

Títol del treball: Derivats de la Neuregulina per bloquejar el receptor HER en cèl·lules tumorals que el sobreexpressen.

Estudiant: Raul Muñoz Rivas

Grau en Biologia

Correu electrònic: raulmunozrivas15@gmail.com

Tutor: Sílvia Barrabés Vera

Cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Sílvia Barrabés Vera

Nom del cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): silvia.barrabes@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Agraïments

Primerament, vull agrair a la tutora del meu treball final de grau, la Doctora Sílvia Barrabés, per haver fet el seguiment del treball, per cedir material per desenvolupar la recerca, per aconsellar-me en moments on no sabia com desenvolupar la feina i, sobretot, per haver-me donat la oportunitat de treballar en un camp de la recerca molt interessant.

També vull reconèixer a la meva família, en especial la meva mare, pel suport que he rebut aquests mesos de treball intens i haver-me donat la oportunitat d'estudiar allò que m'ha agradat.

Finalment vull agrair a tots els meus amics que, d'una manera o una altra, m'han donat forces per seguir endavant amb el projecte.

Índex

Resum	I
Resumen	II
Abstract	III
1. Introducció	1
1.1. El càncer	1
1.2. Receptors HER	2
1.3. Lligands extracel·lulars	6
2. Objectives	10
3. Metodologia	11
3.1. Cerca d'articles	11
3.2. Criteris de selecció	13
4. Aspectes ètics i sostenibilitat	14
5. Resultats i discussió	16
5.1. Interacció entre neuregulina i HER3	16
5.2. Rutes de transducció implicades	18
5.3. Teràpia dirigida	21
5.4. Disseny d'un derivat de neuregulina	24
6. Conclusions	27
7. Referències	28

Resum

El càncer és una malaltia que afecta a gran part de la població mundial, sense importar la localització ni el gènere de la persona. Hi ha moltes investigacions impulsades per la comunitat científica i mèdica amb l'objectiu d'inhibir el creixement tumoral i frenar el procés de metastàsis. Alguns d'aquests nous tractaments van dirigits a marcadors sobreexpressats en càncer, com la família de receptors HER.

HER3 és una proteïna de la membrana plasmàtica la qual no té activitat tirosina-cinasa, per tant no pot fosforilar el seu domini intracel·lular. Necessita d'un altre receptor de la seva família per poder dimeritzar i per d'aquesta manera poder desenvolupar les seves funcions. Aquesta unió específica amb un altre receptor ve mediada pel seu lligand, la neuregulina. Un cop HER3 dimeritza amb EGFR, HER2 o HER4, desencadena un seguit de rutes de senyalització intracel·lular que causen el creixement anòmal i proliferació de les cèl·lules canceroses si els receptors es troben desregulats.

Actualment, s'estan desenvolupant un seguit de teràpies dirigides que reconeixen aquests biomarcadors implicats en processos tumorals. Un dels exemples d'aquests tractaments són la creació d'anticossos específics o inhibidors del domini intracel·lular, entre d'altres. En aquest treball es proposa com a estratègia la modificació del lligand de HER3, la neuregulina, amb la finalitat d'aconseguir major afinitat pel seu receptor. Els estudis indiquen que un canvi aminoacídic en el domini *egf*, la regió del lligand on interactua directament amb HER3, pot aconseguir un canvi d'afinitat, d'igual manera que canvis d'aminoàcids situats a la perifèria per a què puguin formar noves unions amb el receptor. Amb aquest canvi es poden crear pèptids vehiculadors (PDC) que consistirien en la neuregulina modificada unida a un agent terapèutic que alliberi compostos citotòxics a cèl·lules amb el receptor HER3 sobreexpressat.

Aquest treball final de grau pretén fer una recerca bibliogràfica que englobi l'estudi de la interacció entre el lligand i el receptor, les conseqüències que es desencadenen un cop dimeritza HER3 i la situació actual de les teràpies dirigides. Alhora, es proposa un model basat en la modificació del lligand a través de programes informàtics per estudiar la dinàmica molecular entre la neuregulina-1 modificada i la *wild-type*, i un posterior docking per preveure les interaccions que es formin.

Resumen

El cáncer es una enfermedad que afecta a gran parte de la población mundial, sin importar la localización ni el género de la persona. Hay muchas investigaciones impulsadas por la comunidad científica y médica con el objetivo de inhibir el crecimiento tumoral y frenar el proceso de metástasis. Algunos de estos nuevos tratamientos van dirigidos a marcadores sobreexpresados en cáncer, como la familia de receptores HER.

HER3 es una proteína de la membrana plasmática que no tiene actividad tirosina-cinasa, por lo tanto, no puede fosforilar su dominio intracelular. Necesita de otro receptor de esta familia para poder dimerizar y así poder desarrollar sus funciones. La unión específica a otro receptor viene mediada por su ligando, la neuregulina. Una vez dimeriza HER3 con EGFR, HER2 o HER4, desencadena una serie de rutas señalización intracelular que causan el crecimiento anómalo y proliferación de células cancerosas si los receptores se encuentran desregulados.

Actualmente, se están desarrollando una serie de terapias dirigidas que reconocen estos biomarcadores involucrados en procesos tumorales. Uno de los ejemplos de estos tratamientos son la creación de anticuerpos específicos o inhibidores del dominio intracelular, entre muchos otros. En este trabajo se propone como estrategia la modificación del ligando de HER3, la neuregulina-1, cuya finalidad es la de conseguir mayor afinidad por su receptor. Los estudios indican que un cambio aminoacídico en el dominio *egf*, la región del ligando donde interactúa directamente con HER3, puede lograr un cambio de afinidad, de la misma manera que cambios en los aminoácidos de la periferia los cuales pueden formar nuevas uniones con el receptor. Con este cambio se pueden crear péptidos vehiculadores (PDC) que consistirían en la neuregulina modificada unida a un agente terapéutico que libere compuestos citotóxicos en células con el receptor HER3 sobreexpresado.

Este trabajo final de grado pretende hacer una búsqueda bibliográfica que englobe el estudio de la interacción entre el ligando y el receptor, las consecuencias que se desencadenan una vez HER3 dimeriza y la situación actual de las terapias dirigidas. A su vez, se propone un modelo basado en la modificación del ligando a través de programas informáticos para estudiar la dinámica molecular entre la neuregulina-1 modificada y la *wild-type*, y un posterior docking para prever las interacciones que se forman.

Abstract

Cancer is a disease that affects a large part of the world's population, no matter the location nor the gender of the person. The scientific and medical community has done much research to inhibit tumor growth and slow down the process of metastasis. Some of these new treatments are directed against overexpressed markers in cancer, like the HER receptor family.

HER3 is a protein of the cell membrane which does not have tyrosin-kinase activity, so it cannot phosphorylate its intracellular domain. It needs another receptor of the family to dimerize and thus be able to make its function. This specific binding with another receptor is mediated by its ligand, neuregulin. Once HER3 dimerizes with EGFR, HER2, or HER4 it triggers a bunch of intracellular signaling pathways that cause overgrowth and proliferation of cancerous cells if these receptors are deregulated.

Nowadays, several targeted therapies that recognize these biomarkers involved in tumor processes are being developed. For instance, some of these treatments are the creation of specific antibodies or intracellular domain-inhibitors. In this work, a strategy is proposed based on the modification of the ligand of HER3, like neuregulin-1, in order to acquire an increased affinity for its receptor. The studies indicate that amino acid changes located in the *egf* domain, the region of the ligand that interacts with HER3, could change the binding affinity, as well as amino acid changes located on the peripheral region could form new bonds with the receptor. With these, vehicular peptides (PDC) can be created, which consists in the modified-neuregulin bound to a therapeutic agent that could release cytotoxic compounds into HER3-overexpressing cells.

This final degree project consists on a bibliographic research that includes the study of the interaction between the ligand and the receptor, the consequences once HER3 dimerizes, and the state of the art on targeted therapies. Furthermore, a ligand-modified based model is proposed, using informatic programs to study the molecular dynamics of the modified and the *wild-type* neuregulin-1, and a subsequent docking simulation to predict the studied and novel interactions.

1. Introducció

1.1. El càncer

El càncer és la principal causa de mort arreu del món i afecta a tots els països sense importar el seu nivell econòmic. A més, el grau d'incidència i mort causada per aquesta malaltia s'espera que augmentin de valor al mateix moment que les poblacions creixin en número i adaptin comportaments que poden incrementar aquest risc (1). Aquesta malaltia es considera que conté un component genètic i un ambiental. Aproximadament, entre el 5 i 10% dels casos es donen per anomalies genètiques, i l'altre 90 o 95% s'ha demostrat que es dona pels factors ambientals i estil de vida, dins els quals s'engloba la dieta, el consum de tabac, el consum d'alcohol i la contaminació, entre d'altres (2).

Aquesta malaltia es caracteritza per actuar en diferents teixits o òrgans formant tumors localitzats. A més, en alguns casos, les cèl·lules canceroses poden separar-se dels tumors i transportar-se pel torrent sanguini i sistema limfàtic, formant nous tumors a altres regions. A aquest procés se l'anomena metàstasi.

Les taxes de d'incidència i mortalitat varia molt entre països, així com també ho fa el tipus de càncer que afecta a la població masculina i femenina. Al 2018, els tumors més freqüents al món van ser els de pulmó, mama, còlon i recte, pròstata i estómac (Fig. 1) (3). Dos anys més tard, a Espanya es va estimar que el nombre de casos havia augmentat fins a 277.394 afectats, passant a ser el càncer de còlon i recte, pròstata i mama els més freqüents a la població.

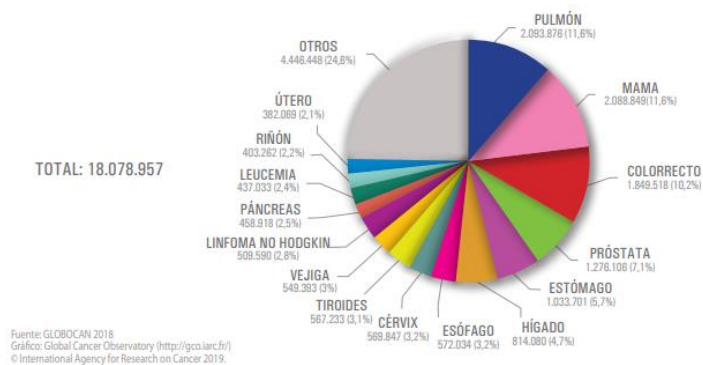


Figura 1. Tumors més freqüents diagnosticats a tot el món per ambdós sexes. Recuperat de (3).

Com s'ha comentat, una gran proporció de casos es poden prevenir a través de mesures com el control en el consum de tabac, la vacunació, la detecció primària i promovent estils de vida més saludables. En cas que una persona finalment es trobi afectada pel càncer, existeixen diverses teràpies i procediments per frenar la propagació de cèl·lules canceroses i millorar la qualitat de vida del pacient. Actualment, algunes de les teràpies més utilitzades per inhibir el creixement tumoral han destacat pels seus resultats, com són el cas de la quimioteràpia, la radioteràpia i la cirurgia. Aquests es basen en l'ús d'agents químics (en cas de la quimioteràpia) o raigs X (en cas de la radioteràpia), per disminuir el nombre de cèl·lules; o l'extirpació de les cèl·lules tumorals en el cas de la cirurgia. Tot i així, aquests procediments es caracteritzen també per la gran quantitat d'efectes secundaris que pot donar a la persona malalta, sobretot en els dos primers casos. Fins i tot, depenent de l'estadi de la malaltia, no es pot practicar cirurgia un cop s'ha donat estadi molt desenvolupats de metàstasi.

Davant d'aquesta situació, la comunitat científica i mèdica està desenvolupant una sèrie de noves teràpies per frenar el creixement tumoral. Una de les noves tècniques és l'anomenada teràpia dirigida (*targeted therapy*). Es basa en dirigir selectivament compostos o fàrmacs cap a biomarcadors que s'associen al càncer. Un dels beneficis més destacats d'aquests tractaments és la poca o nul·la quantitat d'efectes secundaris que es pot donar a la persona afectada (1) i poden resultar més beneficiosos a llarg termini si es compara amb la quimioteràpia o radioteràpia. Uns potencials biomarcadors contra els quals es pot dirigir la teràpia dirigida són els receptors sobreexpressats en cèl·lules tumorals, entre ells els receptors de la família HER. De fet, s'ha trobat que l'aplicació de fàrmacs en càncers on es troba implicats diferents membres de la família HER han donat resultats positius i en alguns casos inesperats (4). Es fa servir diferents estratègies per detectar aquests receptors, els quals s'expliquen de manera més estesa a l'apartat 5.3. Per entendre millor com funciona aquesta teràpia, a continuació es presentaran aquests receptors i els seus respectius lligands.

1.2. Receptors HER

Es coneix la família de receptors de factors de creixement epidèrmic (HER) com un grup de molècules transmembrana que activen intracel·lularment vies de senyalització en resposta a senyals extracel·lulars i són reguladors clau pel creixement i diferenciació cel·lular (4). També

se'ls coneix com a receptors EGF o família de receptors tipus I. Engloba un total de 4 membres, que inclouen EGFR (ErbB1 o HER1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) i HER4 (ErbB4). Es coneix que aquest grup de receptors són importants agents terapèutics utilitzats com a diana en tractaments contra el càncer (6).

Aquests receptors comparteixen certes similituds quant als dominis estructurals: contenen un domini extracel·lular d'unió amb el lligand, un transmembranal, un domini intracel·lular amb activitat tirosina-cinasa i un domini intracel·lular C-terminal que conté molts residus de tirosina (Fig. 2A). Aquests, quan es fosforilen, activen múltiples senyals *downstream* (7). Referent al domini extracel·lular, s'han identificat quatre subdominis extracel·lulars en aquest receptor (8, 9): els dominis II i IV, els quals són molt similars en la seva seqüència i tenen gran quantitat de cisteïna, i els dominis I i III, que també tenen gran similitud entre ells (9).

Els receptors HER poden adoptar una conformació "tancada" o una conformació "oberta". Això ve determinat per la presència o absència de lligand i les interaccions entre els subdominis extracel·lulars. En absència de lligand, es diu que el receptor adopta una forma lligada o autoinhibida, on els subdominis II i IV es troben en contacte directe, ocultant el domini de dimerització entre receptors (Fig. 2B) (10). D'altra banda, la unió del lligand als subdominis I i III del receptor causa una conformació estesa o oberta, permetent la interacció amb altres receptors de la família (Fig. 2B) (11).

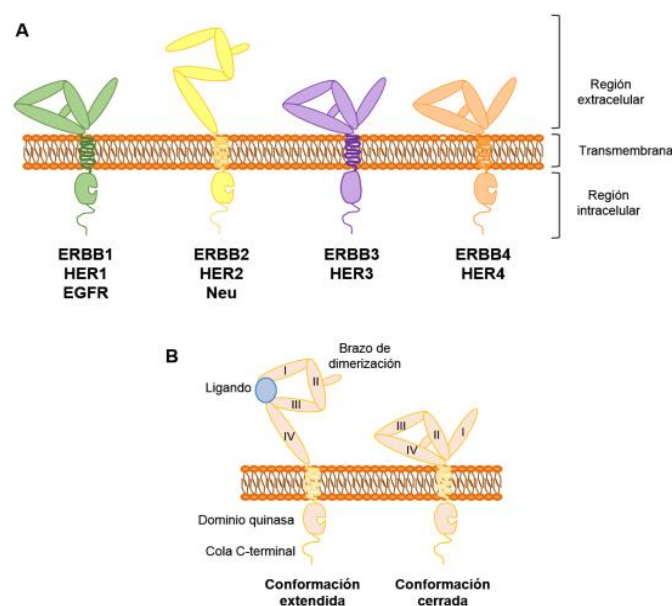


Figura 2. (A) Representació esquemàtica dels quatre receptors HER. (B) Activació dels receptors HER amb el corresponent lligand, provocant canvis conformationals a la proteïna. Recuperat de (8).

El grup de receptors HER es caracteritza per tenir activitat tirosina-cinasa, d'igual manera que altres receptors. No obstant, alguns dels seus membres, com és el cas de HER2 i HER3, contenen característiques que els diferencia d'altres receptors amb la mateixa activitat. HER2 es caracteritza per ser un receptor "orfe" (5), perquè es troba en una conformació oberta permanentment i, a més, no es coneix cap lligand que s'uneixi a la seva regió extracel·lular. Per tant, necessita un altre receptor per formar dímers i que desenvolupi la cascada de senyalització. HER3, en canvi, no té activitat cinasa, pel què necessita d'un altre receptor per a què pugui realitzar aquesta funció (5). És per aquestes característiques que ambdós són coreceptors i sovint formen dímers per poder aparellar les seves funcions i desencadenar respostes referents a la proliferació i creixement cel·lular (12).

EGFR

EGFR és una proteïna de 170 kDa que conté els 3 dominis anteriorment comentats. La unió lligand-receptor pot permetre la interacció amb altres receptors de la mateixa família, causant una homodimerització (unió amb un altre EGFR) o una heterodimerització (amb un altre receptor de la família). En alguns casos, aquesta dimerització també causa internalització del receptor. S'ha vist que aquesta proteïna s'associa amb la inhibició de l'apoptosis, promou la proliferació cel·lular, desencadena l'angiogènesi i potencia la supervivència de cèl·lules tumorals (13). També s'associa una sobreexpressió d'aquest receptor a la formació de tumors localitzats al glioma, coll, mama, pròstata i ronyó, entre d'altres (14).

HER2

Com ja s'ha comentat, HER2 és un receptor que heterodimeritza amb altres membres de la mateixa família degut a la incapacitat de poder interaccionar directament amb lligands extracel·lulars. Per tant, es diu que aquest és un coreceptor que s'uneix generalment amb HER3. S'ha demostrat que anomalies en la expressió o activació d'aquest receptor indica que té un rol important en la progressió i localització del tumor (15). Generalment, es troba involucrat en tumors diversos, on els principals són de tipus epitelial, pulmons, còlon, esòfag, mama, pàncrees i endometri (14). D'igual manera que EGFR, HER2 són importants dianes terapèutiques i avui dia s'hi estan dirigint diferents estratègies per poder inhibir el creixement

tumoral i el procés de metàstasi. Per exemple, s'ha dissenyat anticossos específics que reconeixen el domini extracel·lular quan es troba en conformació desplegada (12).

HER3

HER3 és un receptor de la mateixa família que no conté activitat intracel·lular tirosina-cinasa. Per això, necessita d'un altre receptor per realitzar la seva funció (12). La principal causa que provoca la pèrdua d'aquesta activitat és la modificació d'alguns residus que es troben en el domini intracel·lular (vegeu l'apartat de resultats 5.1). La sobreexpressió de HER3 s'ha reportat en càncers primaris de mama, ovari, pròstata, còlon, pàncrees, estómac, pulmó i cavitat oral (14, 16). Addicionalment, s'ha detectat aquest receptor en altres tipus de càncer que han adquirit resistència a teràpies dirigides contra altres membres de la família HER després d'estar sotmesos a intervencions terapèutiques. Per exemple, en un estudi es va detectar un tumor al pulmó d'un pacient que va generar resistència a inhibidors d'activitat cinasa de EGFR. Aquesta resistència va ser deguda a la amplificació del gen MET, que codifica per un altre receptor cel·lular. L'augment de transcrits va ser causat per l'activació de HER3 i l'activació de la ruta de transducció PI3K (vegeu l'apartat de resultats 5.2) (16).

HER4

Per acabar, HER4 és l'últim membre de la família. Conté una regió molt propera al domini transmembranal que és molt sensible a l'acció de les metal·loproteïnases. Les conseqüències biològiques encara estan per determinar, tot i que es suggereix que aquestes proteïnes causen la escissió del domini extracel·lular del intracel·lular del receptor. No se sap amb certesa què passa amb la regió extracel·lular. Quant a la regió intracel·lular, s'hipotetitza que es transloca cap al nucli i participa en la regulació transcripcional (12). S'ha vist que anomalies en la expressió del receptor poden desencadenar tumors situats a la pròstata i la mama (14).

1.3. Lligands extracel·lulars

Lligands de la família HER

Un lligand és una molècula que interactua específicament amb una proteïna i desencadena funcions molt diverses, depenent del teixit on es trobi. Generalment, els lligands són sintetitzats com a precursors de transmembrana i subseqüentment s'escindeix proteolíticament a través de metal·loproteïnases per a ser alliberats al medi de forma soluble (17). En aquest cas, la família de receptors HER poden interaccionar amb multitud de polipèptids que poden unir-se a una o més proteïnes. Aquest grup de lligands s'agrupen dins la família de l'EGF. Totes aquestes molècules comparteixen una sèrie de característiques per aquests receptors, com el fet que contenen un domini EGF, compost per sis residus de cisteïna espaiats entre ells que formen ponts disulfur, adoptant una estructura secundària amb tres làmina β a la posició N-terminal i una hèlix α (18).

Per cada receptor, hi ha un seguit de lligands que interaccionen específicament amb ells. EGFR és capaç unir l'EGF (*epidermal growth factor*), TGF- α (*transforming growth factor alpha*), AREG (*amphiregulin*), HB-EGF (*heparin-binding epidermal growth factor-like factor*), BTC (*betacellulin*) i EREG (*epiregulin*) (Fig. 3) (12). Els tres primers són específics per al receptor, mentre que la resta també mostren afinitat per HER4. Finalment, EPGN (*epigen*) és l'últim lligand descrit, i té la capacitat d'unir-se específicament a EGFR i HER4 però amb una afinitat molt més reduïda comparat amb EGF (Fig. 3) (19). HER3 té també un lligand específic, anomenat CALEB o CSPG5 (proteoglicà 5 controïtin-sulfat) que té la capacitat d'interactuar amb altres receptors fora de la família HER (Fig. 3). Finalment, HER2, no té la capacitat d'unir-se directament a un lligand i, per tant, es considera un receptor "orfe".

Els diferents lligands promouen patrons específics de fosforilació als diferents receptors, com bé són la duració de la senyalització i les respostes que es poden desencadenar (15).

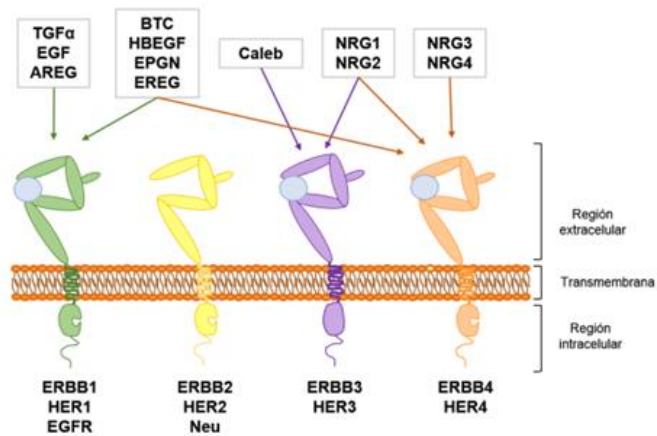


Figura 3. Representació esquemàtica dels receptors HER i llistat dels lligands de la família EGF que interaccionen amb ells. Recuperat de (8).

Neuregulines

Les neuregulines són proteïnes de senyalització cèl·lula-cèl·lula i són lligands específics de la família de receptors HER (20). D'igual manera que els altres membres del grup EGF, aquestes s'uneixen al receptor a través del domini EGF-like. El procés de síntesi dels lligands és molt similar al dels altres membres del grup EGF, són sintetitzats a la membrana de la cèl·lula exposant el mòdul EGF-like a l'exterior. Aquest ve seguit normalment de l'extrem N-terminal que conté diferents dominis propis de la neuregulina, com una seqüència interna hidrofòbica, un domini Kringle, un domini immunoglobulina i regions riques en cisteïnes (20, 21). La regió ectoplasmàtica es troba connectada amb la intraplasmàtica a través de les seqüències hidrofòbiques de la neuregulina, situada al domini transmembranal. Aquestes poden exercir funcions com ancoratge a la membrana i senyalització (21). Un cop ja es troben a la membrana plasmàtica, les neuregulines poden ser alliberades al medi extracel·lular per actuar sobre receptors d'altres cèl·lules (senyalització paracrina), pels seus propis receptors (senyalització autocrina), o activar als receptors HER sense la necessitat de ser alliberada de la membrana plasmàtica (senyalització juxtacrina) (Fig. 4) (22).

Estudis *in vitro* indiquen que les neuregulines actuen com a potents factors mitogènics un cop s'ha donat activació dels receptors HER. Estudis *in vivo* en ratolins indiquen que una sobreexpressió d'aquests lligands genera adenocarcinomes en teixits mamaris i afavoreix la

metàstasi (14, 21). Aquests coneixements són importants alhora de dissenyar i millorar teràpies potencials contra tumors generats per la neuregulina.

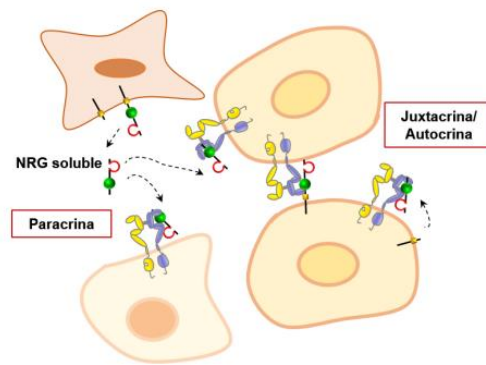


Figura 4. Representació de les comunicacions intercel·lulars entre les neuregulines i els receptors HER.

Recuperat de (21).

Classificació de neuregulines

Les neuregulines són una família de lligands que es troben codificats en quatre gens: NRG-1, NRG-2, NRG-3 i NRG-4 (20). Aquests gens de neuregulina, a més, poden donar fins a 20 tipus diferents d'isoformes en base al splicing alternatiu del mRNA i formar diferents subtipus en el cas de NRG-1 (I, II, III, IV, V, VI), que es diferencien en la naturalesa de la seqüència N-terminal (12, 22).

Generalment, s'uneixen i activen els receptors HER amb activitat tirosina-cinasa, concretament HER3 i HER4, per induir la dimerització entre receptors (23). En el primer cas, HER3 és capaç d'interactuar amb NRG-1 i NRG-2 solament, mentre que HER4 és capaç d'unir-se amb totes les anteriors, incloent NRG-3 i NRG-4 (Fig. 3). No obstant, la situació pot no ser tant simple, i s'estan fent estudis per comprovar si realment hi ha isoformes que no interactuen amb els corresponents receptors (12).

La NRG-1 va ser originalment identificada per l'habilitat d'estimular la fosforilació de HER2. Més tard, es va saber que aquesta estimulació és donada indirectament degut al seu coreceptor més comú, HER3. Aquest gen s'ha estudiat molt exhaustivament i s'han trobat un gran nombre d'isoformes que poden ser produïdes a través de processos d'*splicing* alternatiu de la NRG-1, entre les quals s'inclouen les heregulines (HRGs), factors de creixement glial (GGFs) i factors derivats de neurones sensorials i motores (SMDFs) (24).

El gen que codifica per aquest tipus de neuregulines es troba al cromosoma 8p12. Les isoformes s'expressen específicament a teixits concrets. A més de la generació d'adenocarcinomes, s'ha estudiat que una desregulació del lligand s'ha relacionat amb processos de trastorns bipolars i esquizofrènia (25).

NRG-2 és un gen menys conegut que l'anterior, ja que conté un menor número d'isoformes respecte NRG-1. Tot i així, s'ha vist que hi ha processos implicats en *splicing* alternatiu i poden donar diferents pèptids a partir d'aquesta informació. Es troba localitzat al cromosoma 5q31.2 (26). S'expressa en diferents teixits, donant respostes biològiques molt variades.

Referent a NRG-3, el gen que el codifica es troba al cromosoma 10q23.1 (27). S'han descrit 3 isoformes que presenten poca homologia amb els altres membres de la família. Activa senyalitzacions intracel·lulars i s'ha vist que es troba implicat en la proliferació, migració i diferenciació de neuroblast a través de la seva unió a HER4. També promou la diferenciació de mames durant la embriogènesis (28).

Finalment, NRG-4 és un lligand que forma part de les neuregulines que es troba codificat al cromosoma 15q24.2. És la forma de neuregulina menys homòloga de tota la família (29). Activa els receptors de factors de creixement tipus I, iniciant la senyalització cèl·lula-cèl·lula a través de la fosforilació. Generalment, es troba en el pàncrees adult, però també es troba expressat en càncer de mama i carcinomes avançats de pròstata (29).

L'estudi de la família de receptors HER i els respectius lligands s'ha relacionat amb la formació de processos de càncer i metàstasi. Han sigut un grup d'estudi molt present per el desenvolupament de noves tècniques que puguin inhibir aquesta proliferació. Moltes investigadores i investigadors han desenvolupat la seva recerca i estudis al voltant dels receptors EGFR o HER2. No obstant, pel què respecta a HER3, el desenvolupament de fàrmacs no ha estat tan estès com en el cas dels altres membres, d'igual manera amb NRG-1.

Davant d'aquesta situació, amb la base proporcionada als apartats anteriors, s'ha plantejat que el treball vigent es dediqui al disseny d'una nova teràpia contra HER3 basada en l'estructura del seu lligand NRG-1.

2. Objectives

The main goal of this final project is the search of information to design a modified ligand based on the neuregulin, similar to the natural one but with an increased affinity towards HER3 receptor.

With this aim, several specific objectives have been considered:

- Analyze the interaction between the HER3 receptor and its ligand, NRG-1.
- Observe which pathways are involved in tumor proliferation when this biomarker is dysregulated.
- Discuss the different targeted therapies for HER3 and the members of the family.
- Elaborate a method based on the modification of NRG-1, increasing the affinity to the receptor.

3. Metodologia

Aquest treball s'ha centrat en la recerca d'informació a partir d'estudis previs. Per tant, s'ha tingut molt present diferents aspectes en quant al mètode de recerca que s'ha fet servir.

3.1. Cerca d'articles

La disponibilitat de la informació utilitzada ha estat a través de dos vies principals: recerca d'articles a través de portals especialitzats i informació proporcionada per la tutora responsable.

Pel què fa a la recerca pròpia, s'ha utilitzat diversos portals d'Internet de lliure llicència. Aquests portals s'especialitzen en la divulgació d'articles que han estat revisats i publicats en revistes científiques especialitzades. En aquest cas, la recerca s'ha centrat en els portals de Google Scholar, PubMed i, en menor grau, NCBI i Google. Per tal de trobar articles que s'han fet servir al treball dins d'aquests accessos, es van fer servir múltiples paraules clau a la barra del cercador (Taula 1).

Pel què fa la segona via, la tutora responsable del treball final de grau ha proporcionat un llistat de fins a 8 articles de temàtica similar. Aquest fet ha ajudat a l'autor d'aquest treball a fer una cerca primària d'informació i, si va escaure, revisar articles citats per poder extreure informació que es va creure necessària.

Finalment, tots els articles utilitzats han estat correctament citats a l'apartat, tant a l'interior del text com a l'apartat de referències. S'ha fet servir l'estil APA (*American Psychological Association*) com a principal mètode per referenciar i d'aquesta manera evitar plagi a altres investigadores i investigadors. Per poder citar correctament, s'ha utilitzat Mendeley Desktop, un software informàtic que registra tots els articles utilitzats durant el treball en una base de dades i serveix per citar correctament i de manera automàtica la informació. Posteriorment, s'ha revisat i editat manualment si ha estat necessari.

Taula 1. Llistat dels articles utilitzats i el respectiu procés de cerca.

Mètode d'obtenció	Portal utilitzat	Paraules clau	Articles o textos
Recerca pròpia	PubMed	<i>Cancer, Cancer lifestyle</i>	1, 2
Recerca pròpia	Google	<i>Cancer en España 2020</i>	3
Recerca pròpia	Google Scholar	<i>HER3, HER3 pathway, HER3 cancer</i>	4, 7, 44
Recerca pròpia	PubMed	<i>erbB cancer , erbB tethered conformation , erbB network, erbB cancer</i>	5, 10, 14, 15
Cedit per la tutora	-	-	6, 12, 33, 34, 45, 42, 43, 50
Recerca pròpia	Google Scholar	<i>Derivados neuregulina</i>	8
Recerca pròpia	PubMed	<i>HER3 binding site, HER3 regulation cancer, HER3 mapk</i>	9, 16, 37
Referència de la cita 8	-	-	11, 21, 25, 26, 27, 38
Recerca pròpia	PubMed	<i>EGF receptor</i>	13
Referència de la cita 12	-	-	17
Referència de la cita 32	-	-	18
Recerca pròpia	PubMed	<i>Epigen affinity</i>	19
Referència de la cita 21	-	-	20, 22, 36
Referència de wikipedia	-	<i>Neuregulina</i>	23
Recerca pròpia	PubMed	<i>Neuregulin-1 breast cancer</i>	24
Recerca pròpia	NCBI	<i>NRG-3, NRG-4</i>	28, 29
Recerca pròpia	PubMed	<i>HER cancer therapy</i>	30
Referència de la cita 6	-	-	31
Referència de la cita 35	-	-	32
Recerca pròpia	Google	<i>Terapia dirigida</i>	40
Recerca pròpia	Google Scholar	<i>Targeted therapy cancer</i>	39
Referència de 39	-	-	41
Recerca pròpia	PubMed	<i>TKIs action</i>	45
Referència de 16	-	-	46
Recerca pròpia	PubMed	<i>HER3 targeted therapy, HER3 therapy</i>	47, 48
Recerca pròpia	PubMed	<i>Chimera</i>	49
Referència de la cita 50	-	-	51
Recerca pròpia	Google	<i>Docking software</i>	52, 53

3.2. Criteris de selecció

La cerca d'informació es va fer a partir d' un seguit de consideracions per poder acotar i especificar millor les explicacions i idees utilitzades.

En primer lloc, es va considerar només utilitzar articles revisats respecte als no revisats o que no s'han acceptat en revistes científiques. Aquest fet evita informació que podria ser errònia, plagiada o manipulada. En segon lloc, s'ha utilitzat articles de lliure accés. En tercer lloc, s'ha citat informació provinent de portals de pagament si s'ha referenciat anteriorment en articles de lliure accés. No obstant, en casos on la informació gratuïta es tractava d'una *review*, s'ha citat aquest abans que la informació de pagament, ja que s'entén que l'autor ha fet l'esforç de cercar aquesta idea sense donar plagi. Per acabar, es va establir que les explicacions i procediments citats en el treball s'hagin publicat en revistes científiques que pertanyin a quartils de 1 o 2. No obstant, no sempre ha estat possible (vegeu l'apartat 4).

4. Aspectes ètics i sostenibilitat

Aquest treball ha tingut present en tot moment els aspectes ètics i de sostenibilitat quant a la recollida d'articles i escrits. Tota la informació es troba citada correctament per reconèixer cadascun dels treballs de les investigadores i investigadors involucrats i així evitar plagis. Durant la recollida d'informació també s'ha revisat la ètica i sostenibilitat individual de cada article dels quals tots ells compleixen les obligacions legals. També s'ha tingut en compte els possibles conflictes d'interès de les persones involucrades on a la gran majoria d'aquestes no els hi genera problemes.

Com s'ha comentat a l'apartat de metodologia, la cerca de diferents experiments i treballs no s'ha realitzat en portals i revistes de pagament, per la qual s'ha extret gratuïtament. En casos molt puntuals, s'ha referenciat treballs de portals de pagament. El motiu d'aquest aspecte és el reconeixement de les persones dedicades a la recerca. En molts casos, no només han de pagar per obtenir informació, sinó que també alhora de publicar els seus articles també ho han de fer. Fins i tot, sovint són més cares les publicacions de lliure accés que les privades. La majoria de la comunitat científica no és partidària d'aquest sistema de publicació perquè en molts casos el finançament de projectes d'aquest estil està menys regulat del que hauria. Però, com el currículum de l'investigador depèn de la quantitat i qualitat de les publicacions, en algunes situacions no es poden negar a publicar en revistes. Per tots aquests motius, s'ha primat l'ús d'informació de lliure accés, perquè és important fer servir fonts gratuïtes per arribar a l'abast de tota la societat.

L'últim aspecte que s'ha tingut en compte ha sigut la qualitat de la informació. A l'apartat 3.2 es comenta que inicialment s'ha tingut en compte que les revistes pertanyin als quartils 1 o 2. Tanmateix, no ha estat així sempre. Aquest fet és degut a la fluctuació de les dades que varien cada any, i es poden obtenir valors molt diferents a diferents períodes. A més, que un article s'hagi publicat en una revista amb un factor d'impacte elevat no implica que es trobi en el primer o segon quartil, fins al punt de considerar-se no gaire rellevant.

A partir d'aquest punt, es pot fer una petita reflexió sobre què és el que es considera un article "rellevant" o un article "no rellevant". De cares als estudiants, aquesta informació pot ser complicada de cercar, però amb l'ajut de Google i el portal Scimago Journal, es poden recollir dades, tot i que no siguin dades actualitzades. Per tant, què o qui és el que decideix la qualitat

d'una revista? Aquesta pregunta es pot respondre amb el factor d'impacte, que és el càlcul entre les citacions que s'ha fet entre dos anys respecte al nombre de publicacions entre dos anys. Pot ser un bon indicatiu per determinar la validesa de la informació, però tornant al tema d'abans, referent a les publicacions en revistes de pagament, aquestes poden alterar el paràmetre. Moltes investigadores i investigadors es veuen forçats a publicar en revistes de pagament per augmentar el seu expedient. Aquests portals basats en subscripcions compten amb un propi sistema de revisió per validar la seva informació, donant reconeixement als estudis de la persona encarregada de l'article. Conseqüentment, els articles adquireixen major factor d'impacte i es troba en quartils més elevats.

D'altra banda, les persones que publiquen els seus resultats en plataformes de lliure accés poden veure els seus resultats afectats en quant a qualitat. Això és per la quantitat de publicacions que hi ha penjades, tant revisades com pendents per revisar (*peer-reviewed*). Per tant, a més articles que poden ser més o menys fiables, menors valors de *impact factor* i, per tant, de quartils més baixos. Conseqüentment, pot ser que un article que tingui molta rellevància es trobi publicat en una revista on la majoria de les seves publicacions no són tan rellevants, fet que comporta que la informació publicada sigui menys reconeguda.

Per aquest motiu, s'ha revisat per cada publicació la revista on es va publicar, amb el corresponent factor d'impacte i el quartil què pertany. En algunes excepcions, com en articles citats per *reviews*, s'ha fet servir informació que pertanyia a quartils més baixos, degut a què aquesta pot tenir rellevància però es troba en un portal web amb valors baixos de qualitat. A més, si es troba citat per un altre autor, significa que aquells resultats han estat revisats i es consideren important a incloure.

5. Resultats i discussió

5.1. Interacció entre neuregulina i HER3

En relació amb l'objectiu principal, cercar informació per al disseny d'un derivat de la neuregulina, cal saber primer com és la interacció amb el seu receptor.

L'activació del receptor requereix de dues variables: un lligand i un altre receptor amb el què pugui dimeritzar. Aquest procés és imprescindible per activar la fosforilació i les diferents rutes de transducció del senyal. HER3 és activat principalment per NRG-1 i NRG-2. Un cop es produeix aquesta unió, HER3 pot dimeritzar amb diversos membres de la seva família, formant heterodímers amb els receptors EGFR o HER2 (30). Els dímers més comuns formats en aquest procés són HER2-HER3 (major afinitat i potència que la resta) i EGFR-HER3. També s'han reportat dimeritzacions amb altres receptors que no formen part de la mateixa família, com c-MET (7). D'altra banda, no s'ha trobat evidències que suggereixin una homodimerització entre dos HER3 a la superfície cel·lular degut a la absència d'activitat catalítica, la qual no és capaç d'activar les vies de transducció del senyal sol (31). Per això, dimeritza amb altres receptors amb activitat tirosina-cinasa que puguin exercir i desencadenar respostes fisiològiques.

El fet que causa la dimerització entre receptors encara és una línia de recerca que encara s'està investigant. Als inicis, es van formular dos hipòtesis que podien explicar aquest fet: la dimerització és a causa del contacte directe entre el lligand i els receptors (*ligand-mediated*) o un efecte indirecte que condueix al receptor a fer un canvi conformacional (*receptor-mediated*) (32). No obstant, avui dia aquesta incògnita ha pogut resoldre's en la seva majoria. Estudis de Macdonald i Pike (33) proposen que la unió amb el receptor i el corresponent lligand es pot explicar a través de processos de cooperació negativa en un sistema d'agregació. Aquest sistema indica dos subunitats diferents del receptor, on poden dimeritzar en tres situacions possibles: en absència de lligand, quan una de les dues té lligand i quan les dues tenen lligand (Fig. 5). Cadascuna d'aquestes situacions depenen també del tipus de lligand amb la corresponent afinitat, on aquest s'unirà un cop s'ha format el dímer de receptors si és de baixa afinitat o s'uniran prèviament si són d'elevada afinitat (Fig. 5) (34). Per tant, gràcies a aquest model de dimerització, la hipòtesis més acceptada és la *receptor-mediated*.

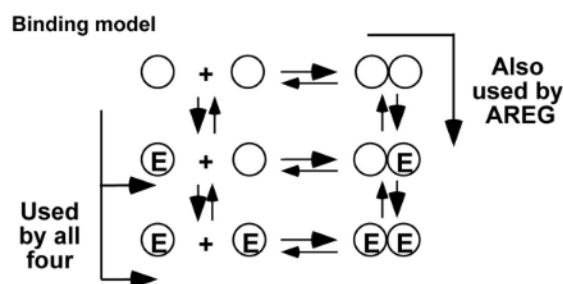


Figura 5. Model de dimerització dels receptors HER, basat en l'exemple de EGFR i els seus lligands. Recuperat de (34).

Com s'ha comentat, el domini extracel·lular del receptor HER3 està compost per quatre subdominis: I, II, III i IV. En absència de neuregulina, el receptor es troba en una conformació auto inhibida deguda a la interacció entre els subdominis II i IV. Però, un cop hi ha presència de lligand, la conformació del receptor canvia, desfent aquesta conformació tancada i formant una nova estructura on els subdominis I i III interactuen individualment amb el lligand, que actua com a "pont" entre les dues subunitats (35). El lloc d'unió entre el lligand i el receptor es troba en el subdomini I, específicament a la posició Tyr⁵⁰ del domini ECD, i aquesta serà protegida de proteòlisis. El subdomini III també col·labora en aquesta unió lligand-receptor (9).

Un cop es troba el dímer activat, el C-terminal de la cua situada al domini intracel·lular és trans-autofosforilada en tirosines a causa de l'activitat cinasa i recluta altres molècules de senyalització *downstream* que contenen dominis SH2 (*phosphotyrosine-binding Src homology-2*) (6). Aquestes tirosines fosforilades de HER3 permeten llocs d'unió per a les molècules de senyalització, a més de PI3K i altres proteïnes que poden mediar en l'activació de diferents rutes de transducció del senyal, com la via de les MAP cinases o la via de AKT (16).

Experiments anteriors van registrar dos llocs d'unió conservats en altres cinases però que no es troben en HER3: un Glu en la hèlix α d'altres cinases (relacionat amb la unió amb ATP) és substituït per una His en HER3 (H740), i un Asp (funció catalítica en altres cinases) és reemplaçat per una Asn (N815). Aquests canvis en el domini intracel·lular del receptor incapaciten la unió amb ATP i el receptor no pot autofosforilar-se (6). Aquest fet explica per què HER3 es troba catalíticament inactiu i necessita d'altres receptors per poder realitzar la seva funció. Així doncs, la unió lligand-receptor provoca un canvi conformacional en els subdominis extracel·lulars, on hi ha la fosforilació dels residus de tirosines, permetent la

formació d'heterodímers de la família de EGFR i provocarà l'activació de grans rutes de transducció del senyal.

5.2. Rutes de transducció implicades

L'activació de diferents rutes depèn també del tipus de lligand. Generalment, les neuregulines i els seus receptors es troben implicats en el control del creixement i desenvolupament de cèl·lules de Schwann. Si aquests receptors es troben mutats, l'organisme no pot formar correctament el sistema nerviós, desencadenant la mort cel·lular de neurones motores i sensorials. Per aquest motiu, es considera que HER3 es troba implicat en un rol molt important en el desenvolupament del sistema nerviós (16). També s'ha vist que mutants de HER3 afecten al desenvolupament de les glàndules mamàries (16, 36). Tot i que no afecta en la proliferació, aquests receptors són requerits per la morfogènesis dels conductes mamaris en models de ratolins. Altres estudis han demostrat que la dimerització entre HER2 i HER3 resulta per una sobreexpressió de HER2 o neuregulina, i provoca una activació oncogènica de la via de PI3K, provocant el creixement de tumors. Per aquest motiu, és molt important saber quines rutes es troben implicades segons el lligand que actua i el tipus de dimerització.

De manera general, les principals rutes implicades en la senyalització per part del receptor HER3 són la via de PI3K o AKT i la via Ras o MAP cinases (14, 37). Com s'ha comentat abans, HER3 és activat per NRG-1 i NRG-2, i aquest acaba per dimeritzar amb HER2, el qual és catalíticament actiu. Activa la via de les PI3K a través de les tirosines fosforilades de HER3, on conté fins a 6 llocs d'unió amb el subdomini regulador p85 de les PI3K. A partir d'aquest punt, hi ha diferents alternatives dins de la ruta, les quals acabaran activant diferents processos referents al desenvolupament tumoral. Aquesta ruta regula la mida cel·lular i la supervivència, el metabolisme i la proliferació, a més de la progressió del tumor i l'angiogènesis (Fig. 6) (38).

La segona via implicada és la via de les MAPK. Comença amb l'activació de Shc a les tirosines fosforilades del domini intracel·lular de HER2, i s'acabarà per transduir el senyal a través d'una cascada de fosforilació entre proteïnes i missatgers intermedis que donen com a resultat la resposta del creixement cel·lular i supervivència (Fig. 6) (14, 37).

Per acabar, hi ha autors com Mishra et al. (37) que proposen una tercera via implicada en l'activació de mecanismes de proliferació cel·lular per la família HER: la via de les JAK/STAT. Aquesta comença amb la fosforilació de Jak2, que acaba fosforilant EGFR i una posterior activació de les MAPK. No obstant, la via JAK/STAT no és d'interès en aquest treball per dos motius: en primer lloc, l'objectiu del projecte és estudiar la interacció de HER3 amb el seu lligand per evitar la dimerització i inactivar la resposta tumoral en certs tipus de càncer. Però, la via de JAK/STAT involucra altres receptors de la mateixa família, com EGFR, però no directament amb HER3 (37). Per tant, no interessa aquesta ruta de transducció perquè és activada a través d'altres receptors de la família. En segon lloc, l'activació d'aquesta via pot donar-se també a través de citoquines, un lligand que no pertany a la família de les neuregulines i, per tant, tampoc és d'especial interès per el treball treball (37).

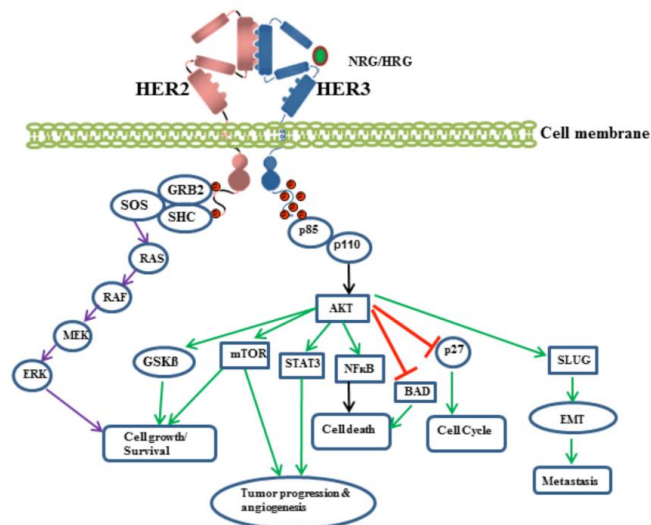


Figura 6. Representació de la heterodimerització entre HER2 i HER3, l'activació de senyalització *downstream* que regulen diferents processos cel·lulars relacionats amb el desenvolupament cel·lular i oncogènic. Recuperat de (37).

Finalment, l'activació de les diferents vies de transducció del senyal acaben donant com a producte principal la transcripció del gen de la neuregulina. La formació prolongada d'aquest producte genera una resposta positiva alhora de la dimerització dels receptors, donant com a resultat major senyalització *downstream* i generant cada vegada més producte, a través d'una retroalimentació. El procés es manté actiu fins que la concentració de lligand supera a la concentració del receptor i, d'igual manera que la dinàmica enzimàtica, quan tots els receptors es troben ocupats ja no es pot generar més resposta, disminuint la seva producció. A més, s'ha

vist que la formació del producte pot tenir efectes en altres rutes de senyalització. Un exemple d'aquests és la activació de les metal·loproteïnases que, com s'ha comentat a l'apartat 1.3, interactua en la maduració del lligand desadherint-lo de la membrana plasmàtica, el qual és també un important mediador en la disseminació metastàtica en cèl·lules de càncer de mama (36). Un altre exemple són les hormones esteroides, que poden tenir un efecte positiu en la senyalització de HER a través de l'activació de la transcripció de gens que codifiquen pel lligand (14).

Un cop s'ha estudiat la interacció i les rutes implicades, es necessita saber també quins són els mecanismes que poden disminuir aquesta expressió. El principal procés que inactiva la senyalització del dímer HER2-HER3 és la internalització dels receptors i lligand. Aquesta entrada via endocitosis és continuada per un reciclatge de HER2 i HER3, on posteriorment seran novament col·locats a la membrana plasmàtica cel·lular. El lligand, en canvi, serà transportat a través d'endosomes cap a lisosomes on s'encarregaran de degradar la neuregulina corresponent (14). No obstant, en malalties que sobreexpressen els receptors de vegades els mecanismes d'internalització i degradació no són suficients per aturar correctament el creixement i divisió cel·lular. Això és degut a les diferents combinacions de dímers que es poden donar en casos, per exemple, on es sobreexpressa HER3. És a dir, tot i que es bloquegi els dímers HER2/HER3, aquests últims també són capaços de heterodimeritzar amb EGFR i HER4. A partir d'aquest fet, hi ha diferents línies de recerca que es dediquen a desenvolupar noves estratègies de teràpia contra el càncer, a través de propostes més directes o indirectes quant al bloqueig de les vies que es troben sobreactivades (40). Els mètodes directes es refereix al reconeixement d'antígens dels tumors per alterar la senyalització a partir del bloqueig d'aquestes proteïnes. Els mètodes indirectes, en canvi, aprofita els antígens per dissenyar lligands amb diferents tipus de molècules efectores (40).

Específicament, l'objectiu d'aquest treball final de grau es centra en el bloqueig directe dels receptors HER3 per aprofitar el mecanisme d'internalització cel·lular i, a partir d'aquí, introduir fàrmacs en contra de la formació tumoral. Aquests mètodes, corresponent a la teràpia dirigida, poden ajudar a la modulació i disminució de processos metastàtics, augmentant la qualitat de vida de la persona afectada.

5.3. Teràpia dirigida

Coneixements previs

Es coneix a la teràpia dirigida com el conjunt de tractaments contra el càncer basats en medicaments que actuen de manera selectiva sobre dianes específiques de la malaltia (40). Aquesta branca de la oncologia normalment s'administra acompanyat dels tractaments comentats a l'apartat 1.1. Avui dia, s'ha millorat la taxa de mortalitat i temps de supervivència, a més que s'han identificat les característiques i rutes de senyal que es troben involucrades en la formació tumoral (39). Hi ha autors que consideren que, tot i així, aquests resultats no han millorat tant i com es pensaven, i es justifiquen dient que encara el 50% dels pacients no responen inicialment a una de les teràpies mencionades, a més que actualment hi ha al voltant de 7 milions de morts a causa d'aquesta malaltia (39). Per aquest motiu, és molt important l'estudi i disseny de noves teràpies per millorar els seus efectes, disminuir les seves limitacions i així reduir els valors de mortalitat anteriors.

Per exemple, una de les limitacions referent a la teràpia dirigida és la encapsulació de compostos, com anticossos monoclonals, en portadors macromoleculars, com els liposomes. En aquests casos, degut a la grandària dels anticossos (elevat pes molecular), comporta a una reducció de transport. El procés implicat, per tant, deriva a una menor concentració del component principal de la teràpia, i dona resultats no tan satisfactoris com es podien preveure, limitant el seu efecte (41). Per aquest motiu, s'estan desenvolupant noves tècniques per poder transportar major dosis al tumor produït. Es fa a través del disseny de molècules que, a més de ser més simples quant a la preparació i més resistents a la degradació (42), són més petites i fàcils de transportar. Un dels exemples és la modificació de lligands, els anticossos conjugats a drogues, o els inhibidors d'alguna funció específica del receptor. Els pèptids vehiculadors es caracteritzen també per reconèixer molècules *upregulated* en la progressió del tumor i angiogènesis. En els casos de tumors de mama, a més, són un dels pocs tumors que acaben per alliberar el compost citotòxic en el teixit afectat (43).

Estratègies desenvolupades a la família HER

Degut a la manca d'activitat intrínseca de la seva cinasa, HER3 roman una diana difícil i desafiant per al desenvolupament de molècules inhibidores. No obstant, hi ha diferents

estratègies desenvolupades per la teràpia dirigida contra la família HER, sobretot pel què respecta als receptors EGFR i HER2 (44).

Anticossos monoclonals (mAb)

En primer lloc, s'han desenvolupat anticossos terapèutics monoclonals que inhibeixen específicament l'habilitat de dimeritzar HER2 amb altres receptors de la seva mateixa família (44). També s'ha reportat estudis amb anticossos específics que bloquegen la dimerització de HER2/HER3 però, al trobar-se HER3 sobreexpressat, s'indueix la dimerització amb un altre receptor de la mateixa família, com EGFR, formant el dímer EGFR/HER3 independentment de l'acció del lligand corresponent (16). Finalment, varis anticossos específics de HER3 que encara es troben en desenvolupament semblen inhibir l'activació de les vies de transducció del senyal, específicament la via PI3K. No obstant, també sembla ser que pot haver una regulació que contribueix a la resistència d'aquests dependent de la varietat del tumor (7).

El desenvolupament d'anticossos monoclonals és de les estratègies més explotades. Per exemple, MM-121, un anticòs monoclonal específic contra HER3, es creu que competeix amb el lligand, prevenint la heterodimerització amb altres receptors. LJM716, en canvi, va ser creat a partir dels subdominis II i IV del domini extracel·lular del receptor, i s'adhereix al receptor quan es troba de forma inactiva. Per acabar, U3-1287, el qual el seu mecanisme d'acció no es troba tan ben descrit, es creu que promou la desregulació de la expressió de HER3, possiblement a través d'un increment d'endocitosis al formar-se el complex HER3/U3-1287 (7).

Inhibidors d'activitat tirosina-cinasa (TKIs)

Tal i com indica el seu nom, són molècules inhibidores de caràcter reversible i competitiu (amb excepcions) que actuen al domini intracel·lular, adherint-se a les tirosines i evitant que aquestes siguin fosforilades per ATP. Conseqüentment, causen la inhibició de l'activitat, reprimint les senyals *downstream* que controlen els processos de proliferació i supervivència cel·lular (45). Mitjançant aquesta aproximació, s'han descrit i construït molècules basades en els receptors EGFR i HER2, com és el cas del Gefitinib.

Hi ha estudis on es reporten que la senyalització HER3/PI3K no és efectivament inhibida pels TKIs (46). No obstant, un estudi recent, impulsat per Xie et al. (47), van dissenyar un fàrmac, anomenat TX1-85-1, que s'uneix de manera irreversible a la Cys721, localitzada al lloc d'unió ATP-HER3. Aquesta molècula té una activitat similar als TKIs, però difereix en què s'uneix covalentment a diferents punts on hi ha unió amb ATP. Es va observar que efectivament el fàrmac es va poder unir al receptor i, tot i que no va evitar inhibir les funcions de HER3, com la fosforilació *downstream* en línies de càncer pulmonar, sí que es va aconseguir induir parcialment la degradació del receptor. Tot i que HER3 no té activitat cinasa, es creu que el punt d'unió amb ATP és important estructuralment quant a la formació d'heterodímers (47). Per tant, en l'article va veure's que la unió covalent amb el domini intracel·lular de HER3 va interferir en la heterodimerització, atenuant la senyalització *downstream*.

Anticossos conjugats a drogues (ADCs)

Un ADC està format per un anticòs monoclonal unit covalentment a un compost citotòxic (8). El mecanisme d'acció inclou diferents processos com la unió amb la diana (en aquest cas, la unió amb HER3), internalització de l'anticòs, tràfic intracel·lular i alliberació (48).

Després d'unir-se l'ADC amb el receptor, aquest complex promou la internalització i translocació cap a compartiments lisosòmics on el fàrmac es degrada i el compost citotòxic causa la mort cel·lular. Per exemple, el Patritumab és un anticòs que reconeix específicament el domini extracel·lular de HER3 i inhibeix la fosforilació induïda per la neuregulina, reprimint el creixement de tumors. Aprofitant aquest, es va crear U3-1402, un ADC específic de HER3, i es va observar que indueix la internalització del receptor, atenuant la senyalització i inhibint parcialment el creixement. Malauradament, el fàrmac va ser notablement efectiu només en 1 de 8 línies cel·lulars, corresponent a teixit mamari (48).

Una de les possibles explicacions, comentada anteriorment (41), és la grandària de l'anticòs. Degut al seu elevat pes molecular, els anticossos difonen menys per teixits afectats, causant menor resposta contra el tumor i disminuint la seva eficàcia d'acció. A partir d'aquest fet, es poden fer dissenys de pèptids vehiculadors (PDC) que poden difondre millor per arribar a més dianes responsables de la malaltia, evitant els efectes secundaris de la quimioteràpia (35).

Per tot això, en el vigent projecte, es vol proposar un disseny per a la modificació del lligand de HER3 (NRG-1), de manera que pugui realitzar el mateix mecanisme que fa un ADC: vehiculació fàrmac a la diana, internalització i alliberació de compostos citotòxics que causin la mort de les cèl·lules tumorals.

5.4. Disseny d'un derivat de neuregulina

Estudis previs

La teràpia dirigida també s'ha fet servir per generar estratègies contra tumors on hi ha una sobreexpressió de la família HER. Avui dia hi ha molts estudis i articles que descriuen detalladament l'acció de productes dissenyats per inactivar la proliferació en casos on EGFR i HER2 es fan servir com a diana. No obstant, pel què fa a HER3, no es veuen en gran quantitat i des de fa uns anys es consideren pioneres totes aquelles línies de recerca que es dediquen a elaborar diferents estratègies a tumors específics de HER3.

Inicialment, estudis com els de Ballinger i companyia (32) van modificar la heregulina per observar si havia derivats amb major afinitat. Van crear un banc de dades amb modificacions del lligand a través de canvis d'entre 4 a 6 aminoàcids en 9 punts diferents del domini *egf*. Es va concloure que hi ha alguns mutants que van millorar l'afinitat, sobretot aquells que al randomitzar-se formaven noves interaccions a la perifèria, sense canviar substancialment la unió amb l'epítip (32). Van proposar que la modificació del lligand pot ser una diana important per millorar la interacció entre HER3 i NRG-1, sense activar els dímers HER2/HER3.

Altres estudis previs basats en l'afinitat entre EGF i EGFR (35) van fer una construcció d'un lligand basat en la neuregulina (WVR/EGF/IADIQ) que contenia afinitat tant per EGFR com HER3. Es va observar que les regions terminals d'aquest domini (C-terminal i N-terminal) tenen rols molt importants en la unió amb el receptor. L'autora conclou que l'estudi és interessant per estudiar les diferències entre EGFR i HER3, la interacció amb els seus lligands i la seva estructura cristal·logràfica. Malgrat que es va aconseguir una gran afinitat tant per EGFR com per HER3, no va ser capaç d'activar els heterodímers EGFR/HER3, i permetent la dimerització de HER3 amb altres membres de la família, com HER2 (35).

Elaboració del pèptid

A partir de totes les estratègies breument comentades a l'apartat 1.3 i els estudis previs, s'elabora una estratègia basada en la modificació del lligand, anomenada PDC (42). Aquesta, té com a finalitat la creació d'un pèptid bloquejador basat en la estructura de la NRG-1, obtenint una afinitat similar pel seu lligand però alhora incapaç d'inactivar la seva funció i, d'igual manera que el mecanisme d'acció dels ADCs, alliberar compostos citotòxics en cèl·lules on es sobreexpressa HER3. El PDC està format per una porció que interactua amb la diana, un agent terapèutic i una porció *linker*, que uneix els dos anteriors (42).

En el vigent treball, per la modificació de la neuregulina, cal saber quins són els punts de la seqüència del lligand que més interactuen amb el receptor i poden aportar major afinitat. El domini *egf* de la neuregulina és el principal encarregat de realitzar aquesta interacció lligand-receptor. Aquesta estructura va ser determinada en alta resolució per NMR (Fig. 7) (18).



Figura 7. Estructura tridimensional determinada per NMR del domini *egf* de alfa-herregulina o NRG-1. Recuperat de (18).

Aquest pèptid correspon a una seqüència de 63 aminoàcids, amb tres làmina β a la posició N-terminal i una hèlix α , estabilitzat per tres ponts disulfur (18). La idea principal és la modificació d'aquesta estructura artificialment amb programes bioinformàtics i establir una base de dades que es recopili les diferents afinitats per a cada mutant de la neuregulina amb HER3. A més afinitat, major competència amb la neuregulina *wild-type* i major alliberació de compostos citotòxics en cèl·lules tumorals.

En primer lloc, seria necessari preparar inicialment una simulació que permeti veure la dinàmica molecular del receptor HER3. Aquesta es pot preparar a través del software Chimera (49). Aquesta simulació requereix de la predisposició del sistema operatiu Linux, capaç de

calcular totes les trajectòries moleculars que el sistema operatiu de Windows no és capaç de fer.

En segon lloc, per conèixer quins són els punts de la seqüència de NRG-1 els quals poden aportar major o menor afinitat pel receptor, es podria fer servir el software Rosetta (50). El programa es caracteritza per la modificació estructural de macromolècules i avaluar la plausibilitat de les diferents estructures. D'aquesta manera, es pot predir i dissenyar l'estructura de proteïnes. El protocol de Rosetta inclou diverses línies de codi o *scripts* que es poden fer servir per la simulació. Es basa en dos apartats: l'*input* de la estructura minimitzada i la generació de 50 parells d'estructures mutades i *wild-type*. Un cop realitzat aquest, es calcula el paràmetre $\Delta\Delta G$, corresponent a la diferència entre els tres millors resultats *wild-type* i els tres millors mutats, mesurats en *Rosetta energy units* (REU) (51). A continuació, es fa el coeficient de correlació de Pearson per mesurar la precisió del procés computacional, per poder elaborar finalment la *stability classification accuracy*, on es veu si una mutació pot ser desestabilitzant o neutral per la seva estructura. Per tant, aquest procediment serveix per detectar quines són les mutacions trobades al domini *egf* del lligand que poden donar major afinitat en la interacció entre NRG-1 i HER3.

En tercer lloc, es realitzaria un docking molecular. Es coneix aquest mètode com la predicció de la conformació d'una molècula que es troba unida a una altra i permet estudiar el grau d'interacció i afinitat entre dos proteïnes tridimensionalment. Per aquest pas, es farien servir programes online, com DockThor (52) o Molecular Docking Server (53). Sinó, també es podria fer servir el mateix software implicat a la dinàmica molecular, Chimera, sempre i quan es treballi també en entorn Linux. Amb els mutants obtinguts al pas anterior, es realitzaria el docking molecular per estudiar les corresponents afinitats de cada lligand.

Per acabar, s'analitzarien els resultats obtinguts. El paràmetre de l'afinitat pot fer-se servir com a indicador del grau d'interacció entre els dos elements, determinant el grau de competència que pot arribar a tenir. Per tant, es pot fer un estudi comparatiu entre el lligand sense modificar i els lligands amb major afinitat. Aquells que obtinguin majors resultats respecte el *wild-type*, crearien una competitivitat per la unió amb el receptor. Per conseqüència, es procediria a construir un pèptid vehiculador (PDC) amb compostos que inhibeixin el creixement tumoral i, d'aquesta manera, evitaria la propagació de cèl·lules canceroses on es sobreexpressa HER3.

6. Conclusions

The results of this final degree project give a better comprehension of the state of the art on HER3 and the therapies directed against this receptor. We can conclude that:

- The interaction between the NRG-1 and HER3 is given by the *egf* domain of the ligand and the subdomains I and III of the receptor, causing the dimerization and triggering cellular responses.
- The HER family, when deregulated, causes negative effects on the nervous system, tumor formation, and metastasis procedures in different tissues and organs.
- Most of the targeted therapies developed are focused on EGFR and HER2. However, HER3 is still a biomarker that has not got as many techniques as the previous ones because of its lack of tyrosine-kinase activity.
- A therapy design based on the modification of the HER3 ligand can give positive results by competing with the natural ligand.
- The creation of a drug based on this modified ligand as a peptide carrier could be a potential mechanism against tumors that has deregulated HER3.

7. Referències

1. Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global cancer incidence and mortality rates and trends - An update. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 25(1), 16–27. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>
2. Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B., & Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*, 25(9), 2097–2116. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9661-9>
3. Sociedad Española de Oncología Médica. (2020). Las cifras del cáncer en España 2020. [https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Cifras del cancer 2020.pdf](https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Cifras_del_cancer_2020.pdf)
4. Hsieh, A. C., & Moasser, M. M. (2007). Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. *British Journal of Cancer*, 97(4), 453–457. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603910>
5. Wang, Z. (2017). ErbB Receptors and Cancer. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1652, 3–35. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7219-7_1
6. Shi, F., Telesco, S. E., Liu, Y., Radhakrishnan, R., & Lemmona, M. A. (2010). ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(17), 7692–7697. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002753107>
7. Gala, K., & Chandarlapaty, S. (2014). Molecular pathways: HER3 Targeted therapy. *Clinical Cancer Research*, 20(6), 1410–1416. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1549>
8. Centa, A. (2018). *Dominios funcionales de las neuregulinas y su uso como diana terapéutica*. (Tesi doctoral, Universidad de Salamanca, Salamanca). https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/139794/REDUCIDA_Neuregulinas.pdf;jsessionid=A931059F467571EE7D92B0F6C71FC9A0?sequence=1
9. Singer, E., Landgraf, R., Horan, T., Slamon, D., & Eisenberg, D. (2001). Identification of a Heregulin Binding Site in HER3 Extracellular Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 44266–44274. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105428200>
10. Bouyain, S., Longo, P. A., Li, S., Ferguson, K. M., & Leahy, D. J. (2005). The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(42), 15024–15029. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507591102>
11. Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. X., Ward, C. W., & Yokoyama, S. (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Molecular cell*, 12(3), 541–552. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00350-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00350-2)
12. Fuller, S. J., Sivarajah, K., & Sugden, P. H. (2008). ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 44(5), 831–854. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.02.278>
13. Master, A. M., & Sen Gupta, A. (2012). EGF receptor-targeted nanocarriers for enhanced cancer treatment. *Nanomedicine*, 7(12), 1895–1906. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.160>
14. Yarden, Y., & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(2), 127–137. <https://doi.org/10.1038/35052073>
15. Hynes, N. E., & Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 5(5), 341–354. <https://doi.org/10.1038/nrc1609>
16. Mujoo, K., Choi, B. K., Huang, Z., Zhang, N., & An, Z. (2014). Regulation of ERBB3/HER3 signaling in cancer. *Oncotarget*, 5(21), 10222–10236. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2655>
17. Singh, A. B., & Harris, R. C. (2005). Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cellular signalling*, 17(10), 1183–1193. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.03.026>
18. Jacobsen, N. E., Abadi, N., Sliwkowski, M. X., Reilly, D., Skelton, N. J., and Fairbrother, W. J. (1996). HEREGULIN-ALPHA EPIDERMAL GROWTH FACTOR-LIKE DOMAIN, NMR, MINIMIZED AVERAGE STRUCTURE. *Biochemistry*, 35 (11), 3402–3417. <https://doi.org/10.2210/pdb1haf/pdb>

19. Kochupurakkal, B. S., Harari, D., Di-Segni, A., Maik-Rachline, G., Lyass, L., Gur, G., Kerber, G., Citri, A., Lavi, S., Eilam, R., Chalifa-Caspi, V., Eshhar, Z., Pikarsky, E., Pinkas-Kramarski, R., Bacus, S. S., & Yarden, Y. (2005). Epigen, the last ligand of ErbB receptors, reveals intricate relationships between affinity and mitogenicity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 8503–8512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413919200>
20. Falls D. L. (2003). Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Experimental cell research*, 284(1), 14–30. [https://doi.org/10.1016/s0014-4827\(02\)00102-7](https://doi.org/10.1016/s0014-4827(02)00102-7)
21. Centa, A., Rodríguez-Barrueco, R., Montero, J. C., & Pandiella, A. (2018). The immunoglobulin-like domain of neuregulins potentiates ErbB3/HER3 activation and cellular proliferation. *Molecular oncology*, 12(7), 1061–1076. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12310>
22. Montero, J. C., Rodríguez-Barrueco, R., Ucana, A., Diaz-Rodríguez, E., Esparís-Ogando, A., & Pandiella, A. (2008). Neuregulins and cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(11), 3237–3241. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5133>
23. Vartanian, T., Fischbach, G., & Miller, R. (1999). Failure of spinal cord oligodendrocyte development in mice lacking neuregulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2), 731–735. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.731>
24. Jeong, H., Kim, J., Lee, Y., Seo, J. H., Hong, S. R., & Kim, A. (2014). Neuregulin-1 induces cancer stem cell characteristics in breast cancer cell lines. *Oncology Reports*, 32(3), 1218–1224. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3330>
25. Steinthorsdottir, V., Stefansson, H., Ghosh, S., Birgisdottir, B., Bjornsdottir, S., Fasquel, A. C., Olafsson, O., Stefansson, K., & Gulcher, J. R. (2004). Multiple novel transcription initiation sites for NRG1. *Gene*, 342(1), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.07.029>
26. Ring, H. Z., Chang, H., Guilbot, A., Brice, A., LeGuern, E., & Francke, U. (1999). The human neuregulin-2 (NRG2) gene: cloning, mapping and evaluation as a candidate for the autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease linked to 5q. *Human genetics*, 104(4), 326–332. <https://doi.org/10.1007/s004390050961>
27. Zhang, D., Sliwkowski, M. X., Mark, M., Frantz, G., Akita, R., Sun, Y., Hillan, K., Crowley, C., Brush, J., & Godowski, P. J. (1997). Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(18), 9562–9567. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9562>
28. Howard B. A. (2008). The role of NRG3 in mammary development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 13(2), 195–203. <https://doi.org/10.1007/s10911-008-9082-8>
29. Harari, D., Tzahar, E., Romano, J., Shelly, M., Pierce, J. H., Andrews, G. C., & Yarden, Y. (1999). Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 18(17), 2681–2689. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202631>
30. Ross, J. S., Slodkowska, E. A., Symmans, W. F., Pusztai, L., Ravdin, P. M., & Hortobagyi, G. N. (2009). The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine. *The Oncologist*, 14(4), 320–368. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0230>
31. Berger, M. B., Mendrola, J. M., & Lemmon, M. A. (2004). ErbB3/HER3 does not homodimerize upon neuregulin binding at the cell surface. *FEBS Letters*, 569(1–3), 332–336. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.014>
32. Ballinger, M. D., Jones, J. T., Lofgren, J. A., Fairbrother, W. J., Akita, R. W., Sliwkowski, M. X., & Wells, J. A. (1998). Selection of heregulin variants having higher affinity for the ErbB3 receptor by monovalent phage display. *Journal of Biological Chemistry*, 273(19), 11675–11684. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.19.11675>
33. Macdonald, J. L., & Pike, L. J. (2008). Heterogeneity in EGF-binding affinities arises from negative cooperativity in an aggregating system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(1), 112–117. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707080105>
34. Macdonald-Obermann, J. L., & Pike, L. J. (2014). Different epidermal growth factor (EGF) receptor ligands show distinct kinetics and biased or partial agonism for homodimer and heterodimer formation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(38), 26178–26188. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.586826>
35. Wingens, M., Jacobs-Oomen, S., Van Der Woning, S. P., Stortelers, C., & Van Zoelen, E. J. J. (2006). Epidermal growth factor mutant with wild-type affinity for both ErbB1 and ErbB3. *Biochemistry*, 45(14), 4703–4710. <https://doi.org/10.1021/bi060087m>

36. Seoane, S., Montero, J. C., Ocaña, A., & Pandiella, A. (2016). Breast cancer dissemination promoted by a neuregulin-collagenase 3 signalling node. *Oncogene*, 35(21), 2756–2765. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.337>
37. Mishra, R., Patel, H., Alanazi, S., Yuan, L., & Garrett, J. T. (2018). HER3 signaling and targeted therapy in cancer. *Oncology Reviews*, 12(1), 45–62. <https://doi.org/10.4081/oncol.2018.355>
38. Eccles, S. A. (2011). The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *International Journal of Developmental Biology*, 55(7–9), 685–696. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113396se>
39. Wu, H.-C., Chang, D.-K., & Huang, C.-T. (2006). Targeted Therapy for Cancer. *Journal of Cancer Molecules*, 2(2), 57–66. <https://doi.org/10.2165/00024669-200403040-00001>
40. American Society of Clinical Oncology. (2019). *Información al paciente aprobada por el médico. Qué es la terapia dirigida*. [Consulta: 4 de maig de 2021]. <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atenci%C3%B3n-del-c%C3%A1ncer/c%C3%B3mo-se-trata-el-c%C3%A1ncer/terapias-personalizadas-y-dirigidas/qu%C3%A9-es-la-terapia-dirigida>
41. Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K., Kirpotin, D. B., & Papahadjopoulos, D. (1999). Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacological reviews*, 51(4), 691–743.
42. Gilad, Y., Firer, M., & Gellerman, G. (2016). Recent innovations in peptide based targeted drug delivery to cancer cells. *Biomedicines*, 4(2), 1–24. <https://doi.org/10.3390/biomedicines4020011>
43. Laakkonen, P., & Vuorinen, K. (2010). Homing peptides as targeted delivery vehicles. *Integrative Biology*, 2(7–8), 326–337. <https://doi.org/10.1039/c0ib00013b>
44. Lee-Hoeflich, S. T., Crocker, L., Yao, E., Pham, T., Munroe, X., Hoeflich, K. P., Sliwkowski, M. X., & Stern, H. M. (2008). A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: Implications for targeted therapy. *Cancer Research*, 68(14), 5878–5887. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0380>
45. Araki, T., Yashima, H., Shimizu, K., Aomori, T., Hashita, T., Kaira, K., Nakamura, T., & Yamamoto, K. (2012). Review of the treatment of non-small cell lung cancer with gefitinib. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 6(December), 407–421. <https://doi.org/10.4137/CMO.S7340>
46. Sergina, N. V., Rausch, M., Wang, D., Blair, J., Hann, B., Shokat, K. M., & Moasser, M. M. (2007). Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature*, 445(7126), 437–441. <https://doi.org/10.1038/nature05474>
47. Xie, T., Lim, S. M. i., Westover, K. D., Dodge, M. E., Ercan, D., Ficarro, S. B., Udayakumar, D., Gurbani, D., Tae, H. S. eo., Riddle, S. M., Sim, T., Marto, J. A., Jänne, P. A., Crews, C. M., & Gray, N. S. (2014). Pharmacological targeting of the pseudokinase Her3. *Nature Chemical Biology*, 10(12), 1006–1012. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1658>
48. Hashimoto, Y., Koyama, K., Kamai, Y., Hirotsu, K., Ogihara, Y., Zembutsu, A., Abe, M., Kaneda, Y., Maeda, N., Shiose, Y., Iguchi, T., Ishizaka, T., Karibe, T., Hayakawa, I., Morita, K., Nakada, T., Nomura, T., Wakita, K., Kagari, T., ... Agatsuma, T. (2019). A novel HER3-targeting antibody–drug conjugate, U3-1402, exhibits potent therapeutic efficacy through the delivery of cytotoxic payload by efficient internalization. *Clinical Cancer Research*, 25(23), 7151–7161. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1745>
49. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
50. Rosetta Software Suite (s.d.) [Software] (2021). <https://www.rosettacommons.org/>
51. Ó Conchúir, S., Barlow, K. A., Pache, R. A., Ollikainen, N., Kundert, K., O'Meara, M. J., Smith, C. A., & Kortemme, T. (2015). A Web Resource for Standardized Benchmark Datasets, Metrics, and Rosetta Protocols for Macromolecular Modeling and Design. *PLoS one*, 10(9), e0130433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130433>
52. Dardenne, L. E., Barbosa, H. J. C., De Magalhães, C. S., Marinho, D., Krempser, E., Lima, F., Alvim, I., Gomes, A. T. A., Malinoski, I., Monteiro, M., Medeiros, V. (2019). *DockThor. A receptor-ligand docking program*. [Consulta: 7 de maig de 2021]. <https://dockthor.incc.br/v2/>
53. Virtua Drug research and development company. (2009). *Docking Server*. [Consulta: 7 de maig de 2021]. <https://www.dockingserver.com/web>