Para estimar la toxicidad específica de los receptores de GRP, realizamos dos estudios para evaluar el efecto de AN-215 sobre el nivel de gastrina sérica estimulada por GRP en ratones, antes de terminar los experimentos. No encontramos ningún daño permanente a la función liberadora de gastrina de las células gastrointestinales en ninguno de los casos.^{66,67}

Estrategias Terapéuticas

En vista de que los receptores peptídicos y los mRNAs de los subtipos de receptores tienen una expresión variable en los diversos cánceres, se requiere una cuidadosa determinación de los receptores y sus subtipos en el tejido tumoral antes de la terapia con análogos citotóxicos.¹⁰ Por ende, las muestras de biopsias de los cánceres primarios y, en algunos casos, de sus metástasis, deben someterse a ensayos de competencia de ligandos, Western Blots, y/o análisis de RT-PCR para determinar la expresión del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de los subtipos de receptores. Los tumores y sus metástasis también podrían visualizarse por centellografía con análogos radiomarcados.¹⁰ Podría entonces instrumentarse una terapia racional con el análogo citotóxico apropiado. Los receptores podrían ser monitorizados durante el tratamiento para detectar los cambios en sus niveles.

La determinación del estado de los receptores de los péptidos por medio de técnicas de muestreo tumoral debería, en consecuencia, guiar las estrategias terapéuticas con análogos peptídicos citotóxicos en los pacientes con diversos cánceres.

Referencias

1. Chabner B. Cancer chemotherapy. Principles and practice. Philadelphia, J.B. Lippincott 1990.
2. Schally AV, Nagy A. Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors. *Eur J Endocrinol* 1999;141:1-14.
3. Nagy A, Schally AV, Armatis P, Szepeshazi K, Halmos G, Kovacs M, Zarandi M, Groot K, Miyazaki M, Jungwirth A, Horvath J. Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone containing doxorubicin or 2-pyrrolinodoxorubicin, a derivative 500-1000 times more potent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996;93:7269-7273.
4. Nagy A, Armatis P, Cai R-Z, Szepeshazi K, Halmos G, Schally AV. Design, synthesis and in vitro evaluation of cytotoxic analogs of bombesin-like peptides containing doxorubicin or its intensely potent derivative, 2-pyrrolinodoxorubicin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:652-656.
5. Nagy A, Schally AV, Halmos G, Armatis P, Cai R-Z, Csernus V, Kovacs M, Koppan M, Szepeshazi K, Kahan Z. Synthesis and biological evaluation of cytotoxic analogs of somatostatin containing doxorubicin or its intensely potent derivative 2-pyrrolinodoxonubicin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1794-1799.

6. **Nagy A and Schally AV.** Targeted cytotoxic somatostatin analogs: A modern approach to the therapy of various cancers. *Drugs of the Future* 2001;26:261-270.
7. **Nagy A, Schally AV.** Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH); A new approach to targeted chemotherapy. *Drugs of the Future*. 2002;27:359-370.
8. **Karten MJ, Rivier JE.** Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective. *Endocr Rev* 1986;7:44-66.
9. **Schally AV.** Luteinizing hormone-releasing hormone analogs: Their impact on the control of tumorigenesis. *Peptides* 1999;20:1247-1262.
10. **Schally AV, Comaru-Schally AM, Nagy A, Kovacs M, Szepeshazi K, Plonowski A, Varga JL, Halmos G.** Hypothalamic hormones and cancer.. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2001;22:248-291.
11. **Schally AV, Comaru-Schally AM, Plonowski A, Nagy A, Halmos G, Rekasi Z.** Peptide analogs in the Therapy of Prostate Cancer. *The Prostate* 2000;5:158-166.
12. **Schally AV, Halmos G, Rekasi Z, Arencibia JM.** The actions of LH-RH agonists, antagonists, and cytotoxic analogs on the LH-RH receptors on the pituitary and tumors. In: Devroey P. Ed. *Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America* 2001;12:17-44.
13. **Emons G, Schally AV.** The Use of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonists and Antagonists in Gynecological Cancers. *Human Reproduction* 1994 ;9:1364-1379.
14. **Irmr G, Bürger C, Muller R, Ortmann O, Peter U, Kakar SS, Neill JD, Schulz KD, Emons G.** Expression of the messenger RNAs for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and its receptor in human ovarian epithelial carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:817-822.
15. **Emons G, Ortmann O, Becker M, Irmr G, Springer B, Laun R, Holz F, Schulz K-D, Schally AV.** High affinity binding and direct antiproliferative effects of LHRH analogues in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 1993;53:5439-5446.
16. **Dondi D, Limonta P, Moretti RM, Marelli MM, Garattini E, Motta M.** Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists on human androgen-independent prostate cancer cell line DU 145: evidence for an autocrine-inhibitory LHRH loop. *Cancer Res* 1994;54:4091-4095.
17. **Limonta P, Dondi D, Moretti RM, Maggi R, Motta M.** Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonists on the human prostatic cancer cell line LNCaP. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:207-212.
18. **Halmos G, Arencibia JM, Schally AV, Davis R, Bostwick DG.** High incidence of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) and LH-RH receptor gene expression in human prostate cancers. *J Urology* 2000;163:623-629.
19. **Fekete M, Wittliff JL, Schally AV.** Characteristics and distribution of receptors for peptide hormones and sex steroids in 500 biopsy samples of human breast cancer. *J Clin Lab Anal* 1989;3:137-141.
20. **Srkalovic G, Schally AV, Wittliff JL, Day G, Jenison EL.** Presence and characteristics of receptors for [D-Trp⁶] luteinizing hormone-releasing hormone and epidermal growth factor in human ovarian cancer. *Int J Oncol* 1998;12:489-498.
21. **Srkalovic G, Wittliff JL, Schally AV.** Detection and partial characterization of receptors for [D-Trp⁶] luteinizing hormone-releasing hormone and epidermal growth factor in human endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1990;50:1841-1846.
22. **Jungwirth A, Schally AV, Nagy A, Pinski J, Groot K, Galvan G, Szepeshazi K, Halmos G.** Regression of Rat Dunning R-3327-H Prostate Carcinoma by Treatment with Targeted Cytotoxic Analog of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone AN-207 Containing 2-Pyrrolinodoxorubicin. *Int. J. Oncology* 1997;10:877-884.
23. **Koppan M, Nagy A, Schally AV, Plonowski A, Halmos G, Arencibia JM, Groot K.** Targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone AN-207 inhibits the growth of PC-82 human prostate cancer in nude mice. *Prostate* 1999;38:151-158.
24. **Plonowski A, Schally AV, Nagy A, Groot K, Krupa M, Navone NM, Logothetis C.** Inhibition of in vivo proliferation of MDA-PCa-2b human prostate cancer by a targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone AN-207. *Cancer Letters* 2002;176:57-63.
25. **Klijn JG, Beex LV, Mauriac L, van Zijl JA, Veyret C, Wildiers J, Jassem J, Piccart M, Burghouts J, Becquart D, Seynaeve C, Mignolet F, Duchateau L.** Combined treatment with buserelin and tamoxifen in premenopausal metastatic breast cancer: a randomized study. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:903-911.
26. **Kahan Z, Nagy A, Schally AV, Halmos G, Arencibia JM, Groot K.** Complete regression of MX- 1 human breast carcinoma xenografts after targeted chemotherapy with a cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone, AN-207. *Cancer* 1999;85:2608-2615.
27. **Chatzistamou I, Schally AV, Nagy A, Armatas P, Szepeshazi K, Halmos G.** Effective treatment of metastatic MDA-MD-435 human estrogen independent breast carcinomas with a targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone, AN-207. *Clinical Cancer Research* 2000;6:4158-4165.
28. **Halmos G, Nagy A, Lamharzi N, Schally AV.** Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone bind with high-affinity to human breast cancers. *Cancer Lett* 1999;136:129-136.
29. **Szepeshazi K, Schally AV, Nagy A.** Effective treatment of advanced estrogen-independent MXT mouse mammary cancers with targeted cytotoxic LH-RH analogs. *Breast Cancer Res Treat* 1999;56:267-276.
30. **Kahan Z, Nagy A, Schally AV, Halmos G, Arencibia JM, Groot K.** Administration of a targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone inhibits growth of estrogen-independent MDA-MB-231 human breast cancers in nude mice. *Breast Cancer Res Treat* 2000;59:255-262.
31. **Miyazaki M, Nagy A, Schally AV, Lamharzi N, Halmos G, Szepeshazi K, Groot K, Armatas P.** Growth inhibition of human ovarian cancers by cytotoxic analogues of luteinizing hormone-releasing hormone. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1803-1809.
32. **Gründker C, Völker P, Griesinger F, Ramaswamy A, Nagy A, Schally AV, Emons G.** Antitumor effects of cytotoxic LHRH analog AN-152 on human endometrial and ovarian cancers xenografted into nude mice. *Am J Ob Gyn.* 2002;187:528-537.
33. **Miyazaki M, Schally AV, Nagy A, Lamharzi N, Halmos G, Szepeshazi K, Armatas P.** Targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone AN-207 inhibits growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancers in nude mice. *Am J Ob Gyn* 1999;180:1095-1103.
34. **Arencibia JM, Bajo AM, Schally AV, Krupa M, Chatzistamou I, Nagy A.** Effective treatment of experimental ES-2 human ovarian cancers with cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone AN-207. *Anti-Cancer Drugs* 2002;13:949-956.
35. **Kovacs M, Schally AV, Nagy A, Koppan M, Groot K.** Recovery of pituitary function after treatment with a targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1420-1425.
36. **Kovacs M, Schally AV, Csernus B, Busto R, Rekasi Z, Nagy A.** Targeted cytotoxic analogue of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) only transiently decreases the gene expression of pituitary receptors for LH-RH. *J Neuroendocrinology* 2002;14:5-13.
37. **Nagy A, Plonowski A, Schally AV.** Stability of cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone conjugate (AN-152) containing doxorubicin-14-O-hemiglutarate in mouse and human serum in vitro; implications for the design of preclinical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000;97:829-834.
38. **Bauer W, Briner U, Doepfner W, Haller R, Huguenin R, Marbach P, Petcher TJ, Pless J.** SMS 201-995: A very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci* 1982;31:1133-1140.
39. **Cai R-Z, Szoke B, Lu R, Fu D, Redding TW, Schally AV.** Synthesis and biological activity of highly potent octapeptide analogs of somatostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:1896-1900.
40. **Patel YC.** Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *J Endocrinol Invest* 1997;20:348-367.
41. **Lamberts SW, Krenning EP, Reubi JC.** The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumors. *Endocr Rev* 1991;12:450-482.
42. **Schally AV.** Oncological applications of somatostatin analogs. *Cancer Res* 1988;48:6977-6985.
43. **Buscail L, Saint-Laurent N, Chastre E, Vaillant JC, Gespach C, Capella G, Kalthoff H, Lluís F, Vaysse N, Susini C.** Loss of sst2 somatostatin receptor gene expression in human pancreatic and colorectal cancer. *Cancer Res* 1996;56:1823-1827.
44. **Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Breeman WA, Kooij PP, Oei HY, van Hagen M, Postema PT, de Jong M, Reubi JC, Visser TJ, Reijts AEM, Hofland LJ, Koper JW, Lamberts SWJ, Krenning EP.** Somatostatin receptor scintigraphy with [111In-DTPA-D-Phe¹]- and [123I-Tyr³]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur J Nucl Med* 1993;20:716-731.
45. **Halmos G, Schally AV, Sun B, Davis R, Bostwick DG, Plonowski A.** High expression of somatostatin receptors and ribonucleic acid for its receptor subtypes in organ- confined and locally advanced human prostate cancers. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2000;85:2564-2571.
46. **Koppan M, Nagy A, Schally AV, Arencibia JM, Plonowski A, Halmos G.** Targeted cytotoxic analogue of somatostatin AN-238 inhibits the growth of androgen-independent Dunning R-3327-AT-1 prostate cancer in rats at nontoxic doses. *Cancer Res* 1998;58:4132-4137.
47. **Plonowski A, Schally AV, Nagy A, Sun B, Szepeshazi K.** Inhibition of PC-3 human androgen-independent prostate cancer and its metastases by cytotoxic somatostatin analogue AN-238. *Cancer Res* 1999;59:1947-1953.
48. **Kahan Z, Nagy A, Schally AV, Hebert F, Sun B, Groot K, Halmos G.** Inhibition of growth of MX- 1, MCF-7, MII and MDA-MB-231 human breast cancer xenografts after administration of a targeted cytotoxic analog of somatostatin, AN-238. *Int J Cancer* 1999;82:592-598.
49. **Halmos G, Sun B, Schally AV, Hebert F, Nagy A.** Human ovarian cancers express somatostatin receptors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:3509-3512.
50. **Plonowski A, Schally AV, Koppan M, Nagy A, Arencibia JM, Csernus B, Halmos G.** Inhibition of the UCI-107 human ovarian carcinoma cell line by a targeted cytotoxic analog of somatostatin, AN-238. *Cancer* 2001;92:1168-1176.

51. **Reubi JC, Kvols L.** Somatostatin receptors in human renal cell carcinomas. *Cancer Res.* 1992;52:6074-6078.
52. **Plonowski A, Schally AV, Nagy A, Kiaris H, Hebert F, Halmos G.** Inhibition of metastatic renal cell carcinomas expressing somatostatin receptors by a targeted cytotoxic analog of somatostatin AN-238. *Cancer Res* 2000;60:2996-3001.
53. **Kiaris H, Schally AV, Nagy A, Sun B, Szepeshazi K, Halmos G.** Regression of U-87MG human glioblastomas in nude mice after treatment with a cytotoxic somatostatin analog AN-238. *Clin Cancer Res* 2000;6:709-717.
54. **Kiaris H, Schally AV, Nagy A, Szepeshazi K, Hebert F, Halmos G.** A targeted cytotoxic somatostatin (SST) analogue AN-238 inhibits the growth of H-69 small cell lung carcinoma (SCLC) and H-157 non-SCLC in nude mice. *Eur J Cancer* 2001;37:620-628.
55. **Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Sun B, Hebert F, Csernus B, Nagy A.** Targeting of cytotoxic somatostatin analog AN-238 to somatostatin receptor subtypes 5 and/or 3 in experimental pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:2854-2861.
56. **Benali N, Cordelier P, Calise D, Pagés P, Rochaix P, Nagy A, Estéve JP, Pour PM, Schally AV, Vaysse N, Susini C, Buscail L.** Inhibition of growth and metastatic progression of pancreatic carcinoma in hamster after somatostatin receptor subtype2 (sst2) gene expression and administration of cytotoxic somatostatin analog AN-238. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9180-9185.
57. **Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Armatís P, Hebert F, Sun B, Feil A, Kiaris H, Nagy A.** Targeted cytotoxic somatostatin analogue AN-238 inhibits somatostatin receptor-positive experimental colon cancers independently of their p53 status. *Cancer Res* 2002;62:781-788.
58. **Radulovic S, Nagy A, Szoke B, Schally AV.** Cytotoxic analog of somatostatin containing methotrexate inhibits growth of MIA-PaCa-2 human pancreatic cancer xenografts in nude mice. *Cancer Letters* 1992;62:263-271.
59. **Sunday ME, Kaplan LM, Motoyama E, Chin WW, Spindel ER.** Gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. *Lab Invest* 1988;59:5-24.
60. **Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A, Minna JD.** Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature* 1985;316:823-826.
61. **Kiaris H, Schally AV, Nagy A, Sun B, Armatís P, Szepeshazi K.** Targeted Cytotoxic analog of bombesin/gastrin-releasing peptide inhibits the growth of H-69 human small-cell lung carcinoma in nude mice. *Br J Cancer* 1999;81:966-971.
62. **Sun B, Halmos G, Schally AV, Wang X, Martinez M.** The presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for 3 receptor subtypes in human prostate cancers. *The Prostate* 2000;42:295-303.
63. **Cai R-Z, Reile H, Armatís P, Schally AV.** Potent bombesin antagonists with C-terminal Leu ϕ (CH₂N)-Tac-NH₂ or its derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12664-12668.
64. **Markwalder R, Reubi JC.** Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer Res* 1999;59:1152-1159.
65. **Shriver SP, Bourdeau HA, Gubish CT, Tirpak DL, Davis AL, Luketich JD, Siegfried JM.** Sex-specific expression of gastrin-releasing peptide receptor: relationship to smoking history and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:24-33.
66. **Plonowski A, Nagy A, Schally AV, Sun B, Groot K, Halmos G.** In vivo inhibition of PC-3 human androgen-independent prostate cancer by a targeted cytotoxic bombesin analogue AN-215. *Int. J Cancer* 2000;88:652-657.
67. **Szereday Z, Schally AV, Nagy A, Plonowski A, Bajo AM, Halmos G, Szepeshazi K, Groot K.** Effective treatment of experimental U-87MG human glioblastoma in nude mice with a targeted cytotoxic bombesin analogue, AN-215 *Br J Cancer* 2002;86:1322-1327.

