

Université de la Méditerranée
Aix-Marseille II
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

*Présentée pour obtenir le titre de Docteur ès Sciences de l'Université de la Méditerranée
Aix-Marseille II
Mention Pathologies Humaines
Spécialité Oncologie, Pharmacologie et Thérapeutique*

Olivier Guérin

**Intérêts en Thérapeutique du ciblage des récepteurs à
l'Epidermal Growth Factor (EGFR) et des récepteurs au
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFR) dans le
cancer de prostate hormono-résistant et docetaxel-
résistant. Etudes précliniques.**

*Laboratoire d'oncopharmacologie, Centre Antoine Lacassagne, Nice.
Directeur : Dr Gérard Milano*

Soutenue publiquement le 25 juin 2010 à Marseille

Jury

Monsieur le Professeur Athanassios Iliadis
Monsieur le Professeur Milou-Daniel Drici
Monsieur le Professeur Laurent Teillet
Monsieur le Professeur Jean-Marc Ferrero
Monsieur le Docteur Gérard Milano

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de Thèse

Remerciements

Monsieur le Professeur Athanassios Iliadis, nous vous remercions d’avoir accepté de juger ce travail, c’est un très grand honneur pour nous que vous présidiez ce jury de thèse.

Monsieur le Professeur Milou Drici, nous vous sommes très reconnaissants pour votre aide et vos conseils. Nous espérons sincèrement pouvoir collaborer à vos côtés au développement de la Thérapeutique Clinique en harmonie et complémentarité avec la Pharmacologie. C’est un grand plaisir pour nous que vous jugiez ce travail.

Monsieur le Professeur Laurent Teillet, conscient de votre compétence et de votre investissement dans le domaine de l’oncogériatrie, c’est un honneur pour nous de vous compter parmi les membres de ce jury et nous vous en sommes sincèrement reconnaissants.

Monsieur le Professeur Jean-Marc Ferrero, votre expertise est reconnue dans la maladie cancéreuse prostatique. C’est un très grand privilège de vous soumettre notre travail.

Monsieur le Docteur Gérard Milano, je vous suis très reconnaissant d’avoir dirigé cette thèse, votre compétence et votre envie de transmettre vos connaissances m’ont permis

d'avancer. Votre patience et votre tolérance m'ont permis d'aller au terme de ce travail. J'espère très sincèrement que je pourrai continuer à cheminer à vos côtés.

Je remercie tous les membres du laboratoire d'Oncopharmacologie du Centre Antoine Lacassagne, et bien évidemment tout particulièrement Monsieur Jean-Louis Fischel sans qui rien n'aurait été possible, et Madame Patricia Formento pour sa patience et son encadrement constant lors de notre travail de paillasse commun.

A ma Famille, Simone, Hélène, Roger, Louis, Roland, c'est votre exemple qui est ma motivation.

A mes Parents, mon unique ambition est de mettre mes pas dans les vôtres, au service des autres comme vous savez si bien le faire, parce que c'est à l'aune de cet engagement que l'on juge la qualité d'un homme. Merci de m'avoir donné les armes pour avancer dans cette voie.

A mon Epouse, Valentine, ta présence à mes côtés est un trésor inestimable, une richesse incomparable. Rien ne serait possible sans toi.

A mes Enfants, Elouan et Thibault, vous êtes la motivation profonde de mes engagements, et vous voir grandir est un enchantement permanent. Mon bonheur n'est fait que du vôtre.

A mon Frère, Nicolas, compagnon de mon enfance, compère et complice des grands moments, mon immense affection t'est acquise à jamais.

TABLE DES MATIERES

Introduction.....	p.9
1 La prise en charge du cancer de la prostate.....	p.11
1.1 Prise en charge actuelle.....	p.11
1.2 Innovations thérapeutiques dans le CPHR.....	p.11
2 Quelques éléments de réflexion sur la problématique oncogériatrique autour du cancer de la prostate, et l'importance de cette approche en thérapeutique.....	p.13
2.1 Elements épidémiologiques généraux.....	p.13
2.2 Présentation de l'approche oncogériatrique.....	p.13
2.3 Intérêts dans le cancer de prostate du sujet âgé.....	p.14
3 Le ciblage de EGFR et de VEGFR dans le cancer de prostate.....	p.16
3.1 Le ciblage du VEGFR.....	p.16
3.1.1 Généralités sur le VEGFR.....	p.16
3.1.2 VEGFR et cancer de prostate.....	p.19
3.2 Le ciblage de l'EGFR.....	p.20
3.2.1 Généralités sur l'EGFR.....	p.20
3.2.2 EGFR dans le cancer de prostate et son évolution.....	p.23
3.2.3 Principaux résultats des études ciblant EGFR dans le CPHR en phases précliniques.....	p.24

3.2.4 Résultats des études cliniques principales des thérapies ciblant EGFR dans le CPHR.....	p.26
3.2.4.1 En monothérapies	
3.2.4.2 En combinaisons de traitements	
3.2.5 Synthèse et conclusion.....	p.28
 4 Travail de thèse expérimental.....	p.31
 4.1 Objectifs et déroulé du travail.....	p.31
 4.2 Résultats.....	p.33
4.2.1 Effet anti-tumoral supra-additif du sunitinib malate (SU11248, Sutent®) combiné au docetaxel. Une nouvelle perspective thérapeutique dans le cancer de prostate hormono-résistant.....	p.33
4.2.1.1 Introduction et objectifs	
4.2.1.2 Matériels et méthodes	
4.2.1.3 Résultats	
4.2.1.4 Conclusion	
4.2.2 Vandetanib, inhibiteur de tyrosine-kinases multicibles, dans le traitement du cancer de prostate hormono-résistant : comparaison de son effet en association au docetaxel sur des lignées cellulaires tumorales docetaxel-sensibles et docetaxel-résistantes. Etude in vivo préclinique.....	p.35
4.2.2.1 Introduction et objectifs	
4.2.2.2 Matériels et méthodes	
4.2.2.3 Résultats	

4.2.2.4 Conclusion

4.3 Synthèse et perspectives.....	p.38
-----------------------------------	------

Bibliographie.....	p.41
--------------------	------

Annexes (<i>articles soumis ou publiés dans le cadre du travail de thèse</i>).....	p.51
---	-------------

Annexe 1 <i>EGFR targeting in hormone-resistant prostate cancer: current appraisal and prospects for treatment.....</i>	p.52
--	-------------

Annexe 2 <i>Supra-additive antitumor effects of sunitinib malate combined with docetaxel. A new therapeutic perspective in hormone refractory prostate cancer..</i>	p.70
--	-------------

Annexe 3 <i>The multi-targeted tyrosine kinase inhibitor Vandetanib in the treatment of hormone refractory prostate cancer: comparison of its effects in association with docetaxel on docetaxel-sensitive and docetaxel-resistant tumor cell lines. A preclinical in vivo study.....</i>	p.77
--	-------------

Principales abréviations utilisées dans le texte (par ordre d'apparition)

VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
CPHR	Cancer de Prostate Hormono-Résistant
TKI	Tyrosine kinases inhibiteurs
SIOG	Société Internationale d'Oncogériatrie
CR	Ratio de combinaison
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
KIT	CD117 (récepteur cytokine)
FLT3	FMS-like Tyrosine Kinase 3
p27	Inhibiteur de kinase cycline-dépendant
Ki67	Antigène marqueur de prolifération
vWF	Facteur Von Willebrandt
PSA	Prostate Specific Antigene
EGS	Evaluation Gériatologique Standardisée
RCP	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
SIOG	Société Internationale d'OncoGériatrie

Introduction

Le cancer de la prostate, premier cancer chez l'homme en France, a bénéficié largement des avancées thérapeutiques de la chirurgie, de la chimiothérapie, de la radiothérapie et, depuis une dizaine d'années, de l'hormonothérapie. Aux Etats-Unis en 2008, le cancer de prostate représentait 25% des nouveaux cas de cancer chez l'homme **(1)** et 60000 nouveaux cas en France.

Ce cancer concerne souvent les hommes âgés et toute stratégie thérapeutique se doit de tenir compte de leur qualité de vie, en se basant notamment sur une évaluation oncogériatrique. Cette dimension est de plus en plus importante du fait du vieillissement de la population et de l'exigence croissante des hommes âgés de voir leur cancer traité efficacement. Cela nécessite une approche personnalisée car la population âgée est très hétérogène, et une évaluation de toutes les fragilités gériatriques afin de minimiser leur impact sur la tolérance aux traitements et leur efficacité, et d'éviter leur décompensation en cours de traitement.

Lorsque le cancer devient hormono-résistant (CPHR), un nouveau palier dans la progression de la maladie est franchi et il faut bien garder à l'esprit que les chimiothérapies doivent être alors discutées. En effet, il s'agit alors d'une maladie agressive dont le pronostic est mauvais. Le traitement historique associant mitoxantrone et prednisolone sans augmenter la survie des patients, diminuait les douleurs et augmentait leur qualité de vie **(2)**. Désormais, le traitement de référence du cancer de prostate hormono-résistant combine le docétaxel et la prednisolone **(3)** puisqu'il est le seul traitement à avoir montré un bénéfice en survie. Ce traitement n'augmente cependant la médiane de survie que de 2,9 mois (survie médiane de 19,2 mois vs 16,3 mois avec la mitoxantrone, $p=0.004$). Les stratégies futures visant à améliorer la prise en charge du cancer de prostate avancé hormono-résistant (CPHR) devront examiner outre l'efficacité de nouveaux médicaments, les bénéfices de leur

association au docétaxel. En l'état actuel des connaissances, les traitements de deuxième ligne sont décevants et tout reste à faire. Dans ce cadre clinique très défavorable, notre travail a eu pour but d'évaluer l'impact de thérapies ciblées visant EGFR et VEGFR, seules ou associées au docetaxel, sur un modèle préclinique de tumeur prostatique humaine PC3 xénogreffée sur la souris *nude*. Le choix de ces récepteurs est lié à leur surexpression lors de l'évolution hormono-résistante inéluctable des cancers de prostate en progression (voir chap 3). Nous avons choisi le modèle PC3, lignée cellulaire la mieux connue et la plus utilisée pour les études précliniques de cancer de prostate hormono-résistant humain. Les souris *nude* constituent le modèle animal de choix, car leur immunodéficiencia complète leur permet de développer des tumeurs xénogreffées d'autres espèces, ce qui est impossible pour des animaux immunocompétants.

1 La prise en charge du cancer de la prostate

1.1 Prise en charge actuelle

Le cancer de la prostate est le premier cancer chez l'homme en France de par sa fréquence et le deuxième de par sa mortalité (après le cancer du poumon et devant le cancer colo-rectal). Il s'agit d'un adénocarcinome caractérisable par trois paramètres : le stade clinique TNM, le taux initial de PSA et le grade histologique de Gleason. Le traitement curatif est décidé en fonction de ces trois paramètres. Actuellement, quatre approches curatives sont définitivement validées : la prostatectomie chirurgicale, la radiothérapie, la curiethérapie et l'irradiation transurétrale par hyperfréquences. Une part importante de la décision est prise en fonction du rapport bénéfice-risque et du désir du malade. Les métastases les plus fréquentes sont osseuses. C'est un cancer sensible aux hormones mâles d'origine testiculaire (testostérone) et surrénalienne. En présence de métastase, une hormonosuppression androgénique (par castration ou par agoniste LH-RH) est effectuée, parfois associée au traitement local. Néanmoins, l'apparition d'une hormono-résistance est toujours observée. Le traitement standard est alors la chimiothérapie par docetaxel. Il a été montré que ce traitement avait le même impact, quel que soit l'âge du patient, sur la survie, la sédation des douleurs, la diminution de consommation d'antalgiques et plus généralement sur la qualité de vie (4).

1.2 Innovations thérapeutiques dans le cancer de prostate hormono-résistant

Dans ce contexte de cancer hormono-résistant, la recherche de nouvelles thérapeutiques revêt une importance capitale, d'autant que le docetaxel n'est pas d'un usage très facile chez le sujet âgé, a fortiori chez le sujet âgé fragile. Actuellement, les nouvelles thérapeutiques dont le développement est le plus avancé, ciblent l'inhibition de la voie des récepteurs des androgènes par des médicaments appropriés (abiratérone, MDV3100), qui demeure capitale

même en phase de résistance à la castration. Les thérapies visant à agir sur le processus de développement des métastases osseuses (inhibiteurs du récepteur de l'endothéline-1, de RANK-L, associations de la chimiothérapie à l'irradiation métabolique osseuse) sont particulièrement prometteuses, et des résultats de phases III et en cours de publication sont attendus très prochainement. La vaccination autologue dirigée contre la phosphatase acide prostatique semble augmenter la survie globale, et d'autres stratégies de vaccination ou de modulation de l'immunité (anticorps anti-CTLA4) sont en cours d'évaluation **(5)**. Suite aux bons résultats obtenus avec la thalidomide, médicament cependant mal toléré pour cette population âgée et souvent vulnérable, un analogue potentiellement plus efficace, le lénalidomide, est en cours de développement **(6)**. Dans ce contexte, l'inhibition de l'angiogénèse par ciblage de VEGFR et/ou de EGFR a montré une efficacité clinique variable mais globalement assez décevante. Des résultats cliniques de grande ampleur seront bientôt disponibles. Il n'y a que très peu de résultats cliniques concernant les maladies cancéreuses prostatiques hormono et docetaxel résistantes.

2 Quelques éléments de réflexion sur la problématique oncogériatrique autour du cancer de la prostate, et importance de cette approche en thérapeutique

2.1 Eléments épidémiologiques généraux

En France, 70% des décès par cancer surviennent après 65 ans. Le cancer est la première cause de mortalité entre 65 et 79 ans et la deuxième après 80 ans, âge à partir duquel les maladies cardio-vasculaires représentent la cause principale de décès. C'est également la seule cause de mortalité qui progresse actuellement dans ces tranches d'âges.

Par ailleurs, le vieillissement de la population française est une réalité désormais bien connue. Ainsi, il y aura en France 18 millions de personnes âgées de plus de 60 ans et 6 millions de plus de 75 ans en 2020 (source DREES 2009). L'espérance de vie à la naissance sera de 90 ans en 2020 (source DREES 2009). Elle aura ainsi doublée en 150 ans. La moitié des nouveaux-nés de sexe féminin qui naissent aujourd'hui sera centenaire. De plus, l'espérance de vie par tranche d'âge, de même que l'espérance de vie sans incapacité augmentent, y compris pour les tranches d'âge les plus avancées. Ainsi, de nos jours, un français sur quatre âgé de 80 ans atteindra l'âge de 100 ans.

2.2 Présentation de l'approche oncogériatrique

L'une des difficultés actuelles rencontrées par les oncologues, devant la proportion toujours croissante de patients âgés se présentant en consultation, est de pouvoir les faire bénéficier d'une évaluation gériatrique multidimensionnelle et pluridisciplinaire médico-psycho-sociale, permettant d'aider à la décision thérapeutique prise en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP). Cette évaluation permet de mieux cerner une population âgée très

hétérogène (7)(8)(9). L'évaluation gériatrique standardisée (EGS) (10) permet l'identification des grands syndromes gériatriques, d'estimer la qualité de vie ainsi que l'espérance de vie qui doivent être connues de l'oncologue pour mieux les confronter aux caractéristiques de la maladie néoplasique. Cette EGS permet d'individualiser 3 groupes de patients, d'après les travaux de l'équipe de Tampa : un premier groupe de patients autonomes sans critères de fragilité qui pourraient recevoir un traitement identique aux patients plus jeunes, un second groupe de patients vulnérables présentant une dépendance relative avec une ou deux comorbidités et enfin un troisième groupe de patients fragiles avec au moins une dépendance au niveau des activités de la vie quotidienne associée à la présence d'au moins trois comorbidités ou présence d'un des grands syndromes gériatriques (troubles de la marche, démence ou confusion mentale, incontinence et dénutrition) (11)(12)(13). Ainsi, l'évaluation gériatrique est un processus diagnostique permettant d'appréhender de façon systématique les problèmes et les ressources tant sur le plan médical que fonctionnel ou psycho-social du sujet âgé. Elle améliore la prise en charge en identifiant des interventions à mener pour éviter les décompensations de fragilités retrouvées à l'EGS, en proposant des schémas thérapeutiques tenant compte du pronostic et des modalités de suivi. L'évaluation gériatrique vient renforcer celle de l'oncologue dans l'établissement d'un schéma thérapeutique adapté et réaliste. Cependant, l'une des grandes difficultés actuellement, pour de nombreux centres de prise en charge des patients âgés présentant une pathologie néoplasique, est de pouvoir disposer dans un délai raisonnable de cette évaluation gériatrique pour aider à définir la meilleure stratégie thérapeutique.

2.3 Intérêts dans le cancer de prostate du sujet âgé

Concernant le cancer de la prostate, l'aide à la stratégie thérapeutique que le gériatre peut amener à l'oncologue est très différente selon le stade de la maladie. Chez le sujet âgé,

l'existence d'un cancer de prostate localisé (T1-3N0M0) pose la question assez complexe de l'estimation de son espérance de vie. En effet, le plus souvent, la maladie prostatique ne sera pas à l'origine du décès du patient, qui décèdera pour une toute autre raison, justifiant une simple surveillance clinique et éventuellement biologique. Il existe également une autre situation où l'évaluation de l'espérance de vie est nécessaire, c'est lors de la récurrence de la maladie (le plus souvent après radiothérapie chez le sujet âgé). Dans ce cas, le temps de doublement du PSA paraît être un très bon critère d'évolutivité pour aider à la décision de traitement prise en commun par les acteurs de la cancérologie et le gériatre (14).

Lors de l'utilisation dans les années à venir des thérapies ciblant VEGFR et EGFR, champ des présentes investigations précliniques, l'approche oncogériatrique occupera certainement une place importante, le but étant de proposer un traitement adapté et personnalisé au patient âgé présentant un cancer de prostate en échappement basé sur l'EGS afin de déterminer le traitement présentant un juste équilibre entre efficacité et tolérance selon l'objectif adéquat à l'évaluation gériatrique effectuée (entre qualité de vie et objectifs carcinologiques). Les thérapies ciblées ne sont pas exemptes de toxicité, et celles-ci doivent être anticipées. Ainsi, le Sunitinib induit des asthénies majeures pouvant entraîner chez le sujet âgé des risques de perte assez rapide d'autonomie, par une réduction importante de l'activité physique et une sarcopénie consécutive à l'alitement. Thérapie ciblée n'est donc pas synonyme de bonne tolérance. L'obstacle principal actuel à l'usage de ces nouvelles molécules chez le sujet âgé, est que les essais thérapeutiques menés pour l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché excluent le plus souvent ces sujets âgés de plus de 75 ou 80 ans, et systématiquement les sujets âgés polypathologiques, qui seront pourtant ceux qui poseront des difficultés de définition d'une stratégie thérapeutique cohérente.

Cette approche intégrant l'EGS pour le choix thérapeutique est désormais recommandée, suite à la publication des propositions de la Société Internationale d'OncoGériatrie (SIOG) (15).

3. Le ciblage de EGFR et de VEGFR dans le cancer de prostate

3.1 Le ciblage de VEGFR

3.1.1 Généralités sur VEGFR

Un système vasculaire fonctionnel est essentiel à la croissance des tumeurs solides et à l'apparition de métastases. En effet, en l'absence d'un processus de néoangiogenèse, une tumeur est incapable de se développer au-delà de quelques millimètres de diamètre et demeure quiescente **(16)(17)**. Ce phénomène de néoangiogenèse est très complexe et fait intervenir différents signaux biochimiques et divers types cellulaires. Il est initié par la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques par les cellules tumorales. Parmi ces facteurs, le vascular endothelial growth factor (VEGF) joue un rôle majeur dans la prolifération des cellules endothéliales et la formation de néovaisseaux. Il est également capable d'induire un certain degré de perméabilité vasculaire et joue un rôle clé dans l'activation des voies de survie des cellules endothéliales composant les vaisseaux néoformés **(18)**. L'intérêt thérapeutique potentiel d'agents ciblant la vascularisation des tumeurs est donc évident, et explique le grand nombre de médicaments qui sont actuellement en cours d'investigation dans ce domaine, dont certaines déjà parvenues au stade de développement clinique **(19)**. Alors que les agents cytotoxiques conventionnels agissent directement sur les cellules tumorales, les médicaments ciblant la vascularisation des tumeurs exercent une activité antitumorale de façon indirecte, en privant les cellules tumorales de l'oxygène et des nutriments dont elles ont besoin. Ces différences de cibles et de mode d'action laissent entrevoir une grande complémentarité dans les effets de ces diverses thérapeutiques. Ainsi, il existe une synergie d'action potentielle entre les agents ciblant la vascularisation tumorale et les autres agents cytotoxiques. De plus, les cellules composant le réseau vasculaire tumoral se distinguent des

cellules tumorales elles-mêmes, par une plus grande stabilité génétique, et par voie de conséquence, par un risque quasi nul d'acquisition de résistance au traitement **(20)**, ce qui en fait des cibles oncologiques privilégiées.

Deux grands groupes d'agents ciblant la vascularisation des tumeurs ont été développés: les agents anti-angiogéniques et les agents de ciblage vasculaire **(21)**. Les agents anti-angiogéniques inhibent la formation de nouveaux vaisseaux, c'est-à-dire le processus de néoangiogénèse. Ils ont donc une action préventive, nécessitent une administration chronique, et sont surtout susceptibles d'apporter un bénéfice au stade précoce de la maladie ou encore devant des métastases asymptomatiques **(21)**. Du fait du rôle majeur du VEGF dans le processus de néoangiogénèse, le ciblage des voies de signalisation qui y sont liées apparaît comme une approche prometteuse dans le cadre des thérapeutiques anti-angiogéniques. Différents agents ont été ainsi développés, permettant soit le blocage du VEGF lui-même, c'est le cas d'anticorps monoclonaux comme le bevacizumab (Avastin[®]) **(22)(23)**, soit de ses récepteurs (VEGFR), c'est le cas des petites molécules inhibitrices de tyrosine kinases comme l'AZD2171, le ZD6474, le sunitinib ou le sorafenib **(21)(24)**.

A l'inverse des thérapeutiques anti-angiogéniques proprement dites, les agents de ciblage vasculaire ont la capacité d'agir sur le réseau vasculaire préétabli de masses tumorales déjà constituées, engendrant ischémie et nécrose tumorale. Par conséquent, ces agents, administrés de façon aiguë, entraînent des effets quasi-immédiats, et sont susceptibles d'être actifs devant des tumeurs avancées, qui sont habituellement résistantes aux agents cytotoxiques conventionnels **(21)(25)(26)**. Différentes stratégies sont actuellement en cours d'investigations dans ce domaine. La première approche consiste à utiliser des anticorps ou des peptides capables de se lier spécifiquement à une cible (VEGFR, endogline, intégrine α_v , domaine EDB de la fibronectine...) présente sur le réseau vasculaire des tumeurs, afin d'y délivrer une molécule effectrice (toxine, agent pro-thrombotique...) entraînant des lésions

vasculaires et secondairement la thrombose du réseau vasculaire tumoral **(21)**. La deuxième approche est celle des petites molécules capables d'induire un collapsus vasculaire et une nécrose tumorale secondaire, parmi lesquelles on retrouve les flavonoïdes (5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid ou DMXAA) et les agents se liant à la tubuline (ZD6126, CA4P...) **(21)(27)**. Si le mécanisme d'action des flavonoïdes, faisant intervenir une sécrétion de cytokines et d'agents vaso-actifs, demeure mal compris, celui des agents se liant à la tubuline apparaît plus clair. Ces agents ciblent les vaisseaux sanguins tumoraux, qui diffèrent nettement de ceux des tissus sains. En effet, les cellules endothéliales qui tapissent leurs parois vasculaires conservent les caractéristiques des cellules en division, immatures et nouvellement formées, et dépendent fortement d'un cytosquelette à tubuline pour conserver leur forme. Le ZD6126, par exemple, perturbe ce cytosquelette, ce qui conduit les cellules endothéliales à passer d'une forme aplatie à une forme arrondie, causant la détérioration de l'endothélium **(25)**. Ce phénomène génère une congestion vasculaire et l'interruption du flux sanguin. La tumeur est ainsi privée d'oxygène et de nutriments, tandis que ses déchets s'accumulent pour atteindre des niveaux toxiques. Il en résulte, comme c'est le cas d'ailleurs avec l'ensemble des agents de ciblage vasculaire, une nécrose tumorale centrale, laissant une fine couche de cellules tumorales viables en périphérie de la tumeur. Ce dernier phénomène peut être expliqué par la simple diffusion de l'oxygène et des nutriments vers les cellules tumorales périphériques par l'intermédiaire des tissus normaux environnant **(21)**.

Le ciblage de la vascularisation tumorale (agents anti-angiogéniques et agents de ciblage vasculaire) constitue donc une piste thérapeutique innovante et particulièrement intéressante en cancérologie. Les effets de l'association de ces différents agents entre eux et combinés aux autres thérapeutiques ciblées et notamment aux anti-EGFR, de même qu'aux agents cytotoxiques conventionnels et à l'irradiation, font l'objet d'une intense activité de recherche, qui débouche actuellement sur des résultats cliniques convaincants. Ainsi, par exemple, le

bevacizumab est actuellement utilisé chez des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques ou de cancers du sein métastatiques, en association à une chimiothérapie conventionnelle. Le sunitinib et le sorafenib ont quant à eux démontré leur efficacité chez des patients atteints de formes métastatiques de cancer du rein.

3.1.2 VEGFR et cancer de prostate

Si les inhibiteurs de l'angiogénèse ont montré des résultats cliniques intéressants pour les cancers du rein, du colon, et dans une moindre mesure pour le cancer du sein et du poumon, nous n'avons que peu de résultats cliniques sur le cancer de prostate évolué, mais des essais sont en cours. Ils concernent à la fois les anticorps monoclonaux tels que le bevacizumab ou des leurres dérivés de ces anticorps tels le VEGF-trap, et les inhibiteurs tyrosine kinase donnés per os comme le sunitinib ou le sorafenib.

Le bevacizumab n'a pas d'activité antitumorale en monothérapie. En association au docetaxel et à l'estrามustine, il a été noté une réponse partielle pour 9 des 17 patients inclus dans un essai de phase II (avec une réponse biochimique sur les PSA de 80%) (28). Une autre étude de phase II a étudié l'association du bevacizumab au docetaxel, à la prednisone et la thalidomide, chez 60 patients (29). Ils obtenaient un taux de réponse élevé (87%) sur le PSA avec 59% des patients ayant une cible mesurable à l'imagerie présentant une réponse partielle. Cependant, des problèmes de tolérance importants ont été notés (neutropénies fébriles, hémorragies et thromboses). Une autre étude de phase II sur 20 patients a ciblé l'association bevacizumab (10 mg/kg J1-J21) et docetaxel (60 mg/m² J1-J21) déjà traités initialement par docetaxel, et a montré une réponse sur le PSA chez 11 patients et une réponse objective chez 7 patients (30). 4 de ces patients n'avaient pas eu de réponse lors d'un premier traitement par docetaxel seul. Il y aurait donc ici un bénéfice au blocage angiogénique pour la réponse au docetaxel. Une étude de phase III étudiant l'association bevacizumab-docetaxel est en cours.

Une étude récente a porté sur l'usage du sorafenib. Elle montre une efficacité modérée en réponse biologique sur le PSA, avec un effet paradoxal de diminution du PSA à l'arrêt du traitement (31).

Un autre inhibiteur de tyrosine-kinases, ciblant l'ensemble des récepteurs au VEGF, l'AZD2171, a montré une activité antitumorale *in vitro* et *in vivo* sur des modèles de tumeurs de prostate xénogreffées (32). Pour cette molécule, une étude de phase I a permis de déterminer la dose maximale tolérée (20 mg/j), et montré (même si ça n'est pas l'objectif d'une phase I) une réponse objective et quatre stabilisations (33). La phase II est en cours.

Enfin, le VEGF-trap est un pseudo-anticorps monoclonal qui reconnaît VEGF et le piège par son extrémité de fixation au ligand identique aux récepteurs VEGFR2 et 3. Un essai de phase III qui compare en première ligne métastatique le docétaxel avec ou sans VEGF-trap est en cours.

3.2 Le ciblage de EGFR

3.2.1 Généralités sur EGFR

Le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR ou HER-1) est le premier membre connu des récepteurs de la famille HER. A l'état physiologique, EGFR est exprimé dans de nombreux épithéliums (peau, col utérin, canaux biliaires, hépatocytes, glandes sébacées, bronches, vessie, cellules myoépithéliales du sein). De même, EGFR est surexprimé dans de nombreux cancers (poumon non à petites cellules, tête et cou, ovaires, côlon, vessie, rein et prostate) (34).

EGFR est un récepteur avec activité tyrosine-kinase. Il détient un rôle clé dans les processus de transduction du signal, régulant des fonctions cellulaires majeures, telles que la survie et la prolifération. L'activation de la signalisation EGFR passe par la fixation sur ce récepteur de

facteurs de croissance tels que EGF, TGF α , amphiréguline, heparin-binding EGF, et bêtacelluline (même si EGF et TGF α restent les ligands préférentiels) (35), aboutissant à sa dimérisation ou à son hétérodimérisation avec d'autres récepteurs de la famille HER (HER-2 notamment, mais également HER 3 et HER 4). L'autophosphorylation et la transphosphorylation des récepteurs par l'intermédiaire de leurs domaines tyrosine kinase conduisent alors au recrutement d'effecteurs intracellulaires et à l'activation des voies de prolifération et de survie (36).

Les thérapeutiques ciblées en cancérologie font actuellement principalement appel à 2 grandes catégories de molécules, les anticorps monoclonaux (Acm) et les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) (37). Parmi les produits ciblant le EGFR, le cetuximab (Erbix[®]) (38)(39) pour les Acm, le géfitinib (Iressa[®]) (40)(41) et l'erlotinib (Tarceva[®]) (42)(43) pour les TKI, font partie des agents les mieux connus et les plus avancés dans leur développement clinique. De nombreuses autres molécules sont également en développement clinique ou préclinique, notamment concernant les TKI désormais assez souvent multicibles (le EGFR n'est pas le seul récepteur impliqué alors dans les mécanismes d'action). Acm et TKI diffèrent clairement de par leur mode d'action sur leur cible. Le cetuximab est un antagoniste compétitif de l'EGF sur son récepteur. Indépendamment de la phosphorylation du récepteur, le complexe cetuximab-EGFR est consécutivement internalisé (44)(45). Au contraire, les TKI agissent sur la portion cytosolique de EGFR, en compétition avec l'ATP au niveau de son domaine de liaison, empêchant ainsi l'autophosphorylation du récepteur. En fonction de la nature du TKI, l'inhibition du EGFR peut être réversible comme c'est le cas avec le géfitinib et l'erlotinib, ou bien irréversible comme par exemple avec le PD-183805 (46)(47)(48). A l'inverse des Acm, les TKI ne sont pas strictement spécifiques de leur cible présumée (EGFR par exemple). En effet, les TKI étant des antagonistes compétitifs de l'ATP au niveau de son site de fixation sur

les tyrosines kinases (47), il peut exister, de façon variable, une réactivité croisée des TKI avec les autres membres de la famille des récepteurs HER, comme HER-2 (49).

Les effets du ciblage de EGFR témoignent du rôle physiologique de ce récepteur dans les voies de transduction du signal impliquées dans les phénomènes de division cellulaire, d'apoptose et de néoangiogenèse. Sur le plan de la prolifération cellulaire d'abord, on observe un ralentissement du processus de division cellulaire, avec blocage des cellules en phase G1, faisant intervenir des modifications moléculaires au niveau des principaux points de contrôle du cycle cellulaire (50)(51). Par ailleurs, il a été également rapporté une modification de l'équilibre entre les niveaux intracellulaires de Bax et de Bcl-2, ce qui souligne l'effet pro-apoptotique du ciblage du EGFR (52). Quant à l'effet anti-angiogénique du ciblage du EGFR, il a été mis en évidence pour les Acm et pour les TKI, notamment par inhibition de la sécrétion tumorale de facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF et le facteur VIII (53)(54).

Les études réalisées *in vivo* sur xénogreffes tumorales révèlent une efficacité du cetuximab très supérieure à ce que l'on observe sur lignées cellulaires *in vitro* (55). En effet, une part importante de l'activité antitumorale des Acm pourrait provenir de processus immunologiques tels que la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (56)(57). Ces différences d'activité *in vitro* et *in vivo* notées avec le cetuximab ne sont pas aussi marquées avec les TKI. Ainsi, le géfitinib de même que d'autres TKI de développement plus récent, comme le sunitinib (Sutent[®]), entraînent une inhibition de la prolifération cellulaire aussi bien *in vitro* que *in vivo*, sur de nombreuses lignées cellulaires (58)(59).

Différentes études ont étudié les effets de la combinaison des anti-EGFR aux agents cytotoxiques conventionnels et à l'irradiation. Il en ressort généralement, qu'il s'agisse d'Acm ou de TKI, des effets cytotoxiques additifs ou supra-additifs. Au niveau expérimental, il ne semble pas y avoir de distinction entre Acm et TKI, quant à la possibilité d'obtenir une

synergie des effets cytotoxiques, lorsqu'ils sont associés aux agents de chimiothérapie conventionnelle ou à l'irradiation. Cette synergie peut être attribuée en grande partie aux effets connus du ciblage du EGFR sur la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'angiogenèse et la réparation de l'ADN **(58)(60)(61)(62)**.

Sur le plan clinique, le géfitinib et l'erlotinib, pour les TKI, sont utilisés dans le traitement du cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules, où ils se sont révélés particulièrement efficaces chez les patients présentant certaines mutations du EGFR **(63)(64)**. Concernant les Acm, le cetuximab a actuellement prouvé son intérêt dans le traitement des cancers colorectaux, en association à l'irinotécan **(65)**. Il a également démontré son efficacité dans le traitement des carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures **(66)(67)**.

3.2.2 EGFR dans le cancer de prostate et son évolution

Dans le cadre du cancer de prostate, l'approche semble particulièrement intéressante. En effet, de nombreux mécanismes moléculaires sont liés à la progression vers l'hormono-résistance **(68)**. Mais l'augmentation de l'expression des protéines de signalisation de HER semble être un facteur important **(69)**.

Dans une étude récente, Schlomm et al **(70)** ont analysé des échantillons tissulaires provenant de 2497 tumeurs prostatiques au niveau de l'ADN et au niveau protéique. Une expression détectable d'EGFR a été retrouvée dans 18% des cancers et s'est révélée corrélée aux hauts grades, aux stades avancés et à un risque élevé de récurrence du PSA en analyse univariée ($p < 0.0001$ dans chaque cas). L'utilité potentielle des traitements anti-EGFR pourrait ainsi être analysée dans le cancer de prostate exprimant EGFR.

Par ailleurs, après prostatectomie totale, l'expression d'EGFR est corrélée au risque de récurrence et à la progression vers l'hormono-résistance. En analyse multivariée, EGFR est un facteur pronostique indépendant de la survie sans progression. 100% des métastases des

cancers de prostate hormono-résistants expriment EGFR, suggérant que ce récepteur est une voie de transduction capitale pour la croissance tumorale (71).

Par ailleurs, dans une autre étude (72), l'amplification et la mutation d'EGFR ont été analysées dans le cancer soit hormono-sensible soit hormone-résistant, chez 10 patients. Aucune corrélation significative n'a été trouvée entre l'évolution des mutations et le statut hormono-sensible ou hormono-résistant. Toutefois, le temps nécessaire pour passer au CPHR a été significativement plus court chez les patients avec une mutation du gène EGFR ($p=0.017$). Ainsi, dans cette étude, les mutations d'EGFR ne semblent pas jouer un rôle important dans la progression vers l'hormono-résistance mais elles sont corrélées au pronostic. Il faut considérer dans cette étude également le faible nombre de sujets.

3.2.3 Principaux résultats des études ciblant EGFR dans le CPHR en phases précliniques

Des études récentes suggèrent que l'involution prostatique induite par la castration puisse être due à des effets initialement dans les vaisseaux prostatiques. Hammarsten et al (73) ont récemment examiné si des traitements antiangiogéniques pouvaient mimer les effets de la castration. Le plan expérimental a utilisé des cellules AT-1 de cancer de prostate androgéno-indépendant. Ces cellules ont été inoculées dans la prostate ventrale de rats adultes. Les animaux porteurs de tumeurs ont été traités par un inhibiteur de VEGFR 2 et d'EGFR, le ZD6474 (Astra Zeneca), et les auteurs ont comparé les effets à court terme (3 jours) de ce traitement avec ceux induits par la castration. Les résultats ont montré que la castration entraînait une diminution de la densité vasculaire dans le tissu sain entourant la tumeur et donc une augmentation de l'hypoxie tissulaire et de l'apoptose, ainsi qu'une diminution modérée de la croissance tumorale. Le traitement par le ZD6474 a abouti à une diminution de la densité vasculaire tumorale accompagnée d'une augmentation de l'hypoxie tumorale et de

l'apoptose, ainsi qu'à une diminution de la croissance tumorale, suggérant que la castration et la thérapie antiangiogénique agissent selon un mécanisme similaire. Il est intéressant de noter que le traitement combinant la castration et le ZD 6474 a été plus efficace que la castration et le ZD 6474 administrés seuls pour induire l'hypoxie tumorale, l'apoptose, la nécrose et diminuer la densité vasculaire tumorale. Les auteurs ont conclu que ce traitement combiné pourrait être un moyen particulièrement efficace de traiter les tumeurs prostatiques.

Notre équipe a testé chez l'animal (74) la combinaison d'un inhibiteur de tyrosine-kinase (Sunitinib) à action principalement antiangiogénique, du cetuximab (anti-EGFR) et du docétaxel. Chaque médicament, administré en monothérapie, a démontré des effets comparables et modérés sur la croissance tumorale, avec une inhibition d'environ 50% à la fin du cycle d'administration de 3 semaines. Les valeurs du rapport de combinaison (CR) informatisé pour la croissance tumorale indiquent des effets supra-additifs pour la combinaison sunitinib-docétaxel et sunitinib-cetuximab et suggèrent des effets seulement additifs pour la combinaison sunitinib-cetuximab-docétaxel. Les effets sur la croissance tumorale se sont accompagnés d'une diminution parallèle de la prolifération des cellules tumorales (Ki 67) et de la vascularisation tumorale (facteur Von Willebrand). Des effets pro-apoptotiques (clivage de la caspase-3) significativement plus importants ont été observés avec les combinaisons sunitinib-docétaxel et sunitinib-docétaxel-cetuximab qu'avec les autres combinaisons. Nous concluons donc que les effets antitumoraux supra-additifs observés avec la combinaison sunitinib-docétaxel pourraient étayer des stratégies novatrices dans la prise en charge du cancer de prostate avancé, utilisant simultanément des traitements ciblant EGFR.

Dans le cadre de ces approches combinées, des résultats récents sur des lignées cellulaires (DU145) et des modèles *in vivo* murins ont montré l'intérêt d'une radioimmunothérapie (associant du lutétium 177 couplée à un anticorps anti-prostate hu3S193) cytotoxique et pro-apoptotique. Dans cet article (75), la dose maximale tolérée de la radioimmunothérapie a été

identifiée et un résultat très intéressant est que l'association de ce traitement à un TKI (AG1478) à dose sub-thérapeutique a montré une amélioration significative de l'efficacité sur les modèles *in vivo*, comme d'ailleurs l'association au docétaxel.

3.2.4 Résultats des études cliniques principales des thérapies ciblant EGFR dans le CPHR

3.2.4.1 Essais en monothérapie

Dans l'étude de Agus et al (76), un agent appartenant à une nouvelle classe d'agents anticancéreux ciblés a été évalué, l'inhibiteur de la dimérisation d'EGFR humain (pertuzumab). Le but de cette étude clinique de phase II à un seul bras était d'évaluer l'efficacité et la tolérance du pertuzumab en monothérapie chez des patients avec un CPHR ayant présenté une progression de la maladie après une chimiothérapie antérieure à base de docétaxel. 42 patients ont été inclus dans l'étude. Le pertuzumab a été bien toléré et n'a induit aucune réponse objective, mais plusieurs patients ont présenté une stabilisation de la maladie supérieure à 23 semaines alors qu'il s'agissait d'une population lourdement prétraitée. Les auteurs ont comparé les patients à des témoins historiques afin d'identifier un allongement de la survie médiane avec le pertuzumab, ce qui est bien sûr discutable.

Gravis et al (77) ont réalisé une étude de phase II pour 30 patients dont 29 CPHR. 23 patients avaient déjà reçu une première ligne de chimiothérapie. Ils avaient un PSA médian de 102 ng/ml (range 3-1213 ng/ml). Les patients ont reçu 150 mg/j d'erlotinib les 4 premières semaines, puis 200 mg/j si toxicité acceptable. Le critère principal de jugement était une diminution ou une stabilisation du PSA sans évolution clinique. La toxicité a été modérée, mais seuls 14% des patients ont eu au moins une stabilisation du PSA. Par contre, un bénéfice clinique a été retrouvé pour 40% des patients (défini par une amélioration de l'index de

Karnofsky ou des douleurs), ce qui est un résultat intéressant à ce stade de la maladie, mais ça n'était pas le critère principal de jugement.

Le géfitinib est une autre molécule ciblant EGFR comme nous l'avons vu initialement. Dans un essai de phase II qui a inclus à peu près 100 patients présentant un CPHR, il n'y a pas eu de réponse observée et une activité anticancéreuse très faible (78).

Cette résistance au géfitinib est peut-être due à une suractivité de la voie PI3K/Akt dans le cancer de prostate (79) et donc des essais avec des stratégies de combinaisons semblent plus intéressants à priori.

3.2.4.2 Essais de combinaisons de traitements

Les essais cliniques des anti-REGF en association sont peu nombreux à l'heure actuelle.

Le docétaxel est, nous l'avons vu, le traitement standard de première intention dans le cadre du CPHR. Une association aux thérapies ciblées anti-EGFR peut laisser espérer une efficacité et une diminution des toxicités en permettant de réduire les doses de l'antimitotique.

L'erlotinib est un inhibiteur actif par voie orale et réversible de l'enzyme tyrosine kinase d'EGFR qui bloque la progression du cycle cellulaire en phase G1. Chiorean et al (80) ont réalisé une étude afin de définir la dose maximale tolérée de docétaxel hebdomadaire associé à l'erlotinib quotidien. 25 patients ont été inclus. Des réponses ont été observées dans le cancer de prostate (mais pas dans le cancer bronchopulmonaire non à petites cellules ni dans le carcinome hépatocellulaire) et la dose recommandée pour la phase II a été de 30 mg/m² de docétaxel par semaine et de 150 mg d'erlotinib par jour.

Gross et al ont ainsi utilisé l'erlotinib dans le cadre du CPHR (81). L'erlotinib est un inhibiteur spécifique de l'activité tyrosine kinase d'EGFR. Il s'agissait d'une étude de phase II multicentrique chez des patients présentant un CPHR et âgés de plus de 65 ans. 22 patients ont été inclus (âge médian : 73.5 ans). Il n'y a pas eu de réponse objective lorsqu'il existait

des cibles radiologiques mesurables (8 patients), mais 5 patients ont eu une diminution du PSA de plus de 50%. Il y a eu deux neutropénies fébriles et les toxicités les plus fréquentes étaient la fatigue, l'anorexie et la diarrhée. L'activité anticancéreuse semble généralement comparable à celle du docétaxel utilisé en monothérapie. Les toxicités hématologiques et non hématologiques pourraient être augmentées par rapport au docétaxel en monothérapie. Dans cette population âgée, il ne semble donc pas exister de bénéfice à une telle association vu cette étude de phase II.

De nouvelles molécules agissent sur plusieurs cibles, dont EGFR. C'est le cas du vandetanib, un anticancéreux oral à prendre une fois par jour, qui inhibe VEGF et EGFR. Horti J et al (82) ont réalisé une étude de phase II, randomisée, en double aveugle, expérimentant le vandetanib (100 mg/j) vs placebo en association au docétaxel (75 mg/m² toutes les 3 semaines) et à la prednisolone (10 mg/j). Cette étude a inclus 86 patients avec un CPHR métastatique. Le critère principal de jugement était la réponse du PSA (réduction de plus de 50% du taux plasmatique). Les résultats ont montré une augmentation des événements indésirables (progression de la maladie ou décès) dans le bras vandetanib (65% vs 60%, HR=1.13, p=0.67), cependant de manière non significative. L'incidence globale des événements indésirables a été similaire dans les deux groupes. Le profil de sécurité et de tolérance du vandetanib a été similaire à celui rapporté précédemment. Dans cette étude, le vandetanib associé au docétaxel/prednisolone n'a pas montré de bénéfice d'efficacité sur la base du taux de PSA vs placebo associé au docétaxel/prednisolone.

3.2.5 Synthèse et conclusion EGFR et CPHR

Le ciblage de EGFR dans le CPHR est une piste logique puisque HER1 est surexprimé très fréquemment dans cette maladie et que l'activation d'EGFR est à l'origine d'une prolifération cellulaire, d'une néoangiogenèse et d'une augmentation de l'invasion tumorale par une

augmentation de la mobilité de ces cellules tumorales. De plus, les agents pharmaceutiques dans cette catégorie sont maintenant bien connus et ont pour la plupart montré des bénéfices cliniques dans le cadre de tumeurs solides. Si des éléments précliniques paraissaient assez convaincants sur l'usage de molécules anti-EGFR (soit anticorps monoclonaux soit TKI), le passage aux phases cliniques en monothérapie est assez décevant. Cependant, les approches cliniques associant des anti-EGFR aux antimitotiques (et notamment au docétaxel) sont certainement à poursuivre. Cette approche par traitements combinés associant des thérapies ciblées comme celles ciblant EGFR peuvent nous permettre d'adapter au mieux les doses des cytotoxiques systémiques dans une population le plus souvent âgée et polypathologique, avec une maladie cancéreuse agressive. Il faudrait également, vu les résultats précliniques, réfléchir à associer également différentes cibles au REGF, notamment les anti-angiogéniques. Les TKI multicibles peuvent se révéler certainement intéressants. La limitation sera cependant la toxicité de ces polytraitements, d'autant que le CPHR concerne des populations souvent âgées et vulnérables. Ainsi, le cancer de prostate est un bon modèle pour les approches oncogériatriques. Les études cliniques devraient donc intégrer des paramètres d'évaluation gériatrique, afin de définir au mieux les patients pour qui le traitement sera réellement bénéfique. Ces paramètres concernent l'état cognitif, l'état nutritionnel, la recherche d'un trouble anxio-dépressif, l'évaluation du nombre et de la sévérité des comorbidités, du risque iatrogène par la polymédication, de l'autonomie pour les activités quotidiennes, du risque de chute, de la qualité du soutien socio-environnemental des patients. La survie dans ce contexte n'est peut-être pas le paramètre essentiel pour le jugement des études, mais cela demande une révolution culturelle que prône la vision oncogériatrique. Cette approche est désormais recommandée par la Société Internationale d'Oncogériatrie (SIOG) qui propose que les stratégies thérapeutiques soient décidées après une évaluation gériatrique pour les patients vulnérables (15).

Remarque : nous avons réalisé une revue de la littérature soumise au journal « Pharmaceuticals » sur l'implication d'EGFR dans la progression de la maladie cancéreuse prostatique et sur les résultats actuels des essais thérapeutiques précliniques et cliniques utilisant des anti-EGFR dans le cancer de prostate hormono-résistant. Le texte complet est en Annexes (**Annexe 1**).

4 Travail de thèse expérimental

4.1 Objectifs et déroulé du travail

La néo-angiogénèse est indispensable au développement des tumeurs solides, et notamment des tumeurs de prostate très riches en vaisseaux. Dans ce type de tumeurs, comme nous l'avons vu plus haut, le rôle de EGFR dans le processus de cancérogénèse est clairement établi, de même que son impact en terme de pronostic **(70)**.

Les agents anti-EGFR offrent, de par leur action sur les cellules tumorales, une perspective nouvelle pour le traitement de ces cancers. Ils ont en outre une activité anti-angiogénique qui s'explique d'une part par une inhibition de la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques par les cellules tumorales et d'autre part par une action directe sur les cellules endothéliales qui expriment aussi EGFR (voir 3.2). Cependant, comme pour d'autres tumeurs solides et malgré le rationnel fort sous-tendant cette catégorie de médicaments antitumoraux, les essais en monothérapie se sont avérés décevants (voir 3.2). Les stratégies actuelles envisagent donc très souvent des associations de ces agents avec des agents antimitotiques conventionnels, et notamment avec le docetaxel, qui est la drogue de référence pour cette pathologie **(83)**.

En outre, au vu des arguments ci-dessus, l'association d'un traitement antiangiogénique et d'un traitement anti-EGFR semble pouvoir prendre une place dans une stratégie thérapeutique contre le cancer de prostate hormono-résistant sur le plan mécanistique. L'intérêt d'une trithérapie (antiangiogénique, anti-EGFR et docetaxel) est aussi à envisager.

C'est pourquoi la première partie de notre travail, initiée pendant le Master 2 et poursuivie et finalisée durant la thèse, nous a amené à étudier les effets anti-tumoraux du sunitinib (médicament oral présentant une activité intracellulaire multicible inhibitrice de tyrosine kinases, avec activité antiangiogénique. Les cibles sont le PDGFR, le VEGFR, KIT et FLT3

(84)(85). Nous l'avons associé au Cetuximab (C225) qui est un anticorps monoclonal humanisé reconnaissant la partie extracellulaire de EGFR (HER1) dont l' action conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 associé à une augmentation de p27 et à une diminution des CDK 2, 4, 6 **(86)**, et au docetaxel, poison du fuseau par stabilisation des microtubules qui est le médicament de référence dans le cancer de prostate hormono-résistant (voir plus haut).

Nous avons étudié les effets de ces médicaments seuls ou en association *in vivo* sur la lignée cellulaire PC3 xénogreffée chez la souris nude. En effet, la lignée PC3 est la lignée de cellules de cancer de prostate humain hormono-résistant la plus utilisée dans les modèles précliniques et dont les caractéristiques sont les lieux connues.

La seconde partie de notre travail a concerné un autre inhibiteur de tyrosine-kinases multicibles, le vandetanib. Ces cibles sont VEGFR et EGFR **(87)**. Nous l'avons également associé au docetaxel. L'apparition fréquente de résistances secondaires à cette dernière drogue nous a amené à étudier l'action du vandetanib, associé ou non, au docetaxel sur une lignée cellulaire PC3 sauvage, mais également sur une lignée PC3 résistante au docetaxel. Nous avons également, comme pour le premier travail, utilisé un modèle xénogreffé *in vivo* sur souris nude.

4.2 Résultats

4.2.1 Effet anti-tumoral supra-additif du sunitinib malate (SU11248, Sutent®) combiné au docetaxel. Une nouvelle perspective thérapeutique dans le cancer de prostate hormono-résistant. (74) (Article en Annexe 2)

Guerin O, Formento P, Lo Nigro C, et al. Supra-additive antitumor effect of sunitinib malate (SU11248, Sutent®) combined with docetaxel. A new therapeutic perspective in hormone refractory prostate cancer. J Cancer Res Clin Oncol 2008;134:51-57

4.2.1.1 Introduction et objectifs

Les résultats des approches physiopathologiques et biomoléculaires indiquent qu'il existe une dysrégulation de la néo-angiogénèse et des voies de signalisation liées aux protéines HER lors de la progression du cancer de prostate hormono-résistant. Le but de notre étude a été de tester une nouvelle approche thérapeutique rationnelle combinant le docetaxel avec un agent ciblant REGF (le cetuximab) et un inhibiteur de tyrosine-kinases multicibles à action principalement anti-angiogénique, le sunitinib.

4.2.1.2 Matériels et méthodes

Nous avons utilisé une lignée cellulaire connue et bien documentée de cancer de prostate humain hormono-résistant, la lignée PC3. Les cellules ont été xénogreffées chez des souris nude, et les traitements ont débutés lorsque le volume tumoral moyen atteignait 250 mm³. Nous avons traité 8 groupes de souris. Le premier groupe a été un groupe témoin traité par le solvant seul, les autres par sunitinib (40 mg/kg/j, 5j/sem, pendant 3 semaines – 0.2 ml per os **photo 1 p.45**), par cetuximab (0.2 mg/kg/j, 5j/sem, pendant 3 semaines – 0.2 ml intrapéritonéal), par docetaxel (10 mg/kg/j, 1j/sem, pendant 3 semaines – 0.2 ml

intrapéritonéal, **photo 2 p.45**) en monothérapie ou en association deux par deux, et enfin un dernier groupe en trithérapie. Les tumeurs ont été collectées (**photo 3 p.45**) au 84^{ème} jour ou lorsque le volume tumoral dépassait 2500 mm³. Les paramètres suivants ont été évalués :

- les volumes tumoraux
- Par Western Blot:
 - Voies de signalisation de EGFR et VEGFR: phosphoAKT, phosphoMAPK
 - Cycle cellulaire: p21, p27
 - Apoptose: Bax, Bcl2, PARP clivée - caspase 3
- Par immuno-précipitation:
 - Expression de KIT et phosphoKIT
- Par tissue microarray:
 - vWF (facteur Von Willebrandt) et Ki67

4.2.1.3 Résultats

Chaque médicament, administrée en monothérapie, a montré un effet modéré et comparable sur la croissance tumorale avec environ 50% d'inhibition à la fin des trois semaines de traitement. Nous avons utilisé un Rapport de Combinaison (Computed Combination Ratio, CR) afin de déterminer le type d'interactions sur la croissance tumorale des différentes combinaisons d'agents à J61, J68 et J75. Ces CR ont montré un effet supra-additif pour l'association sunitinib-docetaxel (1.53, 1.15 et 1.47 pour les trois temps respectivement), et pour l'association sunitinib-cetuximab (1.20, 1.32, et 1.14). Ce CR suggère un simple effet additif pour la triple association (CR=1). L'effet sur la taille des tumeurs a été accompagné d'une diminution de la prolifération cellulaire (Ki67) et de la vascularisation tumorale (vWF). Nous avons également constaté un effet pro-apoptotique significativement plus élevé (caspase

3 clivée) pour les associations sunitinib-docetaxel et sunitinib-docetaxel-cetuximab comparé aux autres associations.

4.2.1.4 Conclusion

L'effet supra-additif observé avec la combinaison sunitinib-docetaxel pourrait être une approche intéressante et nouvelle parmi les pistes d'innovation thérapeutique pour le cancer de prostate hormono-résistant.

4.2.2 Vandetanib, inhibiteur de tyrosine-kinases multicibles, dans le traitement du cancer de prostate hormono-résistant : comparaison de son effet en association au docetaxel sur des lignées cellulaires tumorales docetaxel-sensibles et docetaxel-résistantes. Etude in vivo préclinique.

Cet article a été soumis en mai 2010 à J Cancer Res Clin Oncol. Article en Annexe 3.

4.2.2.1 Introduction et objectifs

Au cours de la progression d'un cancer de prostate vers l'hormono-résistance on retrouve une surexpression de l'EGFR et une dysrégulation de la néo-angiogénèse. De nombreuses tumeurs de prostate traitées à ce stade par docetaxel deviennent par la suite résistantes à la chimiothérapie par taxane. Le but de cette étude est de tester une nouvelle approche thérapeutique combinant le docetaxel au vandetanib qui cible à la fois le VEGFR et l'EGFR.

4.2.2.2 Matériels et méthodes

Nous avons utilisé une lignée cellulaire connue et bien documentée de cancer de prostate humain hormono-résistant, la lignée PC3 (PC3 Wt). Nous avons également utilisé une lignée rendue résistante au docetaxel (PC3R) dérivée de cette dernière. Les cellules ont été

xénogreffées chez des souris nude, et les traitements ont commencé lorsque le volume tumoral moyen atteignait 250 mm³. Les souris ont été traitées soit avec le solvant seul (groupe contrôle), soit avec le vandetanib seul (25 ou 50 mg/kg/j, 5j/sem, pendant 3 semaines, 0.2 ml per os, **photo 1 p.45**), soit le docetaxel seul (10 ou 30 mg/kg/j, 1j/sem, pendant 3 semaines, 0.2 ml intrapéritonéal, **photo 2 p.45**), soit une combinaison des deux drogues (vandetanib 25 mg/kg + docetaxel 10 mg/kg, ou vandetanib 50 mg/kg + docetaxel 30 mg/kg). Ces traitements ont été réalisés avec les deux lignées cellulaires décrites ci-dessus (PC3Wt et PC3R).

4.2.2.3 Résultats

Docetaxel en monothérapie a un effet anti-tumoral plus puissant sur la lignée PC3Wt. Vandetanib a un effet de stimulation de la croissance tumorale pour la lignée PC3Wt à dose faible, et un effet inhibiteur dose-dépendant sur la lignée PC3R. L'association vandetanib – docetaxel à faible comme à forte dose n'a pas un effet supérieur au docetaxel seul sur PC3Wt et a un effet au mieux additif sur PC3R. La prolifération qui est supérieure pour les cellules PC3R par rapport aux cellules PC3Wt (avant traitement) est diminuée par le vandetanib mais seulement pour PC3R. Les associations montrent une réduction importante de la vascularisation tumorale, sachant que cette vascularisation était plus importante initialement pour la lignée résistante, mais pas supérieur à celle induite par le seul vandetanib. Par ailleurs, nous n'avons pas retrouvé in vitro d'action modulatrice du vandetanib sur MDR1 (multi drug resistance 1, MDR GP 170) pour la lignée PC3R.

4.2.2.4 Conclusion

L'utilisation possible du vandetanib en monothérapie, ne peut s'envisager dans le traitement d'un cancer de prostate hormono-résistant que dans le cas où la tumeur est en échappement au docetaxel.

Photo 1



Photo 2



Photo 3



4.3 Synthèse et perspectives

Le docetaxel, par ses effets pro-apoptotiques importants et son efficacité anti-tumorale, constitue le traitement de référence dans le cadre des cancers de prostate hormono-résistants (3). Cette hormono-résistance s'accompagnant d'une surexpression d'EGFR et d'une sécrétion accrue de VEGF (68).

C'est pourquoi nous avons envisagé une combinaison de traitements associant un anti-EGFR (cetuximab ou C225) et un inhibiteur de l'angiogénèse (sunitinib ou SU11248) dans le cadre de notre premier travail.

Nous avons montré que l'association du docetaxel au sunitinib diminue l'expression de pospho-p42-44 et donc inhibe les voies de la prolifération et de la survie. Elle présente une efficacité évidente sur les volumes tumoraux chez la souris. De plus le ratio de combinaison (CR) sunitinib- docetaxel, largement supérieur à 1, est en faveur d'un effet supra-additif des deux médicaments, que l'on ne retrouve pas pour la triple association, même si les effets anti-tumoraux restent tout de même supérieurs dans cette configuration. La triple association induit un effet pro-apoptotique important, mais du même ordre de grandeur que celui induit par la bithérapie. Les analyses immuno-histochimiques retrouvent également une diminution importante de la prolifération (mesurée par Ki67) et un effet anti-angiogénique par diminution de l'expression de vWF. La triple association est active non seulement sur la tumeur elle-même mais également sur son environnement. Le cœur d'impact de la triple association reste l'effet supra-additif sunitinib – docetaxel, le cetuximab n'apporte qu'un effet additif à la bithérapie sunitinib - docetaxel, même si l'on constate qu'il n'altère pas la tolérance du traitement, évaluée par la mesure du poids des souris. Cette tolérance est très bonne pour le sunitinib en monothérapie, le docetaxel en monothérapie, et leur association. Nos résultats sont concordants avec ceux de la littérature (88).

Notre deuxième travail a porté sur une approche utilisant le vandetanib, inhibiteur de tyrosine-kinases ciblant VEGFR et EGFR puisque les tumeurs de prostate évoluant vers l'hormono-résistance surexpriment ces deux récepteurs. En complément de notre premier travail, nous avons évalué l'efficacité du vandetanib associé au docetaxel, sur des cellules PC3 docetaxel-sensibles (PC3Wt) mais aussi sur les cellules PC3 résistantes (PC3R) au docetaxel. Nos résultats montrent clairement que les effets du vandetanib, du docetaxel et de leur association varient considérablement selon le modèle utilisé (PC3Wt ou PC3R). En effet, pour la lignée PC3Wt, si le docetaxel diminue la croissance des tumeurs, cela n'est pas le cas du vandetanib. A faible concentration, le vandetanib a même un effet inverse puisque l'association docetaxel-vandetanib est moins efficace que le docetaxel seul. Cela pourrait expliquer les résultats cliniques négatifs, en première ligne, récemment publiés obtenus avec cette association **(82)**. Sur le modèle PC3R, si le docetaxel a un effet plus faible (par définition), le vandetanib à posologie forte a un effet inhibiteur supérieur à son effet sur PC3Wt. Ce résultat peut être expliqué par la surexpression des deux cibles du vandetanib pour PC3R par rapport à PC3Wt :

- tout d'abord une augmentation de la densité de vaisseaux associée à une augmentation de l'expression de VEGF. Cette relation a déjà été mise en évidence par notre équipe dans le cadre des tumeurs de la face et du cou **(89)** concernant le ZD6126 (agent de cibles identiques) ou par d'autres concernant le vandetanib **(90)**.
- Ensuite, par une surexpression d'EGFR par les cellules tumorales. Si cette surexpression est controversée pour certaines tumeurs, de nombreux travaux retrouvent une amplification génique, de l'ARNm ou de la protéine dans le cadre des cancers de prostate hormono-résistants (voir 3.2.2)

La protéine MDR GP 170 est surexprimée par PC3R. *In vitro*, nous n'avons retrouvé aucune modulation de cette protéine par le vandetanib, contrairement à ce que notre équipe a montré avec le lanreotide sur cette même lignée PC3R et **(91)**. Ces résultats sont également en

contradiction avec ceux publiés pour le vandetanib mais en association avec d'autres médicaments et sur d'autres types de tumeurs (92). Ils demeurent cependant cohérents avec nos résultats expérimentaux *in vivo* qui montrent une absence de potentialisation de l'action du docetaxel par le vandetanib. Bien que nos résultats ne soient pas à la hauteur de nos espérances, l'extrapolation de résultats précliniques vers une situation clinique potentielle peuvent être hasardeux. Voici nos conclusions basées sur nos études expérimentales:

- le vandetanib ne devrait pas être associé au docetaxel pour le traitement de tumeurs naïves
- la résistance tumorale induite au docetaxel pourrait rendre ces tumeurs plus sensibles au vandetanib
- le vandetanib ne peut réverser la résistance au docetaxel dans notre modèle.

Cela implique que l'usage de vandetanib ne serait rationnel qu'en monothérapie sur les tumeurs devenues résistantes au docetaxel.

BIBLIOGRAPHIE

1. Jemal A, Siegel R, Ward E. Cancer statistics. *Cancer J Clin* 2008;58:71-96
2. Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, et al. Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer : a canadian randomized trial with palliative end points. *J Clin Oncol* 1996;14:1756-64
3. Khan MA, Carducci MA, Partin AW, et al. The evolving role of docetaxel in the management of androgen-independent prostate cancer. *J Urol* 2003;170:1709-16
4. Berthold DR, Pond GR, Soban F, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer : updated survival in the TAX 327 study. *J Clin Oncol* 2008;26:242-5
5. Small EJ, Sacks N, Nemunaitis J, et al. A pilot trial of CTLA-4 blockade with human anti-CTLA-4 in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:1810-5
6. Petrylac DP. A phase I open-label study using lenalidomide and docetaxel in castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:Abstr 5156
7. Droz JP. Propositions pour l'établissement d'algorithmes décisionnels dans le cadre du traitement du sujet âgé présentant un cancer et une pathologie associée. *Oncologie* 2001; 3:100-106.
8. Basso U, Monfardini S. Multidimensional geriatric evaluation in elderly cancer patients: a practical approach. *Eur J Cancer Care* 2004;13:424-433
9. Ghiringhelli F, Ladoire S, Manckoundia P et al. Prise en charge des cancers solides et des hémopathies malignes du sujet âgé : l'oncogériatrie une discipline en devenir. *Rev Med Int* 2005;26:216-225
10. Wieland D, Hirth V. Comprehensive geriatric assessment. *Cancer Control* 2003;10:454-62

11. Extermann M, Aapro M, Bernabei R, et al. Use of comprehensive geriatric assessment in older cancer patients recommendations from the task force on CGA of the International Society of Geriatric Oncology (SIOG). *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;55:241-252.
12. Balducci L. New paradings for treating elderly patients with cancer: the comprehensive geriatric assessment and guidelines for supportive care. *J Support Oncol* 2003;1:30-37.
13. Saliba D, Elliott M, Rubenstein LZ, et al. The Vulnerable Elders Survey: a tool for identifying vulnerable older people in the community. *J Am Geriatr Soc.* 2001 Dec;49(12):1691-9.
14. D'Amico AV, Cote K, Loffredo M, et al. Determinants of prostate cancer specific survival after radiation therapy for patients with clinically localized prostate cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:4567-73
15. Droz JP, Balducci L, Bolla M, et al. Background for the proposal of SIOG guidelines for the management of prostate cancer in senior adults. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010;73:68-91
16. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-1186
17. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent ? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6
18. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23(5):1011-1027
19. Carter SK. Clinical strategy for the development of angiogenesis inhibitors. *Oncologist* 2000;5 Suppl 1:51-4
20. Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002;2:727-739
21. Siemann DW, Bibby MC, Dark GG, et al. Differentiation and definition of vascular-targeted therapies. *Clin Cancer Res* 2005;11(2 Pt 1):416-20

22. Caponigro F, Formato R, Caraglia M, Normanno N, Iaffaioli RV. Monoclonal antibodies targeting epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor with a focus on head and neck tumors. *Curr Opin Oncol* 2005;17(3):212-7
23. Collins TS, Hurwitz HI. Targeting vascular endothelial growth factor and angiogenesis for the treatment of colorectal cancer. *Semin Oncol* 2005;32(1):61-8
24. Ryan AJ, Wedge SR. ZD6474--a novel inhibitor of VEGFR and EGFR tyrosine kinase activity. *Br J Cancer* 2005;92 Suppl 1:S6-13
25. Thorpe PE. Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 2004;10(2):415-27
26. Siemann DW, Chaplin DJ, Horsman MR. Vascular-targeting therapies for treatment of malignant disease. *Cancer* 2004;100(12):2491-9
27. Gaya AM, Rustin GJ. Vascular disrupting agents: a new class of drug in cancer therapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2005;17(4):277-90
28. Picus J. The use of bevacizumab with docetaxel and extramustine in hormone-refractory prostate cancer : initial results of CALGB 90006. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003 ;22 (ASCO Annual Meeting) : Abstr 1578
29. Ning YM. A phase II trial of docetaxel, thalidomide, bevacizumab, and prednisone in patients with metastatic androgen-independent prostate cancer. *ASCO Prostate Cancer Symposium* 2006;Abstr 224. Atlanta, 2-6 juin 2006.
30. Di Lorenzo G, Figg WD, Fossa SD, et al. Combination of bevacizumab and docetaxel in docetaxel-pretreated hormone-refractory prostate cancer : a phase II study. *Eur Urol* 2008;54:1089-94
31. Dahut WL, Scripture C, Posadas E, et al. A phase II clinical trial of sorafenib in androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:209-14

32. Wedge SR, Kendrew J, Hennequin LF, et al. AZD2171 : a highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine-kinase inhibitor for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res* 2005;65:4389-400
33. Ryan CJ, Stadler WM, Roth B, et al. Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of AZD2171, an inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine-kinase, in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Invest New Drugs* 2007;25:445-51
34. Paule B, Brion N. EGF receptors in urological cancer. Molecular basis and therapeutic involvements. *Ann Med Intern* 2003 ;154(7) :448-56.
35. Salomon DS, Brandt R, Ciardello F, et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995 ;19:183-232.
36. Bianco R, Melisi D, Ciardiello F, et al. Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets. *Eur J Cancer* 2006;42(3):290-4.
37. Modi S, Seidman AD. An update on epidermal growth factor receptor inhibitors. *Curr Oncol Rep* 2002;4(1):47-55.
38. Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer* 2001;37 Suppl 4:S16-22.
39. Herbst RS, Kim ES, Harari PM. IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, for treatment of head and neck cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2001;1(4):719-32.
40. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial). *J Clin Oncol* 2003;21(12):2237-46.
41. Ranson M, Hammond LA, Ferry D, et al. ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid, malignant tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol* 2002;20(9):2240-50.

42. Bonomi P. Erlotinib: a new therapeutic approach for non-small cell lung cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2003;12(8):1395-401.
43. Herbst RS. Erlotinib (Tarceva): an update on the clinical trial program. *Semin Oncol* 2003;30(3 Suppl 7):34-46.
44. Fan Z, Lu Y, Wu X, et al. Antibody-induced epidermal growth factor receptor dimerization mediates inhibition of autocrine proliferation of A431 squamous carcinoma cells. *J Biol Chem* 1994;269(44):27595-602.
45. Prewett M, Rockwell P, Rockwell RF, et al. The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996;19(6):419-27.
46. Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001;7(10):2958-70.
47. Denny WA. Irreversible inhibitors of the erbB family of protein tyrosine kinases. *Pharmacol Ther* 2002;93(2-3):253-61.
48. Noonberg SB, Benz CC. Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs* 2000;59(4):753-67.
49. Arteaga CL. The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol* 2001;19(18 Suppl):32S-40S.
50. Fan Z, Shang BY, Lu Y, et al. Reciprocal changes in p27(Kip1) and p21(Cip1) in growth inhibition mediated by blockade or overstimulation of epidermal growth factor receptors. *Clin Cancer Res* 1997;3(11):1943-8.
51. Kiyota A, Shintani S, Mihara M, et al. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 upregulates p27(KIP1) and p15(INK4B) and induces G1 arrest in oral squamous carcinoma cell lines. *Oncology* 2002;63(1):92-8.

52. Huang SM, Bock JM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1999;59(8):1935-40.
53. Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000;6(6):2166-74.
54. Tortora G, Caputo R, Damiano V, et al. Oral administration of a novel taxane, an antisense oligonucleotide targeting protein kinase A, and the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa causes cooperative antitumor and antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res* 2001;7(12):4156-63.
55. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, et al. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1995;1(11):1311-8.
56. Bleeker WK, Lammerts van Bueren JJ, van Ojik HH, et al. Dual mode of action of a human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for cancer therapy. *J Immunol* 2004;173(7):4699-707.
57. Milano G. [Pharmacological skills for targeting EGFR and VEGF]. *Bull Cancer* 2005;92(Spec no):S17-20.
58. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, et al. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2000;6(5):2053-63.
59. Magné N, Fischel JL, Dubreuil A, et al. Influence of epidermal growth factor receptor (EGFR), p53 and intrinsic MAP kinase pathway status of tumour cells on the antiproliferative effect of ZD1839 ("Iressa"). *Br J Cancer* 2002;86(9):1518-23.

60. Magné N, Fischel JL, Dubreuil A, et al. Sequence-dependent effects of ZD1839 ('Iressa') in combination with cytotoxic treatment in human head and neck cancer. *Br J Cancer* 2002;86(5):819-27.
61. Prewett MC, Hooper AT, Bassi R, et al. Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 2002;8(5):994-1003.
62. Bruns CJ, Harbison MT, Davis DW, et al. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin Cancer Res* 2000;6(5):1936-48.
63. Han SW, Kim TY, Hwang PG, et al. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Clin Oncol* 2005;23(11):2493-501.
64. Buter J, Giaccone G. EGFR inhibitors in lung cancer. *Oncology (Williston Park)* 2005;19(13):1707-11; discussion 1711-2, 1720-3.
65. Folprecht G, Lutz MP, Schoffski P, et al. Cetuximab and irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid is a safe combination for the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal carcinoma. *Ann Oncol* 2006;17(3):450-6.
66. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006;354(6):567-78.
67. Bourhis J, Rivera F, Mesia R, et al. Phase I/II study of cetuximab in combination with cisplatin or carboplatin and fluorouracil in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2006;24(18):2866-2872.

68. Amler LC, Agus DB, LeDuc C, et al. Dysregulated expression of androgen-responsive and nonresponsive genes in the androgen-independent prostate cancer xenograft model CWR22-R1. *Cancer Res* 2000;60:6134-41
69. Di Lorenzo G, Tortora G, D'Armiento FP, et al. Expression of epidermal growth factor receptor is correlated with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:3438-44.
70. Schlomm T, Kirstein P, Iwers L, et al. Clinical Significance of Epidermal Growth Factor Receptor protein overexpression and gene copy number gains in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:6579-84.
71. Zhau HE, Wan DS, Zhou J, et al. Expression of c-erbB2/neu protooncogene in human prostatic cancer tissues and cell line. *Mol Carcinol* 1992;5:320-7.
72. Cho KS, Lee JS, Cho NH, et al. Gene amplification and mutation analysis of Epidermal Growth Factor Receptor in hormone refractory prostate cancer. *The Prostate* 2008;68:803-8.
73. Hammarsten P, Halin S, Wikstöm P, et al. Inhibitory effects of castration in an orthotopic model of androgen-independent prostate cancer can be mimicked and enhanced by angiogenesis inhibition. *Clin Cancer Res* 2006;12(24):7431-6.
74. Guérin O, Formento P, Lo Nigro C, et al. Supra-additive antitumor effects of sunitinib malate combined with docetaxel. A new therapeutic perspective in hormone refractory prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:51-7.
75. Kelly MP, Lee ST, Lee FT, et al. Therapeutic efficacy of ¹⁷⁷Lu-CHX-A-DTPA-hu3S193 radioimmunotherapy in prostate cancer is enhanced by EGFR inhibition or docetaxel chemotherapy. *The Prostate* 2009; 69: 926104.
76. Agus DB, Sweeny CJ, Morris MJ, et al. Efficacy and safety of single-agent Pertuzumab, a human epidermal growth factor receptor dimerization inhibitor, in castration-resistant prostate cancer after progression from taxane-based therapy. *J Clin Oncol* 2007;25:675-81.

77. Gravis G, Bladou F, Salem N, et al. Results from a monocentric phase II trial of erlotinib in patients with metastatic prostate cancer. *Ann Oncol* 2008;19:1624-8.
78. Canil CM, Moore MJ, Winquist E, et al. Randomized phase II study of two doses of gefitinib in hormone-refractory prostate cancer: a trial of the National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2005;23:455-60.
79. She QB, Solit D, Basso A, et al. Resistance to gefitinib in PTEN-null HER-overexpressing tumor cells can be overcome through restoration of PTEN function or pharmacologic modulation of constitutive PI3K/Akt pathway signaling. *Clin Cancer Res* 2003;9:4340-6.
80. Chiorean EG, Porter JM, Foster AE, et al. A phase I and pharmacokinetic trial of erlotinib in combination with weekly docetaxel in patients with taxane-naïve malignancies. *Clin Cancer Res* 2008;14:1131-7.
81. Gross M, Higano C, Pantuck A, et al. A phase II trial of docetaxel and erlotinib as first-line therapy for elderly patients with androgen-independent prostate cancer. *BMC Cancer* 2007;7:142-8.
82. Horti J, Widmark A, Stenzi A, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study of vandetanib plus docetaxel/prednisolone in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2009;24:175-80.
83. Retter AS, Figg WD, Dahut WL. The combination of angiogenic and cytotoxic agents in the treatment of prostate cancer. *Clin Prostate Cancer*. 2003; 3:153-159
84. O'Farrell AM, Abrams TJ, Yuen HA. SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase receptor inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood*. 2003; 101:3597-3605
85. Mendel DB, Laird AD, Xin X. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth

factor receptors: determination of pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. Clin Cancer Res. 2003; 9:327-337

86. Ye D, Mendelsohn J, Fan Z. Augmentation of a humanized anti-HER2 mAb 4D5 induced growth inhibition by a human-mouse chimeric anti-EGF receptor mAb C225. Oncogene. 1999; 18:731-738

87. Wedge SR, Ogilvie DJ, Dukes M, et al. ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. Cancer Res 2002, 62 : 4645-4655

88. Kim SJ, Uehara H, Karashima T, et al. Blockade of epidermal growth factor receptor signaling in tumor cells and tumor-associated endothelial cells for therapy of androgen-independent human prostate cancer growing in the bone of nude mice. Clin Cancer Res 2003;9:1200-10

89. Bozec A, Lassalle S, Gugenheim J, et al. Enhanced tumour antiangiogenic effects when combining gefitinib with the antivascular agent ZD6126. Br J Cancer, 2006, 95 : 722-728

90. Siemann DW, Norris CM, Ryan A, et al. Impact of tumor cell VEGF expression on the In vivo efficacy of vandetanib (zactima ; ZD6474). Anticancer Res 2009, 29: 1987-1992

91. Lo Nigro C, Maffi M, Fischel JL, et al. The combination of docetaxel and the somatostatin analogue lanreotide on androgen-independent docetaxel-resistant prostate cancer : experimental data. BJU Int.2008, 102 : 622-627

92. Zheng LS, Wang F, Li YH, et al. Vandetanib (Zactima, ZD6474) antagonizes ABCC1- and ABCG2-mediated multidrug resistance by inhibition of their transport function. PloS One 2009, 4 : e5172

Annexes

Annexe 1

EGFR targeting in hormone-resistant prostate cancer: current appraisal and prospects for treatment

O.Guérin (1,2,3), JL.Fischel (1), JM Ferrero (1,3), A.Bozec (1), G.Milano (1)

(1) Oncopharmacology Unit, Centre Antoine Lacassagne, 33 ave Valombrose, 06100 Nice, France.

(2) Department of Gerontology, Centre Hospitalier et Universitaire de Nice, Hôpital de Cimiez, 4 ave Reine Victoria, 06000 Nice, France. E-Mail : guerin.o@chu-nice.fr

(3) University of Nice Sophia-Antipolis, Nice, France

Key words: chemotherapy, targeted therapy, EGFR, kinase inhibitors, prostate cancer, hormone-resistant prostate cancer, geriatric oncology, review

Abstract:

The incidence of prostate cancer increases with age and because of its high prevalence this disease has a major public health concern. Despite advances in our understanding of the biological mechanisms responsible for the development of this cancer, the transition to the hormone refractory stage (HRPC) and metastatic progression pose real problems of clinical management. Currently, docetaxel chemotherapy has been shown to have a slight but significant impact on survival though the gain in median survival is still less than three months. Research is therefore continuing to improve treatment outcomes. The progression of prostate cancer is accompanied by the overexpression of EGFR (epidermal growth factor

receptor) in a very large majority of cases, suggesting that this may play a mechanistic role. Unfortunately, although preclinical findings seem to be promising for therapies targeting the EGFR in HRPC, current clinical results are disappointing. These results should however encourage us to look for different ways of using anti-EGFR agents or combining them with other targeted therapies.

Introduction

Prostate cancer which is the first male cancer in France, has benefited from advances in surgery, chemotherapy, radiotherapy and hormone therapy during the last ten years. In the United States in 2008, prostate cancer in man accounted for 25% of new cases of cancer (1), and 60,000 new cases in France. As this cancer often occurs in senior adult men, any therapeutic strategy must take quality of life into account. However, when the cancer becomes hormone-refractory (HRPC), a new stage in disease progression has been crossed, and chemotherapies must be reassessed. Although past therapy combining mitoxantrone and prednisone did not improve patient survival it does relieve pain and improve quality of life (2). Currently, the reference treatment for hormone-resistant prostate cancer combines docetaxel and prednisone (3). However the median increase in survival induced by this treatment is only 2.9 months (median survival of 19.2 months vs 16.3 months with mitoxantrone, $p=0.004$). Future strategies aimed at improving management of hormone-refractory advanced prostate cancer should examine the benefits of combining other agents with docetaxel. The current responses to second line-treatments are disappointing and considerable progress remains to be made. This literature review summarizes our understanding of the merits of treatments targeting EGFR in this setting, as current data about these agents require our attention.

1/ EGFR: a particularly interesting target in oncology

Epidermal growth factor receptor (EGFR or HER-1) was the first known member of the HER receptor family. In the physiological state, EGFR is expressed by many epithelia (skin, cervix, bile ducts, hepatocytes, sebaceous glands, bronchi, bladder, breast myoepithelial cells). Likewise, EGFR is overexpressed in many cancers (non-small cell lung cancer, head and neck cancer, ovarian, colon, bladder, kidney and prostate cancers) (4).

EGFR is a receptor with a tyrosine kinase activity. It has a key function in the processes of signal transduction, controlling major cell functions, such as survival and proliferation. Activation of EGFR signaling requires the binding on this receptor of growth factors such as EGF, TGF α , amphiregulin, heparin-binding EGF, and betacellulin (although EGF and TGF α are the preferred ligands) (5), leading to its dimerization or heterodimerization with other receptors of HER family (HER-2 in particular, but also HER 3 and HER 4). The autophosphorylation and transphosphorylation of receptors via their tyrosine kinase domains then leads to the recruitment of intracellular effectors and to the activation of the proliferation and survival pathways (6).

Targeted therapies in oncology currently include 2 main categories of molecules: monoclonal antibodies (Acm) and tyrosine kinase inhibitors (TKI) (7). The best known agents targeting EGFR, with the most advanced clinical development include cetuximab (Erbix[®]) (8)(9) for Acm and gefitinib (Iressa[®]) (10)(11) or erlotinib (Tarceva[®]) (12)(13) for TKI. Many other molecules are also under clinical or preclinical development and, in particular for TKI, these are now also multitargeted as EGFR is not the only receptor involved in their action mechanisms. Acm and TKI clearly differ by their action mechanism on their target. Cetuximab is a competitive antagonist of EGF on its receptor. Independently of the phosphorylation of the receptor, the cetuximab-EGFR complex is then internalized (14)(15). On the contrary, TKI act on the cytosolic portion of EGFR, in competition with ATP at the

level of its binding domain, thereby preventing the autophosphorylation of the receptor. Depending on the nature of the TKI, the inhibition of EGFR may be reversible as is the case with gefitinib and erlotinib, or irreversible as for example with PD-183805 (16)(17)(18). Unlike Acm, TKI are not strictly specific for their supposed target (EGFR for example). As TKI are competitive antagonists of ATP at the level of its tyrosine kinase binding sites (17), there may be a variable cross-reactivity of TKI with other members of the HER receptor family, such as HER-2 (19).

The effects of EGFR targeting testify to the physiological role of this receptor in the signal transduction pathways involved in cell division, apoptosis and neoangiogenesis. At the level of cell proliferation first of all, a slowing of cell division is observed with blocking of cells in the G1 phase, involving molecular changes at the main points of control of the cell cycle (20)(21). In addition, a change in the equilibrium between intracellular Bax and Bcl-2 levels has been reported, underlining the pro-apoptotic effect of EGFR targeting (22). The anti-angiogenic effect of EGFR targeting was demonstrated for Acm and TKI, in particular by inhibition of tumor secretion of pro-angiogenic factors such as VEGF and factor VIII (23)(24).

Studies performed in vivo on tumor xenografts show that cetuximab has a much greater efficacy than that observed on cell lines in vitro (25). A significant part of the antitumor activity of Acm may be due to immunological processes such as antibody-dependant cell cytotoxicity (ADCC) (26)(27). These differences between the in vitro and in vivo activity noted with cetuximab are not as marked with TKI. Hence gefitinib and other more recently developed TKI such as sunitinib (Sutent[®]), cause an inhibition of cell proliferation both in vitro and in vivo, on many cell lines (28)(29).

Different studies have investigated the effects of combining anti-EGFR with conventional cytotoxic agents and radiotherapy. Additive or supra-additive cytotoxic effects are usually

obtained with both AcM or TKI. At experimental level, there seems to be no difference between AcM and TKI concerning the possibility of obtaining synergic cytotoxic effects, when they are combined with conventional chemotherapy agents or radiation. This synergy may be mainly assigned to the known effects of EGFR targeting on cell proliferation, apoptosis, angiogenesis and DNA repair (28)(30)(31)(32).

At clinical level, gefitinib and erlotinib for TKI, are used in the treatment of non-small cell lung cancer, where they were found to be particularly effective in patients with certain EGFR mutations (33)(34). Concerning AcM, cetuximab has currently been shown to be beneficial in the treatment of colorectal cancers, in combination with irinotecan (35). Its efficacy has also been demonstrated in the treatment of squamous cell carcinomas of the upper respiratory and digestive tracts (36)(37).

2/ EGFR in prostate cancer and its outcome

This approach seemed particularly interesting for the treatment of prostate cancer. Indeed, numerous molecular mechanism are linked to the transition to hormone-refractory prostate cancer (38). However, the increased expression of HER signaling family proteins seems to be one important factor (39).

In a recent study, Schlomm et al. (40) analyzed DNA and protein levels in tissue samples from 2497 prostate tumors. Detectable EGFR expression was found in 18% of cancers and was associated with high grade, advanced stages, and high risk for prostate-specific antigen recurrence by univariate analysis ($p < 0.0001$, each). EGFR copy number gains were mostly due to an overrepresentation of the whole chromosome and were associated with EGFR protein expression ($p < 0.0001$), high grade ($p < 0.0001$), and advanced stage ($p = 0.0056$). This significant association of EGFR copy number gains with protein expression argues for the

significant role of minimal gene copy number changes for protein expression. The potential utility of anti-EGFR treatments could be analyzed in EGFR-expressing prostate cancer.

In addition, after total prostatectomy, the expression of EGFR is correlated with the risk of recurrence and progression to hormone resistance. By multivariate analysis, EGFR is an independent prognostic factor of progression-free survival. 100% of metastases of hormone-refractory prostate cancers express EGFR, suggesting that this receptor is a major transduction pathway for tumor growth (41).

In another study (42), EGFR amplification and mutation were analyzed in 10 patients with either hormone-sensitive or hormone-refractory prostate cancer. No significant correlation was found between mutation status and the hormone sensitive or refractory status. However, the time to convert to HRPC was significantly shorter in patients with a mutation in the EGFR gene ($p=0.017$). In this study, EGFR mutation did not appear to play a significant role in the hormone refractory pathway but was associated with prognosis. The small number of subjects in this study must also be taken into account.

3/ Main results of preclinical studies targeting EGFR in HRPC

Recent studies suggest that castration-induced prostate involution may be caused by primary effects in the prostate vasculature. Hammarsten et al. (43), recently investigated if antivasular treatments may mimic the effects of castration. The experimental design used androgen-independent AT-1 prostate cancer cells. These cells were grown inside the ventral prostate of adult rats. Tumor-bearing animals were treated with a VEGFR 2 and EGFR inhibitor: ZD6474 (Astra Zeneca), and authors compared short-term effects (after 3 days) of this treatment with those induced by castration. The results showed that castration caused by decreased vascular density in the normal tissue surrounding the tumor increased tumor hypoxia and apoptosis, and moderately decreased tumor growth. ZD6474 treatment resulted

in decreased tumor vascular density accompanied by increased tumor hypoxia, apoptosis, and decreased tumor growth, suggesting that castration and antiangiogenic therapy work through a similar mechanism. Interestingly, combined treatment by castration + ZD 6474 was more effective than castration and ZD 6474 alone in inducing tumor hypoxia, apoptosis, necrosis, and decreasing tumor vascular density. They concluded that this combined treatment could be a particularly effective way to treat prostate tumors.

Our team tested in experimental animals (44) the combination of an anti-EGFR tyrosine kinase inhibitor (SU11248) having an antiangiogenic action, cetuximab (anti-EGFR) and docetaxel. Each drug, administered as a single-agent, has comparable and moderate effects on tumor growth with approximately 50% inhibition at the end of the 3-week dosing schedule. Computed combination ratio (CR) values for tumor growth indicated supra-additive effects for the sunitinib-docetaxel and sunitinib-cetuximab combinations, and suggested additive effects only for the sunitinib-cetuximab-docetaxel combination. The effects on tumor growth were accompanied by a parallel reduction in tumor cell proliferation (Ki 67) and tumor vascularization (Von Willebrand factor). The sunitinib-docetaxel and sunitinib-docetaxel-cetuximab combinations had significantly higher pro-apoptotic effects (caspase-3 cleavage) than the other conditions. We therefore concluded that the supra-additive anti-tumor effects observed with the sunitinib-docetaxel combination might support innovative strategies in the management of advanced prostate cancer, using simultaneous treatments targeting EGFR.

Concerning these combined approaches, recent results on cell lines (DU145) and in vivo murine models showed the benefit of cytotoxic drug associated to pro-apoptotic radioimmunotherapy (combining lutetium 177 and an anti-prostate antibody hu3S193). In this article (45), the maximum tolerated dose of radioimmunotherapy was determined. One very interesting result was that the combination of this treatment with a TKI (AG1478) at

subtherapeutic doses gave a significant improvement in efficacy on in vivo models as after combination with docetaxel.

4/ Results of the main clinical studies of therapies targeting EGFR in HRPC

4-1/ Single agent therapy trials

In the study of Agus et al., (46), a new class of targeted anticancer agent was assessed, human EGFR dimerization inhibitor (Pertuzumab). The aim of this single-arm phase II clinical study was to assess the efficacy and safety of single-agent pertuzumab in HRPC patients who had experienced progression after prior chemotherapy using docetaxel. 42 patients were enrolled. Pertuzumab was well tolerated and resulted in no objective responses, but several patients in a heavily pretreated population had stable disease for more than 23 weeks. They were compared with historical controls to identify a prolonged median survival time with pertuzumab, which is of course criticable.

Gravis et al (47) performed a Phase II study on 30 patients including 29 HRPC. 23 patients had already received a first line of chemotherapy. They had a median PSA of 102 ng/ml (range 3-1213 ng/ml). The patients received 150 mg/day of erlotinib for the first 4 weeks and then 200 mg/day if toxicity was acceptable. The primary endpoint was a reduction or stabilization of PSA with no clinical progression. Toxicity was moderate, but only 14% of patients had at least a stabilization of PSA. On the other hand, a clinical benefit was obtained in 40% of patients (defined by an improvement in the Karnofsky index or pain), which was an interesting result at this stage of the disease, though this was not the primary endpoint.

As mentioned above, Gefitinib is another molecule targeting EGFR. In a phase II study which included about 100 HRPC patients, no response and a very low anti-cancer activity was observed (48).

This resistance to gefitinib was perhaps due to an overactivity of the PI3K/Akt pathway in prostate cancer (49), and trials with combination strategies are therefore a priori more interesting.

4-2 Trials of treatment combinations

Only few clinical trials have currently been performed using combinations with anti-EGFR agents.

As we have seen Docetaxel is the standard first-line treatment for HRPC. Combination with targeted anti-EGFR therapies may improve efficacy and reduce toxicity and make it possible to reduce the doses of the antimitotic agent.

Erlotinib is an orally active and reversible inhibitor of EGFR tyrosine kinase that blocks the cell cycle in the G1 phase. Chiorean et al. (50) performed a study to define the maximum tolerated weekly dose of docetaxel combined with daily erlotinib. 25 patients were enrolled. Responses were seen in prostate cancer (and in non-small cell lung cancer and hepatocellular carcinoma), and the recommended doses for phase II were a weekly dose of 30 mg/m² of docetaxel and a daily dose of 150 mg of erlotinib.

Gross et al. used Erlotinib in HRPC (51). Erlotinib is a specific inhibitor of the tyrosine kinase activity of EGFR. This was a multi-institutional phase II study in patients with HRPC aged > 65 years. 22 patients were enrolled (median age 73.5 years). There was no objective response when there were measurable radiological targets (8 patients), but 5 patients had a > 50% reduction in PSA. There were two febrile neutropenias and the most frequent toxicities were fatigue, anorexia and diarrhea. The anti-cancer disease activity was generally comparable to docetaxel when used as monotherapy. Hematologic and non-hematologic toxicity may be increased over than docetaxel monotherapy. This combination there did not have any benefit during this phase II study in an elderly population.

New molecules act on several targets, including EGFR. This is the case for Vandetanib, a once-daily oral anticancer drug that inhibits VEGF and REGF. Horti J et al. (52). This was a randomized, double-blind, phase II study, investigating vandetanib (100 mg/day) vs placebo, in combination with docetaxel (75 mg/m² every 3 weeks) and prednisolone (10 mg/day). This study included 86 patients with metastatic HRPC. The primary endpoint was PSA response (> 50 % reduction in plasma levels). The results showed an increase in adverse events (disease progression or death) in the vandetanib arm (65% vs 60%, HR=1.13, p=0.67), though this was not statistically significant. The overall incidence of adverse events was similar in both groups. The safety and tolerability profile for vandetanib was similar to that previously reported. In this study, vandetanib associated with docetaxel/prenisolone gave no increase in efficacy based on the PSA level, vs placebo combined with docetaxel/prednisolone.

Synopsis and conclusion

EGFR targeting in HRPC is a logical approach as HER1 is very frequently overexpressed in this disease, and activation of EGFR leads to cell proliferation, neoangiogenesis, and an increased tumor invasion due to the greater mobility of these tumor cells. Moreover, pharmaceutical agents in this category are now well known and most have been shown to induce clinical benefits in the treatment of solid tumors. Although preclinical findings on the use of anti-EGFR molecules (either monoclonal antibodies or TKI) were promising, the transition to clinical phases as monotherapy has been rather disappointing. However, clinical approaches in which anti-EGFRs are combined with antimitotics (and in particular with docetaxel) must be continued. This use of combined treatments with targeted therapies such as those targeting EGFR may improve dose adjustment of the systemic cytotoxic drugs administered in a usually elderly population with multiple comorbid diseases and an

aggressive cancerous disease. The preclinical results also suggest that combination of other targeted therapies with EGFR and in particular antiangiogenics should be considered. Multi-target TKI may also be useful. However, the main limitation will be the toxicity of this multi-agent therapy, all the more as HRPC often affects elderly and vulnerable populations. Prostate cancer is therefore a good model for geriatric oncology approaches. Clinical studies must therefore integrate geriatric evaluation parameters, in order to better define those patients for whom treatment will be really beneficial. These parameters concern cognitive status, nutritional status, signs of anxiety/depression, the evaluation of the number and severity of comorbidities, drug misadventures related to polymedication, autonomy during daily activities, the risk of falls and socioenvironmental factors determining the quality of patient support and care. In this setting, survival should perhaps not be the main parameter used to assess studies, although this requires a cultural change extolling a geriatric oncology approach. This approach is now recommended by the International Society of Geriatric Oncology (SIOG) which recommends that therapeutic strategies are decided after a geriatric assessment for vulnerable patients (53).

References

1. Jemal A, Siegel R, Ward E. Cancer statistics. *Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
2. Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, Ernst DS, Neville AJ, Moore MJ, Armitage GR, Wilson JJ, Venner PM, Coppin CM, Murphy KC. Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *J Clin Oncol* 1996;14:1756-64.
3. Tannock IF, De Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Theodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberg MA; TAX 327 investigators. Docetaxel plus

prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. N Eng J Med 2004;351:1502-12.

4. Paule B, Brion N. EGF receptors in urological cancer. Molecular basis and therapeutic involvements. *Ann Med Intern* 2003 ;154(7) :448-56.

5. Salomon DS, Brandt R, Ciardello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995 ;19:183-232.

6. Bianco R, Melisi D, Ciardiello F, Tortora G. Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets. *Eur J Cancer* 2006;42(3):290-4.

7. Modi S, Seidman AD. An update on epidermal growth factor receptor inhibitors. *Curr Oncol Rep* 2002;4(1):47-55.

8. Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer* 2001;37 Suppl 4:S16-22.

9. Herbst RS, Kim ES, Harari PM. IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, for treatment of head and neck cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2001;1(4):719-32.

10. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, Nishiwaki Y, Vansteenkiste J, Kudoh S, Rischin D, Eek R, Horai T, Noda K, Takata I, Smit E, Averbuch S, Macleod A, Feyereislova A, Dong RP, Baselga J. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial). *J Clin Oncol* 2003;21(12):2237-46.

11. Ranson M, Hammond LA, Ferry D, Kris M, Tullo A, Murray PI, Miller V, Averbuch S, Ochs J, Morris C, Feyereislova A, Swaisland H, Rowinsky EK. ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in

patients with solid, malignant tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol* 2002;20(9):2240-50.

12. Bonomi P. Erlotinib: a new therapeutic approach for non-small cell lung cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2003;12(8):1395-401.

13. Herbst RS. Erlotinib (Tarceva): an update on the clinical trial program. *Semin Oncol* 2003;30(3 Suppl 7):34-46.

14. Fan Z, Lu Y, Wu X, Mendelsohn J. Antibody-induced epidermal growth factor receptor dimerization mediates inhibition of autocrine proliferation of A431 squamous carcinoma cells. *J Biol Chem* 1994;269(44):27595-602.

15. Prewett M, Rockwell P, Rockwell RF, Giorgio NA, Mendelsohn J, Scher HI, Goldstein NI. The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996;19(6):419-27.

16. Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001;7(10):2958-70.

17. Denny WA. Irreversible inhibitors of the erbB family of protein tyrosine kinases. *Pharmacol Ther* 2002;93(2-3):253-61.

18. Noonberg SB, Benz CC. Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs* 2000;59(4):753-67.

19. Arteaga CL. The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol* 2001;19(18 Suppl):32S-40S.

20. Fan Z, Shang BY, Lu Y, Chou JL, Mendelsohn J. Reciprocal changes in p27(Kip1) and p21(Cip1) in growth inhibition mediated by blockade or overstimulation of epidermal growth factor receptors. *Clin Cancer Res* 1997;3(11):1943-8.

21. Kiyota A, Shintani S, Mihara M, Nakahara Y, Ueyama Y, Matsumura T, Tachikawa T, Wong DT. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 upregulates

p27(KIP1) and p15(INK4B) and induces G1 arrest in oral squamous carcinoma cell lines. Oncology 2002;63(1):92-8.

22. Huang SM, Bock JM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1999;59(8):1935-40.

23. Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000;6(6):2166-74.

24. Tortora G, Caputo R, Damiano V, Bianco R, Fontanini G, Cuccato S, De Placido S, Bianco AR, Ciardiello F. Oral administration of a novel taxane, an antisense oligonucleotide targeting protein kinase A, and the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa causes cooperative antitumor and antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res* 2001;7(12):4156-63.

25. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1995;1(11):1311-8.

26. Bleeker WK, Lammerts van Bueren JJ, van Ojik HH, Gerritsen AF, Pluyter M, Houtkamp M, Halk E, Goldstein J, Schuurman J, van Dijk MA, van de Winkel JG, Parren PW. Dual mode of action of a human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for cancer therapy. *J Immunol* 2004;173(7):4699-707.

27. Milano G. [Pharmacological skills for targeting EGFR and VEGF]. *Bull Cancer* 2005;92(Spec no):S17-20.

28. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Pomatiko G, De Placido S, Bianco AR, Tortora G. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2000;6(5):2053-63.

29. Magné N, Fischel JL, Dubreuil A, Formento P, Poupon MF, Laurent-Puig P, Milano G. Influence of epidermal growth factor receptor (EGFR), p53 and intrinsic MAP kinase pathway status of tumour cells on the antiproliferative effect of ZD1839 ("Iressa"). *Br J Cancer* 2002;86(9):1518-23.
30. Magné N, Fischel JL, Dubreuil A, Formento P, Marcié S, Lagrange JL, Milano G. Sequence-dependent effects of ZD1839 ('Iressa') in combination with cytotoxic treatment in human head and neck cancer. *Br J Cancer* 2002;86(5):819-27.
31. Prewett MC, Hooper AT, Bassi R, Ellis LM, Waksal HW, Hicklin DJ. Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 2002;8(5):994-1003.
32. Bruns CJ, Harbison MT, Davis DW, Portera CA, Tsan R, McConkey DJ, Evans DB, Abbruzzese JL, Hicklin DJ, Radinsky R. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin Cancer Res* 2000;6(5):1936-48.
33. Han SW, Kim TY, Hwang PG, Jeong S, Kim J, Choi IS, Oh DY, Kim JH, Kim DW, Chung DH, Im SA, Kim YT, Lee JS, Heo DS, Bang YJ, Kim NK. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Clin Oncol* 2005;23(11):2493-501.
34. Buter J, Giaccone G. EGFR inhibitors in lung cancer. *Oncology (Williston Park)* 2005;19(13):1707-11; discussion 1711-2, 1720-3.
35. Folprecht G, Lutz MP, Schoffski P, Seufferlein T, Nolting A, Pollert P, Kohne CH. Cetuximab and irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid is a safe combination for the first-line

treatment of patients with epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal carcinoma. Ann Oncol 2006;17(3):450-6.

36. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Yousoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, And KK. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006;354(6):567-78.

37. Bourhis J, Rivera F, Mesia R, Awada A, Geoffrois L, Borel C, Humblet Y, Lopez-Pousa A, Hitt R, Vega ME, Duck L, Rosine D, Amellal N, Schueler A, Harstrick A. Phase I/II study of cetuximab in combination with cisplatin or carboplatin and fluorouracil in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2006;24(18):2866-2872.

38. Amler LC, Agus DB, LeDuc C, Sapinoso ML, Fox WD, Lee D, Wang V, Leysens M, Higgins B, Martin J, Gerald W, Dracopoli N, Cordon-Cardo C, Scher HI, Hampton GM. Dysregulated expression of androgen-responsive and nonresponsive genes in the androgen-independent prostate cancer xenograft model CWR22-R1. *Cancer Res* 2000;60:6134-41

39. Di Lorenzo G, Tortora G, D'Armiento FP, De Rosa G, Staibano S, Autorino R, D'Armiento M, De Laurentiis M, De Placido S, Catalano G, Bianco AR, Ciardiello F. Expression of epidermal growth factor receptor is correlated with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:3438-44.

40. Schlomm T, Kirstein P, Iwers L, Daniel B, Steuber T, Walz J, Chun FH, Haese A, Kollermann J, Graefen M, Huland H, Sauter G, Simon R, Erbersdobler A. Clinical Significance of Epidermal Growth Factor Receptor protein overexpression and gene copy number gains in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:6579-84.

41. Zhau HE, Wan DS, Zhou J, Miller GJ, Von Eschenbach AC. Expression of c-erbB2/neu protooncogene in human prostatic cancer tissues and cell line. *Mol Carcinol* 1992;5:320-7.
42. Cho KS, Lee JS, Cho NH, Park K, Ham WS, Choi YD; Gene amplification and mutation analysis of Epidermal Growth Factor Receptor in hormone refractory prostate cancer. *The Prostate* 2008;68:803-8.
43. Hammarsten P, Halin S, Wikstöm P, Henriksson R, Haggstrom Rudolfsson S, Bergh A. Inhibitory effects of castration in an orthotopic model of androgen-independent prostate cancer can be mimicked and enhanced by angiogenesis inhibition. *Clin Cancer Res* 2006;12(24):7431-6.
44. Guérin O, Formento P, Lo Nigro C, Hofman P, Fischel JL, Etienne-Grimaldi MC, Merlano M, Ferrero JM, Milano G. Supra-additive antitumor effects of sunitinib malate combined with docetaxel. A new therapeutic perspective in hormone refractory prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:51-7.
45. Kelly MP, Lee ST, Lee FT, Smyth FE, Davis ID, Brechbiel MW, Scott AM. Therapeutic efficacy of ¹⁷⁷Lu-CHX-A-DTPA-hu3S193 radioimmunotherapy in prostate cancer is enhanced by EGFR inhibition or docetaxel chemotherapy. *The Prostate* 2009; 69: 926104.
46. Agus DB, Sweeny CJ, Morris MJ, Mendelson DS, McNeel DG, Ahmann FR, Wang J, Derynck MK, Ng K, Lyons B, Allison DE, Kattan MW, Scher HI. Efficacy and safety of single-agent Pertuzumab, a human epidermal growth factor receptor dimerization inhibitor, in castration-resistant prostate cancer after progression from taxane-based therapy. *J Clin Oncol* 2007;25:675-81.
47. Gravis G, Bladou F, Salem N, Gonçalves A, Esterni B, Walz J, Bagattini S, Marcy M, Brunelle S, Viens P. Results from a monocentric phase II trial of erlotinib in patients with metastatic prostate cancer. *Ann Oncol* 2008;19:1624-8.

48. Canil CM, Moore MJ, Winquist E, Baetz T, Pollak M, Chi KN. Randomized phase II study of two doses of gefitinib in hormone-refractory prostate cancer: a trial of the National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2005;23:455-60.
49. She QB, Solit D, Basso A, et al. Resistance to gefitinib in PTEN-null HER-overexpressing tumor cells can be overcome through restoration of PTEN function or pharmacologic modulation of constitutive PI3K/Akt pathway signaling. *Clin Cancer Res* 2003;9:4340-6.
50. Chiorean EG, Porter JM, Foster AE, Al Omari AS, Yoder CA, Fife KL, Strother RM, Murry DJ, Yu M, Jones DR, Sweeny CJ. A phase I and pharmacokinetic trial of erlotinib in combination with weekly docetaxel in patients with taxane-naïve malignancies. *Clin Cancer Res* 2008;14:1131-7.
51. Gross M, Higano C, Pantuck A, Castellanos O, Green E, Nguyen K, Agus AB. A phase II trial of docetaxel and erlotinib as first-line therapy for elderly patients with androgen-independent prostate cancer. *BMC Cancer* 2007;7:142-8.
52. Horti J, Widmark A, Stenzi A, Federico MH, Abratt RP, Sanders N, Pover GM, Bodrogi I. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study of vandetanib plus docetaxel/prednisolone in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2009;24:175-80.
53. Droz JP, Balducci L, Bolla M, Emberton M, Fitzpatrick JM, Joniau S, Kattan MW, Monfardini S, Moul JW, Naeim A, Van Poppel H, Saad F, Sternberg CN. Background for the proposal of SIOG guidelines for the management of prostate cancer in senior adults. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010;73:68-91.

Supra-additive antitumor effect of sunitinib malate (SU11248, Sutent®) combined with docetaxel. A new therapeutic perspective in hormone refractory prostate cancer

O. Guérin · P. Formento · C. Lo Nigro · P. Hofman ·
 J. L. Fischel · M. C. Etienne-Grimaldi · M. Merlano ·
 J. M. Ferrero · G. Milano

Received: 27 March 2007 / Accepted: 29 May 2007 / Published online: 26 June 2007
 © Springer-Verlag 2007

Abstract

Purpose Physiological and molecular findings indicate over-expression of HER proteins and dysregulation of neo-angiogenesis during progression of advanced prostate cancer. The aim of this study was to test a novel rational therapeutic approach by combining docetaxel with an EGFR-targeting agent (cetuximab) and with an anti-angiogenic agent (sunitinib, SUTENT®).

Methods Mice bearing well-established PC3 prostate tumors (mean tumor volume/treatment group ~250 mm³) were treated every week with vehicle alone (controls), sunitinib (40 mg/kg/day, 5 days/week for 3 weeks, 0.2 ml p.o.), cetuximab (0.2 mg/kg/day, 5 days/week for 3 weeks, 0.2 ml i.p.) and docetaxel (10 mg/kg, 1 day/week for 3 weeks, 0.2 ml i.p.).

Results Each drug, administered as a single-agent, demonstrated comparable and moderate effects on tumor growth with approximately 50 % inhibition at the end of the 3-week dosing schedule. Computed combination ratio (CR) values for tumor growth determined on days 61, 68 and 75 after cell implantation indicated supra-additive effects for the sunitinib-docetaxel (1.53, 1.15 and 1.47, respectively) and sunitinib-cetuximab combinations (1.2, 1.32 and 1.14,

respectively), and suggested additive effects only for the sunitinib-cetuximab-docetaxel combination (CR = 1). The effects on tumor growth were accompanied by a parallel diminution in tumor cell proliferation (Ki 67) and tumor vascularization (von Willebrandt factor). There were significantly higher pro-apoptotic effects (caspase-3 cleavage) observed for the sunitinib-docetaxel and sunitinib-docetaxel-cetuximab as compared to the other conditions.

Conclusion The supra-additive anti-tumor effect observed with the sunitinib-docetaxel combination might support innovative strategies in the management of advanced prostate cancer.

Keywords Prostate cancer · Cetuximab · Sunitinib · Docetaxel · Drug combinations · Animal model

Introduction

Numerous studies are under way to assess the role of chemotherapy for patients at various stages of prostate cancer (Canil and Tannock 2004). One of the current treatments of reference in hormone-refractory prostate cancer consists in chemotherapy with docetaxel (taxotere) combined with prednisone (Khan et al. 2003). A recent controlled study by Tannock et al. (2004) enhanced the importance of administering docetaxel in prostate cancer by showing that, as compared with patients treated by mitoxantrone, those receiving docetaxel had a 0.76 ($P = 0.009$) of hazard ratio for death. Future strategies aimed at improving management of advanced prostate cancer should examine the benefits of adding other agents to docetaxel.

Numerous molecular mechanisms are linked to the transition to hormone-refractory prostate cancer (Amler et al. 2000). The increased expression of HER signaling family of

O. Guérin · P. Hofman
 Nice General Hospital, Nice, France

P. Formento · J. L. Fischel · M. C. Etienne-Grimaldi ·
 J. M. Ferrero · G. Milano (✉)
 Oncopharmacology Unit, Centre Antoine Lacassagne,
 33, Avenue de Valombrose, 06189 Nice Cedex 2, France
 e-mail: gerard.milano@nice.fnclcc.fr

C. Lo Nigro · M. Merlano
 Laboratorio Oncologia Translazionale,
 ASO S. Croce e Carle, Cuneo, Italy

proteins seems to be one important factor (Craft et al. 1999; Di Lorenzo et al. 2002). We recently examined the growth inhibitory effects of the anti-EGFR drug erlotinib, docetaxel, and 5'DFUR (the main intermediary metabolite of capecitabine) in combination, on the androgen receptor-negative human prostate cancer cell lines PC3 and DU145 (Fischel et al. 2006). Marked synergistic cytotoxic effects were observed following the application of the double combination of erlotinib-5'DFUR for both cell lines and to a lesser extent with the triple combination. For PC3 cells all conditions resulted in synergistic interaction (Fischel et al. 2006).

Physiological and molecular evidence support a role for neo-angiogenesis during progression of advanced prostate cancer (Strohmeier et al. 2004; Aalink et al. 2004). Sunitinib malate (SU11248; SUTENT®) is an oral, multi-targeted tyrosine kinase inhibitor that selectively and potently inhibits class III and V split kinase domain receptor tyrosine kinases, including: vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR-1, -2 and -3), platelet-derived growth factor receptors (PDGFR- α and - β), stem cell factor receptor (KIT), FMS-like tyrosine kinase-3 receptor (FLT3), and glial cell-line derived neurotrophic factor receptor (rearranged during transfection; RET) (Abrams et al. 2003; O'Farrell et al. 2003a, b; Mendel et al. 2003). Sunitinib has demonstrated antiangiogenic and anti-tumor activities in various solid tumor xenograft models, including colon, renal, breast and lung cancers. In addition, sunitinib recently received approval from the US FDA and European Agency for the treatment of advanced renal cell carcinoma and for the treatment of gastrointestinal stromal tumors after disease progression or intolerance to imatinib mesylate therapy (SUTENT 2006). The aim of this study was to explore a rational therapeutic approach by combining docetaxel with an EGFR-targeting agent and with an anti-angiogenic agent. We thus evaluated the anti-tumor and molecular effects of sunitinib in combination with the anti-EGFR agent cetuximab and docetaxel in immunodeficient mice with PC3 androgen-independent prostate cancer growing as a xenograft.

Material and methods

Chemicals

Sunitinib was kindly provided by Pfizer. Docetaxel and cetuximab were marketed drugs and were provided by our institution pharmacy. Working solutions were prepared extemporaneously as follows: cetuximab (0.03 g/l) and docetaxel (1.5 g/l) were diluted in 0.9% NaCl and sunitinib (6 g/l) suspended in citrate buffer pH 3.5 according to manufacturer's indications. For all drugs the concentrations were adjusted to include the daily dose in 0.2 ml of drug

solution/suspension. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin, streptomycin and glutamine were purchased from Whittaker (Verviers, Belgium). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Dutscher (Brumath, France).

Cell lines

PC3, a human androgen-independent cancer cell line, was obtained from the CNRS UMR 6543–Nice.

The cell line was maintained as mono-layer cultures in DMEM supplemented with 10% FBS v/v, 2 mM glutamic acid, 50,000 units/l penicillin and 80 μ M streptomycin in a humidified incubator (Sanyo, Japan) at 37°C in an atmosphere containing 8% CO₂. Batches of 15×10^6 cells were frozen in FBS supplemented with 5% DMSO v/v in advance for injection into mice. Shortly before injection, cells were thawed and suspended in Ringer lactate.

Mice

Animal experiments were performed in accordance with the "Principles of laboratory animal care" (NIH publication no. 85–23, revised 1985) and the US Animal Welfare Act as amended, as well as with the regulations of the institutional ethic commission. Six-week-old male NMRI nude mice were purchased from Janvier laboratories (Le Genet sur Isle, France) and were given s.c. inoculation in the right flank of 3×10^6 cells dissolved in 100 μ l of Ringer lactate (ten animals per treatment condition).

Tumors

Tumor length and width were measured weekly using a caliper. Tumor volume was calculated as $\pi/6 \times \text{length} \times \text{width}^2$ until animal sacrifice. At that time, animals were killed by spinal cord dislocation and tumors were subsequently removed surgically; half of the tumor was directly frozen in liquid nitrogen for protein analysis and the other half fixed in para-formaldehyde overnight for immunohistochemistry analyses.

Treatments

Mice bearing well-established PC3 tumors (mean tumor volume/treatment group $\sim 250 \text{ mm}^3$) were treated every week with vehicle alone (controls), sunitinib (40 mg/kg/day, 5 days/week during 3 weeks, 0.2 ml p.o.), cetuximab (0.2 mg/kg/day, 5 days/week during 3 weeks, 0.2 ml i.p.) and docetaxel (10 mg/kg, 1 day/week during 3 weeks, 0.2 ml i.p.). The doses of cetuximab, docetaxel and sunitinib were chosen according to preliminary experiments to ensure that each drug given alone exerts moderate effects on tumor growth.

Interaction between sunitinib and cetuximab, docetaxel or their combination was evaluated for tumor-growth inhibition.

The effects of the treatments were examined as previously described by Prewett et al. (2002). The effect on tumor growth was measured by taking the mean tumor volume on different given days for the different treatment groups: controls, treatment a, treatment b and treatment a + b. Fractional tumor volume (FTV) for each treatment group was calculated as the ratio between the mean tumor volumes of treated and untreated tumors. This was done for treatment a (FTVa), for treatment b (FTVb) and for treatment a + b (FTV a + b). The expected FTV for the « a + b » combination was defined as $FTVa \times FTVb$. The ratio $FTV_{a+b-expected} / FTV_{a+b-observed}$ was defined as the combination ratio (CR). With the three drug abc combination, CR was defined alike with expected FTV (a + b + c) being $FTVa \times FTVb \times FTVc$ and CR being the ratio expected FTV (a + b + c)/observed FTV (a + b + c). If $CR > 1$, there are supra-additive effects and if $CR < 1$ infra-additive ones. Strictly additive effects are observed if $CR = 1$.

Preparation of samples and analysis of cellular factors

Tumors were collected at the end of the observation period on day 84 when mean tumor volume of the controls reached 2,500 mm³ (dictated by ethical reasons).

Frozen tumors were pulverized in a liquid nitrogen-cooled Thermovac pulverizer. The resulting powders were homogenized in 10 vol. of a 10-mM Tris-HCl buffer pH 7.4, containing 1 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol and 10 mM sodium molybdate. The homogenates were centrifuged for 1 h at 105,000g (+4°C) and the supernatants (cytosols) were used for protein determination by immunoblotting. Total protein content was measured using the bicinchoninic acid assay.

The effects of each single drug and their combination were examined for the impact on tumor growth and tumor angiogenesis [von Willebrandt Factor (vWF)] and on molecular factors representative of EGFR signaling (phospho-ERK, 1/2), of apoptosis (caspase 3), and of proliferation (Ki67).

The micro-vessel marker vWF and the proliferation marker Ki67 expressions were determined in micro-tissue-arrays by immunohistochemistry using DAKO polyclonal antibody ref: A0082 for vWF and DAKO monoclonal antibody JC70A ref: M0823 for Ki67. The final score was the result of the examination of three fields per tumor, and between four and eight tumors were investigated. Labeling intensities were scored as 1 = slight, 2 = medium and 3 = strong.

The apoptosis-related marker caspase 3 was determined by Western blot using mouse monoclonal antibody CAS-PASE3/CCP32 from BD transduction laboratory.

The effects on vWF and Ki67 were evaluated using the non-parametric ANOVA (Kruskal–Wallis test). The differences between treatment groups for molecular factors (phospho-ERK, caspase 3 cleavage) were examined using the Mann–Whitney test.

Measurement of gene expression levels (PDGFR β , KDR, EGFR, ABCB1)

The experiments were performed on PC3 growing in vitro (3 days after plating 4×10^5 cells in 25 cm² flask, drugs were added for 24 h before RNA isolation) at a sunitinib concentration of 50 nM, which is in the range of the sunitinib IC50s for the inhibition of proliferation for PDGFR α (40 nM) and PDGFR β (70 nM) or necessary to induce apoptosis (100 nM). The docetaxel concentration (100 nM) was in the range of the mean concentration for patients receiving docetaxel at 175 mg/m². Individual drug concentrations were the same in the single drug and combination studies.

Total RNA was isolated using the Quiagen RNA isolation kit (Quiagen, Courtaboeuf, France) and the two-step GeneAmp RT-PCR kit (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France) was used for RT-PCR, in accordance with the manufacturer's protocol. For real-time RT-PCR, triplicates of 25 μ l PCR reactions were performed on 2 μ l of cDNA obtained by retro-transcription of 2 μ g of RNA in a 100- μ l reaction. Amplification and analysis were performed, following the manufacturer's instructions, using the ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and the following assay on demand (Applied Biosystems, <https://products.appliedbiosystems.com/>): ABCB1 (MDR1), EGFR (ERB1), VEGFR2 (KDR), PDGFR β and Kit. Data were analyzed using the comparative Ct (Cycle threshold) method and were normalized to the Eukaryotic 18S rRNA as endogenous control. Gene expression was not considered to have been modified (under- or over-expressed, respectively) for values within the 0.5–2.0 range. Experiments were done in triplicate.

Results

Effects of sunitinib, cetuximab and docetaxel on tumor growth

Each drug, administered as a single-agent, demonstrated comparable and moderate effects on tumor growth with 64, 50 and 41% inhibition at the end of drug exposure for cetuximab, sunitinib and docetaxel, respectively. However, this was followed by rapid parallel re-growth with no statistically significant difference between control and treated tumor volumes at the end of the observation period (day 84), 30 days after the end of drug exposure (Fig. 1a).

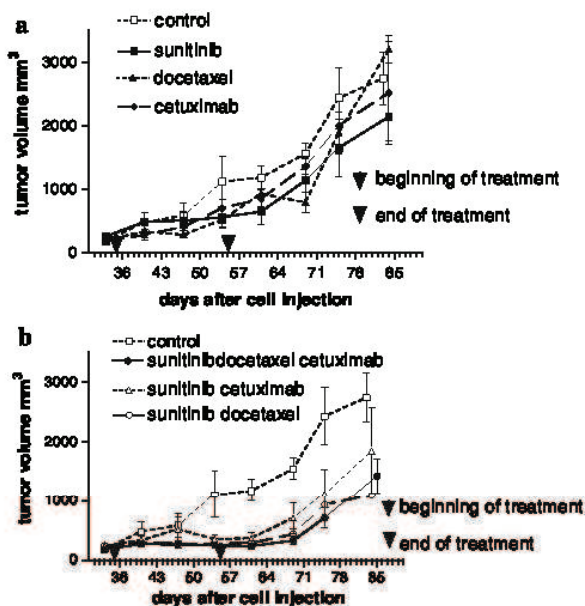


Fig. 1 a Growth inhibitory effects of sunitinib, cetuximab and docetaxel given alone on tumor. *Bars* = SD. b Growth inhibitory effects of sunitinib–docetaxel, sunitinib–cetuximab and sunitinib–docetaxel–cetuximab combinations on tumor. *Bars* = SD

Combinations of sunitinib–docetaxel, sunitinib–cetuximab and sunitinib–docetaxel–cetuximab (Fig. 1b) produced strong tumor growth inhibition after 1 week of treatment, which continued for 6–12 days after discontinuation of treatment ($P = 0.03$, $P = 0.05$ and $P = 0.005$ vs. control, respectively, at day 75) followed by tumor re-growth. However, in contrast with the effects of single drugs, the differences in tumor growth between control and sunitinib–docetaxel and sunitinib–docetaxel–cetuximab treated tumors were still statistically significant at the end of the observation period ($P = 0.0096$ and $P = 0.0258$ vs. control, respectively, at day 84).

The greatest reduction in tumor volume was observed in mice that had received combined sunitinib–docetaxel or sunitinib–cetuximab–docetaxel treatments.

Computed CR values determined on days 61, 68 and 75 after cell implantation indicate supra-additive effects for sunitinib–docetaxel (1.53, 1.15 and 1.47, respectively) and sunitinib–cetuximab combinations (1.2, 1.32 and 1.14, respectively), and suggest additive effects only for the sunitinib–cetuximab–docetaxel combination (CR = 1).

Stable mean mouse weight suggested that no drug-induced toxicity was evident (Fig. 2).

Molecular parameters

Evaluation of Ki67 and vWF expression (Figs. 3, 4, respectively) indicated that the differences in tumor growth

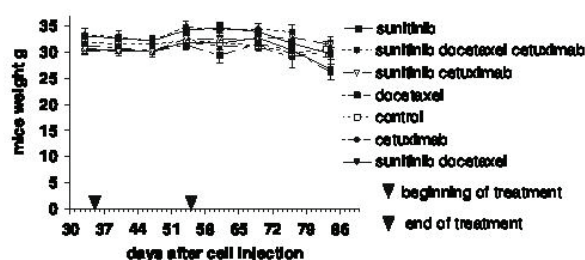


Fig. 2 Evolution of the mean mice weight for different treatment groups during the observation period. *Bars* = SD

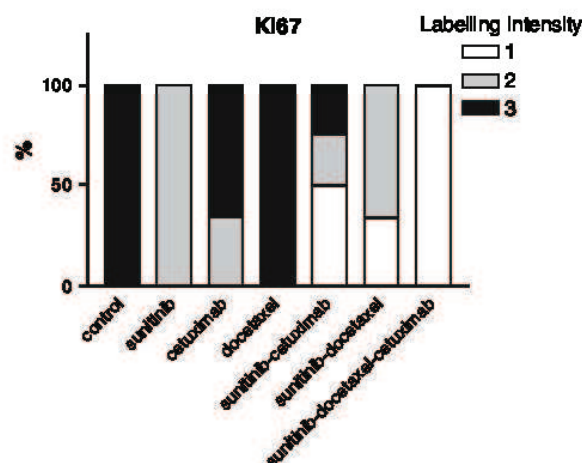


Fig. 3 Effect of the different treatments on the proliferation-related marker Ki67. The final score was the result of the examination of three fields per tumor, and between four and eight tumors were investigated. Labeling intensities are shown as 1 = slight, 2 = medium and 3 = strong, with the sum of all values in one histogram being 100%. Scoring was performed at the end of experiments on day 84

between the tested experimental conditions were accompanied by a parallel diminution in both tumor cell proliferation and vascularization, respectively. It is noteworthy that, for these two parameters, the greatest reduction was demonstrated by the sunitinib–cetuximab–docetaxel triple-combination therapy.

There was no difference observed between single drug effects and control for the induction of apoptosis (caspase 3 cleavage, Fig. 5) in PC3 tumors. Likewise, the combination of sunitinib and cetuximab did not significantly modulate the cleaved caspase 3/caspase 3 ratio. In contrast, there were significantly more pro-apoptotic effects for the sunitinib–docetaxel containing combinations (i.e., sunitinib–docetaxel plus sunitinib–docetaxel–cetuximab) as compared to all other pooled conditions ($P = 0.0395$).

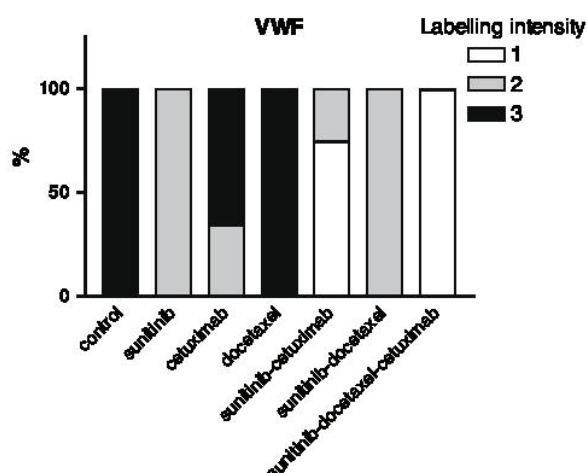


Fig. 4 Effect of the different treatments on the endothelial cell marker vWF. The final score was the result of the examination of three fields per tumor, and between four and eight tumors were investigated. Labeling intensities are shown as 1 = slight, 2 = medium, 3 = strong, with the sum of all values in one histogram being 100%. Scoring was performed at the end of experiments on day 84

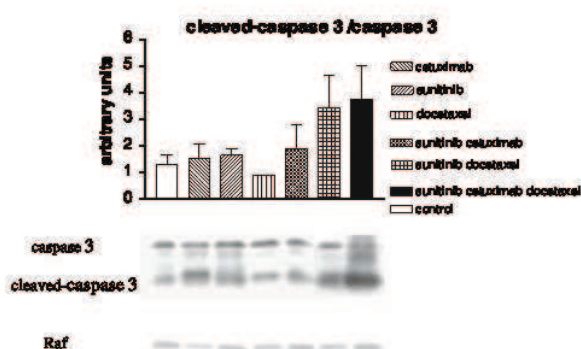


Fig. 5 Effect of the different treatments on the apoptosis-related marker cleaved-caspase 3/caspase 3 ratio in PC-3 tumor xenografts. Western blot is a representative example of one of at least three experiments. Bars = SD

Effects of drugs on the expression of targets and modulators on PC3 cells growing in vitro

For both KDR and PDGFR (targets of sunitinib), there was no clear effect of 100 nM docetaxel on gene expression (c-KIT was not found to be expressed in PC3 cells). There was also no significant impact of sunitinib on MDR-1 (ABCB1) expression (potential modulator of docetaxel activity). Of note, when examining the docetaxel–sunitinib association, there were changes in EGFR and ABCB1 gene expression levels with a moderate increase for EGFR and a more marked one for ABCB1 (Table 1).

Table 1 Changes in gene expression in PC3 growing in vitro in the presence of single drugs and docetaxel–sunitinib combination

	Docetaxel 100 nM	Sunitinib 50 nM	Combination	Statistical analysis
PDGFR β	1.2 $\pm$ 0.2	1 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.2	ns
EGFR	0.8 $\pm$ 0.25	0.8 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 2	ns
KDR	0.5 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 0.7	$P = 0.088$
ABCB1 (MDR-1)	0.7 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.3	10.8 $\pm$ 8.8	$P = 0.08$

Values have been normalized, with 1 being the gene expression level for the control without drugs

ANOVA for the statistical analysis comparing the three conditions

Discussion

The introduction of docetaxel into clinical practice has opened up a new era of improvement in the management of advanced hormone-refractory prostate cancer (Tannock et al. 2004; Petrylak 2005; Engels et al. 2005). Febbo et al. (2005) have recently reported on neo-adjuvant use of docetaxel before radical prostatectomy in prostate cancer patients with high-risk localized lesions. They observed that the treatment was well tolerated and often resulted in a PSA decline of more than 50% concomitant with significant tumor volume reduction (Febbo et al. 2005). As recently outlined by Engels et al. (2005), current research into docetaxel-based chemotherapy should include drug combinations in order to combine improved outcome with acceptable feasibility.

Membrane receptors of the HER family are associated with the hormone-independence of prostate cancer (Craft et al. 1999). A recent experimental study by Festuccia et al. (2005) suggested that blockade of the EGFR pathway itself can attenuate the invasive potential of PCa cells. Clinical results arising from phase I studies targeting EGFR in advanced prostate cancer were encouraging (Lorusso 2003). However, a recent phase II study of the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib, showed relatively disappointing clinical results as single agent therapy (Canil et al. 2005). Significant therapeutic results in experimental models of human prostate cancer in nude mice have been reported with combinations of taxanes and tyrosine kinase inhibitors directed against EGFR (Kim et al. 2003, 2004). Thus, combining taxanes and EGFR inhibitors should provide more promising clinical results than EGFR-targeting alone in advanced hormone-refractory prostate cancer. Recent experimental data support the idea that decreasing angiogenesis may be a rational therapeutic approach for treatment of hormone-resistant prostate cancer (Kim et al. 2004; Perryman et al. 2006; Su et al. 2006). This background inspired the present experimental study aimed at

examining the anti-tumor effect resulting from a triple combination of docetaxel, sunitinib and cetuximab applied to a representative hormone-refractory human prostate cancer cell line PC3 growing as a xenograft in immune-deficient mice.

One of the main results of the present study is that the greatest reduction in tumor growth was obtained with the triple association. Interestingly, stable mean weight of treated animals indicated an absence of major drug-induced toxicity. In addition, the combination of the three selected agents led to the greatest degree of induction of the apoptotic pathway (caspase 3 cleavage, Fig. 5). Immunohistochemical analyses also indicated that the triple association led to a sustained diminution of tumor proliferation (Ki67, Fig. 3) and also, interestingly, to a marked reduction of tumor endothelial cell labeling (VWF expression, Fig. 4). This means that the triple combination impacted both the tumor itself and its endothelial environment, thus probably explaining the anti-tumor effects. Others (Tonra et al. 2006) and ourselves (Bozec et al. 2006), have recently published on the anti-tumor synergistic effects observed when combining EGFR-targeting with anti-angiogenic treatments. The present study confirms these data with a supra-additive anti-tumor effect resulting from the sunitinib–cetuximab combination compared with either single agent alone. Of note, the present data indicate that the major component contributing to the anti-tumor efficacy of the triple combination results mainly from the association between the anti-angiogenic agent sunitinib and the cytotoxic drug docetaxel. This conclusion is supported by the tumor growth curves (Fig. 1b) in which the inhibitory effects on tumor growth produced by docetaxel–sunitinib are very similar to those resulting from the triple association. This observation is corroborated by CR calculations with the value of 1.0 for the triplet combination indicating additivity and value above 1.0 for the docetaxel–sunitinib doublet combination indicating supra-additivity. In addition, the molecular impact of the triple association was very close to that already obtained with the docetaxel–sunitinib combination, as seen with caspase 3 cleavage, Ki67 expression and anti-angiogenic effects through vWF labeling. The present results with this dual combination of sunitinib and docetaxel concur well with the recent data reported by Kim et al. (2006). These authors applied imatinib, a PDGFR inhibitor, combined with paclitaxel to multidrug-resistant human PC3 cells implanted in immunodeficient mice (bone metastasis model). They found that the combined treatment had a major impact on tumor-associated endothelial cells. In addition, it has recently been reported that a combined regimen of sunitinib with the cytotoxic drug cyclophosphamide led to substantive reductions in tumor xenografts (Pietras and Hanahan 2005). Our data concur well with the latter data. It is now clinically established that anti-angiogenic

treatments could be favorably combined with chemotherapeutic drugs, as shown for the avastin–fluorouracil–irinotecan association in advanced colorectal cancer (Hurwitz et al. 2004). A synergistic interaction between an anti-angiogenic agent and a chemotherapeutic agent is somewhat counterintuitive since the inhibition of tumor angiogenesis may decrease delivery of drugs and, therefore, antagonize chemotherapy. The notion of transient “normalization” of the abnormal structure and function of tumor vasculature by anti-angiogenic agents is one of the hypotheses, which reconcile the theoretical view and the reality of the results when combining anti-angiogenic agents and chemotherapeutic drugs (Jain 2001). It was not in the scope of the present study to examine this hypothesis. The possible impacts of single drugs on the molecular determinants of the associated drug were examined. Docetaxel had no effect on either KDR or PDGFR- β expression. As sunitinib did not modify the expression of MDR-1 (ABCB1), a gene, which can modulate the activity of docetaxel, the supra-additive interaction between sunitinib and docetaxel, could not be explained by a modulation of MDR-1. On the contrary there was a tendency for an increase in MDR-1 expression under the presence of the two drugs. This finding could be more deeply explored in the perspective of a repeated treatment with successive docetaxel–sunitinib sequences. Also, the association docetaxel–sunitinib increased EGFR expression, a molecular event, which could be in favor of the association with cetuximab. This latter observation could argue in favor of an application of cetuximab following the docetaxel–sunitinib exposure.

Summing up, the supra-additive anti-tumor effect observed with the combination of sunitinib–docetaxel might support innovative strategies for the management of advanced prostate cancer.

Acknowledgment PFIZER France is acknowledged for the financial support of this work.

References

- Aalinkkeel R, Nair MP, Sufrin G, et al (2004) Gene expression of angiogenic factors correlates with metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer Res* 64:5311–5321
- Abrams TJ, Lee LB, Murray LJ, Pryer NK, Cherrington JM (2003) SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther* 2:471–478
- Amler LC, Agus DB, LeDuc C, et al (2000) Dysregulated expression of androgen-responsive and nonresponsive genes in the androgen-independent prostate cancer xenograft model CWR22-R1. *Cancer Res* 60:6134–6141
- Bozec A, Lassalle S, Gugenheim J, et al (2006) Enhanced tumour antiangiogenic effects when combining gefitinib with the antivascular agent ZD6126. *Br J Cancer* 95:722–728
- Camil CM, Tannock IF (2004) Is there a role for chemotherapy in prostate cancer? *Br J Cancer* 91:1005–1011

- Canil CM, Moore MJ, Winquist E, et al (2005) Randomized phase II study of two doses of gefitinib in hormone-refractory prostate cancer: a trial of the National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 23:455–460
- Craft N, Shostak Y, Carey M, Sawyers CL (1999) A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat Med* 5:280–285
- Di Lorenzo G, Tortora G, D'Armiento FP, et al (2002) Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 8:3438–3444
- Engels FK, Sparreboom A, Mathot RA, Verweij J (2005) Potential for improvement of docetaxel-based chemotherapy: a pharmacological review. *Br J Cancer* 93:173–177
- Febbo PG, Richie JP, George DJ, et al (2005) Neoadjuvant docetaxel before radical prostatectomy in patients with high-risk localized prostate cancer. *Clin Cancer Res* 11:5233–5240
- Festuccia C, Angelucci A, Gravina GL, et al (2005) Epidermal growth factor modulates prostate cancer cell invasiveness regulating urokinase-type plasminogen activator activity. EGF-receptor inhibition may prevent tumor cell dissemination. *Thromb Haemost* 93:964–975
- Fischel JL, Ciccolini J, Formento P, Ferrero JM, Milano G (2006) Synergistic cytotoxic interaction in hormone refractory prostate cancer with the triple combination docetaxel-erlotinib and 5'DFUR. Experimental data. *AntiCancer Drugs* 17:807–813
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350:2335–2342
- Jain RK (2001) Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 7:987–989
- Khan MA, Carducci MA, Partin AW (2003) The evolving role of docetaxel in the management of androgen-independent prostate cancer. *J Urol* 170:1709–1716
- Kim SJ, Uehara H, Karashima T, Shepherd DL, Killion JJ, Fidler IJ (2003) Blockade of epidermal growth factor receptor signaling in tumor cells and tumor-associated endothelial cells for therapy of androgen-independent human prostate cancer growing in the bone of nude mice. *Clin Cancer Res* 9:1200–1210
- Kim SJ, Uehara H, Yazici S, et al (2004) Simultaneous blockade of platelet-derived growth factor-receptor and epidermal growth factor-receptor signaling and systemic administration of paclitaxel as therapy for human prostate cancer metastasis in bone of nude mice. *Cancer Res* 64:4201–4208
- Kim SJ, Uehara H, Yazici S, et al (2006) Targeting platelet-derived growth factor receptor on endothelial cells of multidrug-resistant prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 98:783–793
- Lorusso PM (2003) Phase I studies of ZD1839 in patients with common solid tumors. *Semin Oncol* 30:21–29
- Mendel DB, Laird AD, Xin X, et al (2003) In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 9:327–337
- O'Farrell AM, Abrams TJ, Yuen HA, et al (2003a) SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood* 101:3597–3605
- O'Farrell AM, Foran JM, Fiedler W, et al (2003b) An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* 9:5465–5476
- Perryman LA, Blair JM, Kingsley EA, et al (2006) Over-expression of p53 mutants in LNCaP cells alters tumor growth and angiogenesis in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 345:1207–1214
- Petrylak DP (2005) Future directions in the treatment of androgen-independent prostate cancer. *Urology* 65:8–12
- Pietras K, Hanahan D (2005) A multitargeted, metronomic, and maximum-tolerated dose “chemo-switch” regimen is antiangiogenic, producing objective responses and survival benefit in a mouse model of cancer. *J Clin Oncol* 23:939–952
- Prewett MC, Hooper AT, Bassi R, et al (2002) Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 8:994–1003
- Strohmeier D, Strauss F, Rossing C, et al (2004) Expression of bFGF, VEGF and c-met and their correlation with microvessel density and progression in prostate carcinoma. *Anticancer Res* 24:1797–1804
- Su B, Zheng Q, Vaughan MM, Bu Y, Gelman IH (2006) SSeCKS metastasis-suppressing activity in MatLyLu prostate cancer cells correlates with vascular endothelial growth factor inhibition. *Cancer Res* 66:5599–5607
- SUTENT (sunitinib malate) (2006) Prescribing information. Pfizer Inc, New York
- Tamock IF, de Wit R, Berry WR, et al (2004) Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 351:1502–1512
- Torra JR, Deevi DS, Corcoran E, et al (2006) Synergistic antitumor effects of combined epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor-2 targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12:2197–207

Annexe 3

The multi-targeted tyrosine kinase inhibitor Vandetanib in the treatment of hormone refractory prostate cancer: comparison of its effects in association with docetaxel on docetaxel-sensitive and docetaxel-resistant tumor cell lines. A preclinical in vivo study.

Olivier Guérin¹, Martino Monteverde², Anne Sudaka³, Patricia Formento⁴, Marie-Christine Etienne⁴, Cristiana Lo Nigro², L Lattanzio², Monica Maffi², F Tonissi², Jean-louis Fischel^{4,5}, Marco Merlano² and Gérard Milano⁴.

1) Nice General Hospital Nice France

2) Laboratorio Oncologia Traslazionale, Oncology Dept, ASO S.Croce e Carle, Cuneo Italy

3) Pathology Laboratory, Centre Antoine Lacassagne, Nice France.

4) Oncopharmacology Laboratory, Centre Antoine Lacassagne, Nice France.

5) To whom requests for reprints should be addressed :

Oncopharmacology Unit

Centre Antoine Lacassagne

33, Avenue de Valombrose

06189 Nice Cedex 2, France

Phone: 33.(4).92.03.15.52

Fax: 33.(4).93.81.71.31

E-mail : jean-louis.fischel@cal.nice.fnclcc.fr

Key words : prostate cancer, docetaxel, vandetanib, drug combinations, animal model.

ABSTRACT

Purpose : *Overexpression of EGFR and dysregulation of neoangiogenesis appeared during progression of advanced prostate cancer. Docetaxel remains the treatment of choice but most tumors relapse after an initial answer. The aim of this study was to test a novel therapeutic approach by combining docetaxel with vandetanib a dual EGFR and VEGFR targeting agent.*

Methods : *Mice bearing docetaxel-sensitive-or-resistant PC3 (Wt-or-R) prostatic tumors, were treated for three weeks, with vehicle alone (controls), vandetanib alone (25 or 50 mg/kg/day, 5 days a week, 0.2ml p.o.), docetaxel alone (10 or 30 mg/kg/day, 1 day a week, 0.2ml i.p.) and the combinations of either the lowest or highest concentrations of each drug.*

Results : *The effects of docetaxel are shorter lasting on PC3R than on PC3Wt. Vandetanib had growth-stimulating effects at the smallest concentration on PC3Wt and growth-inhibiting effects on PC3R. The low and high concentrations combinations were not superior to docetaxel alone for PC3Wt and had additive effects on PC3R. Proliferation, higher in PC3R than in PC3Wt, was diminished by vandetanib in PC3R only. EGFR was highly overexpressed in PC3R as well as VEGF secretion which was enhanced by vandetanib and diminished by docetaxel in both cell lines with drug combinations exhibiting a clear effect on tumor vasculature.*

MDR1 was expressed in PC3R only, but was neither modulated nor its action inhibited, by vandetanib in vitro.

Conclusion : *Use of the sole vandetanib for treating hormone-resistant prostatic cancer could then be a rational choice only after relapse under docetaxel.*

INTRODUCTION

Prostate cancer remains one of the leading causes of cancer-related deaths in the USA and Europe (Weir et al, 2003). It has very recently been chosen by the French National Cancer Institute (INCA) as the target of an integrated research program (PAIR). The progression of prostate cancer to androgen-independence which happens after a median of 18-36 months (Figg et al, 1997; Sharifi et al, 2005) has been shown to be linked with the tumoral overexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR) (Di Lorenzo et al, 2002). Docetaxel-containing chemotherapy prolongs survival for men with metastatic androgen-independent prostate cancer (mAIPC) and has become the standard treatment in this setting (Petrylak et al, 2004; Tannock et al, 2004) with a median survival of 18.9 months when combined to prednisone versus 16.5 months for mitroxantrone combined with prednisone and this action has been explained, at least partly, very recently (Gan et al. 2009) as taxanes could inhibit the signalling of androgen receptor.

Second-line chemotherapy containing satraplatin, a novel platinum analog, provided a mere additional 1.5 week progression-free survival (Sternberg et al 2005, Petrylak et al 2007).

There is clearly a need to develop new drugs that would improve survival of AIPC patients after docetaxel failure (Ohlmann and Stöckle 2009). The main angiogenesis-related growth factor, VEGF, appears to influence prostate tumor progression, mainly through its effect on microvessel density (Strohmeyer et al, 2004). In addition, gene expression of angiogenic factors correlates with metastatic potential of prostate cancer cells (Aalinkeel et al, 2004). Thus, in addition to the presence of EGFR overexpression, there are both physiological and molecular arguments supporting a role of neoangiogenesis in the progression of advanced prostate cancer. The ongoing clinical studies using angiogenesis inhibitors displayed limited, if any, improvement (mainly bevacizumab, thalidomide and its analogue lenalidomide, sorafenib and AZD2171) and have been recently reviewed (Aragon-Ching and Dahut. 2009, Shelley et al. 2009). Even worse, Ebos et al, 2009 and Paez-Ribes et al, 2009 have recently, put into evidence a possible facilitation of metastasis by antiangiogenic drugs of the TKI type such as sorafenib and sunitinib and questions about the risk/benefit ratio of using anti-angiogenic drugs began to arise (Schneider et Sledge. 2009).

Vandetanib is an oral multi-targeted tyrosine kinase inhibitor (TKI) with antitumor and antiangiogenic activities targeting VEGFR-2 (and to a lesser degree VEGFR-3), with additional activity against EGFR receptor (Wedge et al, 2002). Thus vandetanib seemed to be a good candidate for treating those tumors which overexpress its two targets. Pre-clinical data have put into evidence a markedly enhanced cytotoxic impact when vandetanib was combined with anti-androgen therapy in mice bearing androgen sensitive human prostate xenografts (Nicholson et al, 2004) and anti-tumor efficacy of vandetanib against the PC3 model of human hormone-refractory prostate cancer (Checkley et al, 2003). Moreover reversal of multidrug resistance by direct inhibition of P-glycoprotein function by vandetanib has been demonstrated (Mi and Lou 2007) and confirmed recently by others (Zheng et al, 2009) auguring well of the possibility for that drug to overcome docetaxel-induced resistance.

Nevertheless the encouraging clinical results obtained in a phase II study when adding vandetanib to docetaxel (18 months PFS for vandetanib plus docetaxel versus 12 months for docetaxel alone) in the treatment of previously platinum-treated NSCLC patients (Heymach et al, 2007) were followed by disappointing ones, with enhanced toxicity without clinical benefit, when adding vandetanib to docetaxel-plus-prednisone classical scheme for the treatment of metastatic AIPC docetaxel-naïve patients (Horti et al, 2009). In the following article we tried to explain these unexpected clinical results examining the antitumor effects of vandetanib combined with docetaxel on the hormone refractory human prostate cancer cells PC3, naturally sensitive (Wt) or made resistant (R), to docetaxel, growing as a xenograft in the nude mice model.

MATERIAL AND METHODS

Cell lines

Human androgen insensitive prostate carcinoma cell line PC3, derived from bone metastasis, was originally obtained from CNRS UMR 6543 (PC3wt). Characteristics of this cell line are extensively described (Uzgare et al. 2004): PTEN mutated, p53 mutated, pRB wild type.

Cells were made resistant to docetaxel (PC3R) by culturing them under the continuous pressure of the drug (10 nM). Resistance factor varied between 4 (“low resistance” cells) and 400 (“high resistance” cells) according to the passage, since successive passages of the cells attenuate the resistance factor (from 0 to 21 days of culture, which corresponded to passages 1 through 6).

The cell lines were maintained as mono-layer cultures in DMEM supplemented with 10% FBS v/v, 2mM glutamic acid, 50000 units/l penicillin and 80µM streptomycin in a humidified incubator (Sanyo, Japan) at 37°C in an atmosphere containing 8% CO₂. Batches of 15x10⁶

cells were frozen in FBS supplemented with 5% DMSO v/v in advance for injection into mice. Shortly before injection, cells were thawed and suspended in Ringer lactate.

In vivo experiments

Chemicals

Vandetanib was kindly provided by AstraZeneca. Docetaxel was a marketed drug and was provided by our institution pharmacy. Working solutions were prepared extemporaneously as follows: docetaxel (1.5 g l^{-1}) was diluted in 0.9% NaCl and vandetanib (7.5 g l^{-1}) was suspended in 0.9% NaCl, 0.01% Tween 80, according to manufacturer's indications. For all drugs the concentrations were adjusted to include the daily dose in 0.2 ml of drug solution/suspension. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin, streptomycin and glutamine were purchased from Whittaker (Verviers, Belgium). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Dutscher (Brumath, France).

Mice

Animal experiments were performed in accordance with institutional guidelines: European Directive 86/609/EEC. Six-week old male NMRI nude mice were purchased from Janvier laboratories (Le Genet sur Isle, France) and received s.c. inoculation in the right flank of 6.7×10^6 and 20×10^6 cells, for PC3wt and PC3R respectively, dissolved in 200 μl of Ringer lactate (10 animals per treatment condition).

Tumors

Tumor length and width were measured weekly using a caliper. Tumor volume was calculated as $\pi/6 \times \text{length} \times \text{width}^2$ until animal sacrifice. At that time, animals were sacrificed by spinal

cord dislocation and tumors were subsequently removed surgically; half of the tumor was directly frozen in liquid nitrogen for protein analysis and the other half fixed in para-formaldehyde overnight for immuno - histo - chemistry analyses.

Treatments

Mice bearing well-established tumors (mean tumor volume/treatment group $\sim 250 \text{ mm}^3$, at day 30 and 41 after tumor cells injection for PC3wt and PC3R respectively) were treated every week with vehicle alone (controls), vandetanib alone (25 or 50 mg/kg/day 5 days/week during three weeks, 0.2 ml p.o.), docetaxel alone (10 or 30 mg/kg, 1 day/week during three weeks, 0.2 ml i.p.) and the combinations of both drugs (either vandetanib 25 mg/kg + docetaxel 10 mg/kg, or vandetanib 50 mg/kg + docetaxel 30 mg/kg). The doses of docetaxel and vandetanib were chosen according to preliminary experiments to ensure that each drug given alone exerts moderate effects on tumor growth.

Interaction between vandetanib and docetaxel was evaluated for tumor growth inhibition.

The effects of the treatments were examined as previously described (Guérin et al 2008). The effect on tumor growth was measured by taking the mean tumor volume (MTV) on different given days for the different treatment groups: controls, vandetanib, docetaxel and docetaxel + vandetanib. Combination Ratio (CR) was defined as $MTV_{\text{docetaxel}} \times MTV_{\text{vandetanib}} / MTV_{\text{docetaxel} + \text{vandetanib}} \times MTV_{\text{control}}$. If $CR > 1$, there are supra-additive effects and if $CR < 1$ infra-additive ones. Strictly additive effects are observed if $CR = 1$.

At the end of treatment at day 50 and 61 after cell injection for PC3wt and PC3R respectively, half of the mice of each treatment group were sacrificed and tumors were removed surgically. The remaining mice were used for follow-up of tumor growth. For each tumor, half was directly frozen in liquid nitrogen for analysis of VEGF by ELISA method and the other

half was fixed in paraformaldehyde for EGFR expression, number of vessels determination (VEGFR-2) and tumour cells proliferation (Ki67) examination using micro-tissue array.

Analysis of tumor markers

Frozen tumours were pulverised in a liquid nitrogen-cooled Thermovac pulveriser. The resulting powders were homogenised in 10 volumes of a 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 containing 1 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol and 10 mM sodium molybdate. The homogenates were centrifuged for 1 hr at 105 000 g (+ 4°C) and the supernatants (cytosols) were used for VEGF determination. Total protein content was measured using the bicinchoninic acid assay (BCA). Human VEGF secreted by the PC3Wt and PC3R cells was quantified by ELISA using DVE 00 from Quantikine.

The expressions of EGFR, the micro-vessel marker VEGFR2 and the proliferation marker Ki67 were evaluated using immunohistochemistry (DBS mouse monoclonal antibody MOB 461-05, Cell Signalling Technology rabbit monoclonal antibody 55B11 and DAKO monoclonal antibody ref: M7240 MIB-1 respectively). The analysis of VEGFR2 took into account both vessel loss and reduction in vessel area. The analysis of Ki67 took into account the proportion of labelled cells. Forty x 10 magnification images of regions of high vascular density within the tumor were analysed in order to quantify tumor angiogenesis. Whatever the studied marker (EGFR, Ki67 or VEGFR2), the final value was the result of the examination by a pathologist of 2 to 10 fields per tumor (mean = 5) for each treatment group.

In vitro experiments

Exposure to drugs

Docetaxel (Docetaxel ®) was obtained from Aventis Pharmaceuticals.

Prolonged-release and long-acting formulation of Vandetanib (ZACTIMA™) microparticle depot formulation (Vandetanib 30 mg) was kindly provided by Astra Zeneca. Before being applied to cells, an accurate dissolution of the active drug contained in the microparticle formulation was made in the same 2 ml solvent vial (DMSO), leading a stock concentration of 10 mM. A 90% recovery after dissolution was assumed. Cells were treated with docetaxel or vandetanib or various combinations; the concentration of each reagent is specified in Table 1.

Western blotting

Experimental conditions were as follows: at day 0, one tube of frozen PC3wt and PC3R cells was put in culture; at day 3, cells were seeded in a 6 well plates (0.4×10^6 and 0.5×10^6 cells/well respectively); at day 6, DMEM without serum + vandetanib 10^{-5} M and/or 10^{-11} M < [docetaxel] < 10^{-9} M was added; at day 8, cells were scraped, pelleted and rinsed in ice-cold PBS-buffered saline, then lysed in an ice-cold cell lysis buffer containing a battery of protease and phosphatase inhibitors. In this way, drug exposure lasted 48 h.

Protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay kit. For immunoblotting, β -mercapto-ethanol (100 mM) and bromophenol blue (0.01%) were added to equal amounts of proteins (10 μ g per well), separated by electrophoresis on SDS-PAGE (12%) and transferred to a PolyVinylidene DiFluoride membrane overnight at 4°C in a buffer containing Tris 25 mM, glycine 192 mM and ethanol 20%. Prestained molecular weight markers were included in each gel. Membranes were blocked for 1 hour in TBS (Tris-HCl - pH 7.5- 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.68 mM) with 5% milk. After blocking, membranes were incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody in TBS 5% milk. After washing the membranes three times with TBS + 0.05% Tween, they were incubated for 1 hour

at room temperature with HRP peroxidase-conjugated secondary antibodies. After three washes in TBS, protein bands were visualized by VersadocTM imaging system according to the manufacturer's instructions (Biorad, Hercules, California, USA.). β -actin was used as a loading control protein in the experiments.

Primary antibodies against VEGFR, EGFR, MDR1, are listed in Table 2. Secondary antibodies (DAKO) were used as follows: antibody antimouse HRP-conjugated, dilution 1/1000; antibody antirabbit HRP-conjugated, dilution 1/3000.

Quantification of Western blots was done by imaging the autoradiograms with VersadocTM imaging system (Biorad) and quantifying relative band densities using Quantity One 1D analysis software (Biorad).

Real-Time quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated using the Qiagen RNA isolation kit (Qiagen) and the two-step GeneAmp RT-PCR kit (Applied Biosystem) was used for RT-PCR, according to the manufacturer's instructions. For Real Time RT-PCR, triplicates of 25- μ l PCR reactions were performed on 2 μ l of cDNA obtained by the retrotranscription of 2 μ g of RNA in a 100 μ l reaction. Amplification and analysis were performed, according to the manufacturer's instructions, using ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) and the precasted Assay on Demand (Applied Biosystems, <https://products.appliedbiosystems.com/>). PC3wt and PC3R cells were analysed for the differential expression of ABCB1, ABCC1, EGFR.

Quantification of target transcripts was performed in comparison to the reference transcript Eukaryotic 18S rRNA, implementing the "delta-delta Ct method for comparing relative expression results between treatments in real-time PCR" as outlined by PE Applied Biosystems (Perkin Elmer, Forster City, CA, USA).

MDR1 functional test

We used the functional test (Altenberg et al. 1994), to measure the unidirectional fluxes of rhodamine 123 (R123), a Pgp-transported fluorescent dye that accumulates in mitochondria. The unidirectional efflux of R123 was proportional to the level of MDR1/P-glycoprotein (Pgp) expression and was reduced by Pgp inhibitors. Briefly, at day 0, one frozen tube of PC3R cells was put in culture with 10 nM docetaxel and one tube of PC3wt was put in culture with complete medium; at day 3, cells were seeded 20,000/well (PC3wt) and 30,000/well (PC3R) in a 96-well black plate (Corning) in DMEM without serum. At confluence, cells were treated in 200 μ l of PBS (with calcium and magnesium) and 1 μ M of Rhodamine 123 for 1 hour at 37°C with: PBS (as negative control), Verapamil (as positive control, 100 μ M) or vandetanib at 10^{-5} M (concentration at which it had enhancing effects on docetaxel-induced toxicity). Wells were then washed with 3x200 μ l cold PBS and fluorescence was analysed with a reader (BMG Fluostar Galaxy) at 480-500 nm (emission 510-530 nm).

Statistical analysis

Data are presented as representative experiments or as arithmetic means with standard error.

The influence of treatments on tumor volumes was tested by means of analysis of variance. The dependent variable was the logarithm 10 of the tumor volume, which fits a Gaussian distribution. To this end, 2 separate analyses were performed on each cell line : one analysis included data obtained in control mice and mice receiving vandetanib 25 mg/kg/day 5 days/week during three weeks, taxotere 10 mg/kg, 1 day/week during three weeks, or both; the second one included data obtained in control mice and mice receiving vandetanib 50 mg/kg/day 5 days/week during three weeks, taxotere 30 mg/kg, 1 day/week during three weeks, or both. The tested factors were : the presence of vandetanib, the presence of taxotere,

the possible interaction between vandetanib and taxotere, and the time effect (considered as a nominal variable). Plot of estimated marginal means of log10 tumor volumes according to treatment allowed the interpretation of the interaction observed between vandetanib and taxotere. Statistics were performed on SPSS software (version 15.0).

Statistical significance was calculated by means of the non-parametric Kruskal-Wallis test.

RESULTS

In vivo experiments

Effects of treatments on tumour growth

The effects of the different treatments on PC3Wt and PC3R tumor growth are displayed on Figures 1a and 1b respectively. Each figure represents tumor growth during treatment (main graph) and follow-up (insert graph). Vandetanib given alone has paradoxical stimulating effect, at the smallest dose only, on PC3Wt tumor growth (Figure 1a, main graph and insert, $p < 0.0001$ versus control); on PC3R its growth-inhibiting effect was dose-dependant, only moderate during treatment (Figure 1b main graph), but more pronounced during follow-up (Figure 1b insert, $p > 0.05$ and $p = 0.037$ versus control for the smallest and the highest dose of vandetanib respectively). As expected, docetaxel had long-lasting, growth-inhibiting effects on the PC3Wt (Figure 1a, $p < 0.0001$ versus control for docetaxel whatever the dose). Its effects were still significative ($p < 0.0001$ versus control whatever the dose) on resistant PC3R but they were short-lasting (Fig 1b). The low concentration drug combination was less efficient than docetaxel given alone (Figure 1a) on PC3Wt and had additive short-lasting effects on PC3R (Figure 1b, $p > 0.05$ for the interaction). The high concentration combination was not superior to docetaxel given alone on PC3Wt (Figure 1a) and had infra-additive short-lasting effects on PC3R (Figure 1b, $p = 0.017$).

Effects of treatments on proliferation (Ki67)

As shown on Figure 2 PC3R has a higher proliferation index than PC3Wt ($p < 0.0001$).

As shown on Figure 3a, whatever their concentrations, neither vandetanib nor docetaxel had a significative effect on PC3Wt; nevertheless this apparent absence of effect could be due to the dispersion of control values as the highest dose of docetaxel has a clear inhibiting effect when compared to the smallest one. Vandetanib at high concentration diminished proliferation on PC3R (Figure 3b). These effects on PC3Wt as well as on PC3R tumor cell proliferation corroborate those observed on tumor growth.

Effects of treatments on free VEGF concentration in the tumour

We (Bozec et al, 2006) and others (Siemann et al, 2009) previously described a possible correlation between tumor sensitivity to antiangiogenic agents and VEGF expression. In agreement with this hypothesis, if vandetanib increased and docetaxel decreased VEGF secretion by the tumor both in PC3Wt and PC3R, the basic level of VEGF was nevertheless 4 times more elevated in PC3R as compared to PC3Wt ($p < 0.001$). The adding of docetaxel down-regulates to control levels the vandetanib-induced increase for PC3R only (Figure 4).

Effects of treatments on tumour vessels (VEGFR2 labelling)

Vandetanib and docetaxel given alone decreased in a concentration-dependent manner the number of tumor vessels in both tumors. Paralleling the above results concerning VEGF, number of tumor vessels (Figure 5) were 1.5 more elevated in PC3R as compared to PC3Wt ($p = 0.027$). On PC3Wt both Vandetanib and Docetaxel diminish significantly the number of tumor vessels in a dose dependant way; on PC3R it was also the case but only treatment

containing vandetanib at the highest concentration reach significativity. The combinations were more efficient than each individual drug (Figure 6).

In vitro experiments

The effects of each single drug and their combination and/or sequence were examined for the impact on molecular factors representative of EGFR signaling (VEGFR, which labels endothelial cells only, was not a relevant target for in vitro experiments on tumor cells).

Modulation of MDR1 by vandetanib

Our previous data demonstrated that the PC3R cells have a marked increase in the expression of MDR1 in comparison with PC3wt (Lo Nigro et al, 2008).

We first investigated the role of vandetanib in regulating docetaxel-efflux pumps expression at mRNA and protein levels.

In PC3Wt and PC3R cells, no significant regulation of ABCC1 mRNA could be seen for any treatment (Figure 7).

As expected, MDR1 pump was not expressed in PC3wt cells, while it was highly overexpressed in PC3R cells but no modulation was seen neither at a mRNA nor at a protein level after any treatment (figure 8).

Second, we investigated with a functional test whether vandetanib could reverse resistance to docetaxel by modulating the Pgp pump. Different (10^{-6} M, 10^{-5} M and 5×10^{-5} M) concentrations of vandetanib (with verapamil as a positive control) were tested: no increase

in the level of intracellular fluorescence with the rhodamine test could be put into evidence (data not shown).

Molecular targets of vandetanib

The expression of EGFR mRNA and protein levels were determined to ascertain the biological mechanisms of the higher effect of vandetanib and docetaxel in combination previously observed in vivo, on the PC3R as compared to PC3Wt. Basal EGFR mRNA and protein were expressed at higher levels in PC3R as compared to PC3wt (3-fold higher mRNA level, 28-fold higher protein level, Figure 9, $p < 0.001$). This was also the case in vivo but the difference did not reach significance (Figure 10).

DISCUSSION

It appears clearly from the present results, that the effects of vandetanib, docetaxel and their combinations differ greatly between docetaxel-sensitive PC3Wt and docetaxel-resistant PC3R.

On PC3Wt, if docetaxel diminished tumor growth, as could have been expected, it was not the case for vandetanib; the less concentrated combination was less efficient than docetaxel given alone, demonstrating an antagonistic effect of vandetanib on docetaxel action. These rather unexpected experimental results nevertheless agree with the negative clinical results of the docetaxel-vandetanib combination on prostatic cancer patients recently reported (Horti et al, 2009).

On PC3R, if docetaxel had a shorter lasting effect, as compared to PC3Wt, as could have been expected, vandetanib at the highest dose had a clear inhibiting effect on tumor growth,

at variance with its effects on PC3Wt; nevertheless, as for PC3Wt, their combinations had no better effect than vandetanib given alone.

The rather stimulating effects of vandetanib on PC3Wt tumor growth was not noted by other investigators (Checkley et al, 2003): this effect being most important at the smallest dose of vandetanib (inversed bell-shape dose-effect curve), could reflect the now well-known vessel-normalizing effect at low doses, promoting tumor growth, followed by vessel necrosis effect at higher doses, which has been described for antiangiogenic drugs in general (Jain, 2005), and for vandetanib in particular (Claes et al, 2008).

The surprising enhanced sensitivity to vandetanib of the docetaxel-resistant tumors could be explained by the enhanced expression, as compared to PC3Wt, of the two targets of vandetanib : First, enhancement of vessel density (put into evidence by anti-VEGFR-labelling of endothelial cells) and concomitant enhanced expression of VEGF, the homologous growth factor : these changes in vascularity of the tumor signals a higher dependency of docetaxel-resistant tumors to vascular integrity. This could be put in perspective with the relation established previously by us (Bozec et al, 2006), for head and neck tumors, between VEGF expression and ZD6126 (a vascular disrupting agent) efficiency, and by others for vandetanib, (Siemann et al, 2009), between drug efficiency and tumor VEGF expression.

Second, enhancement of tumor cells EGFR expression : the relative importance of EGFR gene amplification, protein or mRNA expression and / or mutation state for predicting spontaneous tumor sensitivity to EGFR targeting drugs is still controversial, depending greatly of tumor types and the method of measurement (Magné et al, 2002; Parra et al 2004; Dei Tos and Ellis 2005; Helfrich et al, 2005; Liu et al, 2007; Taguchi et al, 2008; Hirsch et al, 2008). Nevertheless two different experimental works give credit to a possible role for EGFR expression level in the modulation of sensitivity to EGFR-targeting drugs : on one hand, EGFR expression was diminished, among other effects, in PC3 induced-resistance to

gefitinib, an EGFR-dependant TKI (Festuccia et al, 2007); on the other hand, sensitization to erlotinib, another EGFR-dependant TKI, followed interferon-induced EGFR-overexpression in human colon cancer cell lines (Yang et al, 2005). Moreover enhanced EGFR expression means enhanced EGFR signalling and consequently the observed overproduction of VEGF, the indirect product of EGF signalling (Wedge et al, 2002), in PC3R as compared with PC3Wt.

If MDR GP 170 protein was, as expected, over-expressed in PC3R, in vitro experiments indicated that vandetanib neither modulated its expression nor inhibited its action contrary to what was observed by us, with this same PC3R cell line, with lanreotide (Lo Nigro et al, 2005). These in vitro results, contradict what has been obtained by others before with vandetanib but in association with other drugs and on different types of tumors (Mi and Lou, 2007 ; Zheng et al, 2009). They are nevertheless in full agreement with the observed absence of potentialisation of docetaxel action by vandetanib in the in vivo experiences. Keeping in mind the great difficulties in extrapolating preclinical results to the clinical setting, three main conclusions can nevertheless be drawn from the present experiments :

First, vandetanib which counteracts or, to the best, does not add to, the effects of docetaxel should clearly not be added to docetaxel, for the treatment of docetaxel-naïve AIPC.

Second, docetaxel-induced resistance to docetaxel renders tumors more sensitive to vandetanib.

Third, vandetanib does not reverse docetaxel-resistance in this tumor model.

These in vivo and in vitro results may explain the failure of docetaxel-vandetanib association observed in the clinic in the treatment of AIPC, but, nevertheless, maintain open the possibility for vandetanib, given alone, to be a reasonable therapeutic choice after progression of AIPC under docetaxel treatment.

REFERENCES

Aalinkel R, Nair MP, Sufrin G, Mahajan SD, Chadha KC, Chawda RP, Schwartz SA Gene expression of angiogenic factors correlates with metastatic potential of prostate cancer cells.. *Cancer Res* 2004, **64** :5311-5321

Altenberg GA, Vanoye CG, Han ES, Deitmer JW, Reuss L Relationship between rhodamine 123 transport, cell volume, and ion-channel function of P-glycoprotein. *J Biol Chem* 1994, **269**: 7145-7149

Aragon-Ching JB, Dahut W Chemotherapy in Androgen-independent prostate cancer (AIPC) : What's next after taxane progression ? *Cancer Ther.* 2007, **5** :151-160

Bozec A, Lassalle S, Gugenheim J, Fischel JL, Formento P, Hofman P, Milano G. Enhanced tumour antiangiogenic effects when combining gefitinib with the antivascular agent ZD6126. *Br J Cancer*, 2006, **95** : 722-728

Checkley D, Tessier JJ, Kendrew J, Waterton JC, Wedge SR Use of dynamic contrast-enhanced MRI to evaluate acute treatment with ZD6474, a VEGF signalling inhibitor, in PC-3 prostate tumours. *Br J Cancer*, 2003, **89** :1889-1895

Claes A, Wesselring P, Jeuken J, Maass G, Heershap A, Leenders WP Antiangiogenic compounds interfere with chemotherapy of brain tumors due to vessel normalization. *Mol Cancer Ther*, 2008, **7** : 71-78

Dei Tos AP, Ellis I Assessing epidermal growth factor receptor expression in tumours : what is the value of current test methods ? *Eur J Cancer* 2005, **41** :1383-1392

Di Lorenzo G, Tortora G, D'Armiento FP, De Rosa G, Staibano S, Autorino R, D'Armiento M, De Laurentiis M, De Placido S, Catalano G, Bianco AR, Ciardello F. Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2002, **8** : 3438-3444

Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2009, **15** : 232-239

Festuccia C, Gravina GL, Millimaggi D, Muzi P, Specia S, Ricevuto E, Vicentini C, Bologna M. Uncoupling of the epidermal growth factor receptor from downstream signal transduction molecules guides the acquired resistance to gefitinib in prostate cancer. *Oncol Rep* 2007, **18** : 503-511

Figg WD, Feuer JA, Bauer KS. Management of hormone-sensitive metastatic prostate cancer. Update of hormonal therapy. *Cancer Pract* 1997, **5** : 258-263

Freshney RI. ZD6474 reverses multidrug resistance by directly inhibiting the function of P-glycoprotein. Author reply. *Br J Cancer* 2007, **97** : 1714

Gan L, Chen S, Wang Y, Watahiki A, Bohrer L, Sun Z, Wang Y, Huang H.

Inhibition of the androgen receptor as a novel mechanism of taxol chemotherapy in prostate cancer. Cancer Res 2009, 69 : 8386-8394

Guérin O, Formento P, Lo Nigro C, Hofman P, Fischel JL, Etienne-Grimaldi MC, Merlano M, Ferrero JM, Milano G. *Supra-additive antitumor effect of sunitinib malate (SU11248, Sutent) combined with docetaxel. A new therapeutic perspective in hormone refractory prostate cancer. J Cancer Res Clin Oncol 2008, 134 : 51-57*

Helfrich BA, Raben D, Varella-Garcia M, Gustafson D, Chan DC, Bernis L, Coldren C, Baron A, Zeng C, Franklin WA, Hirsch FR, Gazdar A, Minna j, Bunn PA Jr. *Antitumor activity of the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839, Iressa) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with gene copy number and EGFR mutations but not EGFR protein levels. Clin Cancer Res 2006, 12 : 7117-7125*

Heymach JV, Johnson BE, Prager D, Csada E, Roubec J, Pesek M, Spàsovà I, Belani CP, Bodrogi I, Gadgeel S, Kennedy SJ, Hou J, Herbst RS. *Randomized, placebo-controlled phase II study of vandetanib plus docetaxel in previously treated non small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2007, 25 : 4270-4277*

Hirsch FR, Dziadziuszko R, Thatcher N, Mann H, Walkins C, Parums DV, Speake G, Holloway B, Bunn PA Jr, Franklin WA. *Epidermal growth factor receptor immunohistochemistry : comparison of antibodies and cutoff points to predict benefit from gefitinib in a phase 3 placebo-controlled study in advanced nonsmall-cell lung cancer. Cancer 2008, 112 : 1114-1121*

Horti J, Widmark A, Stenzl A, Federico MH, Abratt RP, Sanders N, Pover GM, Bodrogi I.

A randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study of vandetanib plus docetaxel/prednisolone in patients with hormone-refractory prostate cancer. Cancer Biother Radiopharm. 2009, 24 : 175-180

Jain RK. *Normalization of tumor vasculature : an emerging concept in antiangiogenic therapy. Science. 2005, 307 : 58-62*

Liu W, Wu X, Zhang W, Montenegro RC, Fackenthal DL, Spitz JA, Huff LM, of ZD1839 (Iressa), Das S, Cook EH Jr, Cox HJ, Bates SE, Ratain MJ. *Relationship of EGFR mutations, expression, amplification, and polymorphisms to epidermal growth factor receptor inhibitors in the NCI60 cell lines. Clin Cancer Res 2007, 13 : 6788-6795*

Lo Nigro C, Maffi M, Fischel JL, Formento P, Milano G, Merlano M. *The combination of docetaxel and the somatostatin analogue lanreotide on androgen-independent docetaxel-resistant prostate cancer : experimental data. BJU Int.2008, 102 : 622-627*

Magné N, Fischel JL, Dubreuil A, Formento P, Poupon M-F, Laurent-Puig P, Milano G. *Influence of epidermal growth factor receptor (EGFR), p53 and intrinsic MAP kinase pathway status of tumour cells on the antiproliferative effect of ZD1839 (Iressa). Br J Cancer 2002, 86 : 1518-1523*

Mi Y, Lou L. *ZD6474 reverses multidrug resistance by directly inhibiting the function of P-glycoprotein. Br J Cancer 2007, 97 : 934-940*

McCarty MF, Wey J, Stoeltzing O, Liu W, Fan F, Bucana C, Mansfield PF, Ryan AJ, Ellis LM. ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with additional activity against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, inhibits orthotopic growth and angiogenesis of gastric cancer *Mol Cancer Ther* 2004, **3** : 1041-1048

Nicholson B, Gulding K, Conaway M, Wedge SR, Theodorescu D. Combination antiangiogenic and androgen deprivation therapy for prostate cancer : a promising therapeutic approach. *Clin Cancer Res* 2004 : **10** :8728-8734

Ohlmann C-H, Stöckle M. Was kommt nach Docetaxel ? *Urologe* 2009, 1-5

Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increase local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 2009, **15** : 220-231

Parra HS, Cavina R, Latteri F, Zucali PA, Campagnoli E, Morenghi E, Grimaldi GC, Roncalli M, Santoro A. Analysis of epidermal growth factor receptor expression as a predictive factor for response to gefitinib (Iressa, ZD1839) in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2004, **91** : 208-212

Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN Jr, Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moynour C, Kohl M, Benson MC, Small EJ, Raghavan. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med* 2004 : **351** : 1513-1520

Petrylak DP. *New paradigms for advanced prostate cancer. Rev Urol* 2007, **9**(suppl 2) : S3-S12

Sharifi N, Dahut WL, Steinberg SM, Figg WD, Tarassof C, Arlen P, Gulley JL. *A retrospective study of the time to clinical endpoints for advanced prostate cancer. BJU Int* 2005, **96** : 985-989

Sharifi N, Gulley JL, Dahut WL. *Androgen deprivation therapy for prostate cancer. JAMA* 2005, **294** : 238-244

Shelley M, Harrison C, Coles B, Stafforth J, Wilt T, Mason M. *Chemotherapy for hormone-refractory prostate cancer. 2009, Cochrane Database of Systemic Review 2006, Issue 4. Art. No : CD005247*

Siemann DW, Norris CM, Ryan A, Shi W. *Impact of tumor cell VEGF expression on the In vivo efficacy of vandetanib (zactima ; ZD6474). Anticancer Res* 2009, **29**: 1987-1992

Sternberg CN, Petrylak DP, Sartor O, Witjes JA, Demkow T, Ferrero JM, Eymard JC, Falcon S, Calabro F, James N, Bodrogi I, Harper P, Wirth M, Berry W, Petrone ME, McKean TJ, Noursalehi M, George M, Rozencweig M. *Multinational, double-blind, phase III study of prednisone and either satraplatin or placebo in patients with castrate-refractory prostate cancer progressing after prior chemotherapy : the SPARC trial. J Clin Oncol* 2005, **27** : 5431-5438

Strohmeyer D, Strauss F, Rössing C, Roberts C, Kaufmann O, Bartsch G, Effert P. Expression of bFGF, VEGF and c-met and their correlation with microvessel density and progression in prostate carcinoma. *Anticancer Res* 2004, **24**: 1797-1804

Taguchi T, Tsukuda M, Imagawa-Ishiguro Y, Kato Y, Sano D. Involvement of EGFR in the response of squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines to gefitinib. *Oncol Rep* 2008, **19**: 65-71

Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Théodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA ; TAX 327 Investigators Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 2004, **351** : 1502-1512

Uzgare AR, Isaacs JT. Enhanced redundancy in Akt and mitogen-activated protein kinase-induced survival of malignant versus normal prostate epithelial cells. *Cancer Res* 2004, **64** : 6190-6199

Wedge SR, Ogilvie DJ, Dukes M, Kendrew J, Chester R, Jackson JA, Boffey SJ, Valentine PJ, Curwen JO, Musgrove HL, Graham GA, Hughes GD, Thomas AP, Stokes ESE, Curry B, Richmond GHP, Wadsworth PF, Bigley AL, Hennequin LF. ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. *Cancer Res* 2002, **62** : 4645-4655

Weir HK , Thun MJ, Hankey BF, Ries LA, Howe HL, Wingo PA, Jemal A, Ward E, Anderson RN, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000,

featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. J Natl Cancer Inst
2003, **95** : 1276-99.

Yang JL, Qu XJ, Russell PJ, Goldstein D. *Interferon-alpha promotes the antiproliferative effect of Erlotinib (OSI-774) on human colon cancer cell lines. Cancer Lett* 2005, **225**: 61-74

Zheng LS, Wang F, Li YH, Zhang X, Chen LM, Liang YJ, Dai CL, Yan YY, Tao LY, Mi YJ, Yang AK, To KK, Fu LW. *Vandetanib (Zactima, ZD6474) antagonizes ABCC1- and ABCG2-mediated multidrug resistance by inhibition of their transport function. PloS One* 2009, **4** : e5172

Table 1. Five-days exposure to drugs for MTT test and IC_{50} (concentration leading to 50% cell survival) in the wild type (wt) and docetaxel-resistant (R) PC3 cells.

Treatment	Dose (M)	IC_{50} values (M)	
		PC3wt	PC3R
docetaxel 2day 10^{-8}	10^{-11} - 10^{-7} *	$4,25 \cdot 10^{-10}$	4,87
vandetanib 2day 10^{-5}	10^{-7} - 10^{-4}	$1,33 \cdot 10^{-5}$	1,15

* 10^{-11} - 10^{-9} in PC3wt and 10^{-9} - 10^{-7} in PC3R

Table 2 . Characterization of primary and secondary antibodies. MW: molecular weight.

Antibody	MW (kDa)	Source	Supplier	Dilution
Actin β	42	Mouse	Sigma	1/2500
pEGFR (Tyr 1173)	175	Mouse	Upstate	1/1000
EGFR	170	Mouse	Neomarkers	1/1000
MDR1 (PgP)	170/180	Mouse	Sigma	1/500
Polyclonal anti-mouse immunoglobulins/HRP		Rabbit	DAKO	1/3000

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: Effect of vandetanib (25 and 50mg/kg), docetaxel (10 and 30 mg/kg) given alone, and of the low concentration combination vandetanib 25mg/kg + docetaxel 10 mg/kg, or of the high concentration combination vandetanib 50mg/kg + docetaxel 30mg/kg on PC3Wt (Figure 1a) and PC3R (Figure 1b) tumor growth. Main graph represents tumor growth during treatment and insert graph tumor growth during follow-up. Bars = SD

Figure 2: Comparison between Ki67 value-distribution between PC3Wt and PC3R untreated tumors (controls). The proliferation indexes are higher for PC3R than for PC3Wt ($p < 0.0001$).

Figure 3: Effect (mean and SEM) of vandetanib (25 and 50mg/kg), docetaxel (10 and 30 mg/kg) given alone and of the low concentration combination vandetanib 25mg/kg + docetaxel 10 mg/kg or of the high concentration combination vandetanib 50mg/kg + docetaxel 30mg/kg on PC3Wt (Figure 3a) and PC3R (Figure 3b) cell proliferation (Ki67). The p value on each treatment group corresponds to the comparison with the control group, and above a bracket to the comparison of the two concerned groups of treatment. *, **, *** $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively.

Figure 4: Effect (mean and SEM) of vandetanib (25 and 50mg/kg), docetaxel (10 and 30 mg/kg) given alone and of the low concentration combination vandetanib 25mg/kg + docetaxel 10 mg/kg or of the high concentration combination vandetanib 50mg/kg + docetaxel 30mg/kg on PC3Wt (Figure 4a) and PC3R (Figure 4b) VEGF tumor content. The p value on each treatment group corresponds to the comparison with the control group, and above a bracket to the comparison of the two concerned groups of treatment. NS, *, **, *** , not significant, $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively.

Figure 5: Comparison between endothelial cell density value-distribution between PC3Wt and PC3R untreated tumors (controls). The values were higher for PC3R than for PC3Wt ($p = 0.027$).

Figure 6: Effect (mean and SEM) of vandetanib (25 and 50mg/kg), docetaxel (10 and 30 mg/kg) given alone and of the low concentration combination vandetanib 25mg/kg + docetaxel 10 mg/kg or of the high concentration combination vandetanib 50mg/kg + docetaxel 30mg/kg on PC3Wt (Figure 6a) and PC3R (Figure 6b) endothelial cells density (VEGFR2) The p value on each treatment group corresponds to the comparison with the control group. NS, *, **, ***, not significant, $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively.

Figure 7: Effect of docetaxel and vandetanib on ABCC1 mRNA in PC3R in vitro (1 = control PC3Wt, 2 = Vandetanib PC3Wt, 3 = Docetaxel PC3Wt, 4 = control PC3R, 5 = Vandetanib PC3R, 6 = Docetaxel PC3R).

Figure 8: Effect of docetaxel and vandetanib on MDR1 mRNA (8a) and protein (8b) levels in PC3R in vitro (1 = control PC3Wt, 2 = Vandetanib PC3Wt, 3 = Docetaxel PC3Wt, 4 = control PC3R, 5 = Vandetanib PC3R, 6 = Docetaxel PC3R).

Figure 9: Effect of docetaxel and vandetanib on mRNA (9a) and protein EGFR expression (9b) of PC3Wt and PC3R in vitro (1 = control PC3Wt, 2 = Vandetanib PC3Wt, 3 = Docetaxel PC3Wt, 4 = control PC3R, 5 = Vandetanib PC3R, 6 = Docetaxel PC3R).

Figure 10: Comparison between EGFR value-distribution between PC3Wt and PC3R untreated tumors (controls). The values are higher for PC3R than for PC3Wt.

Figure 1a

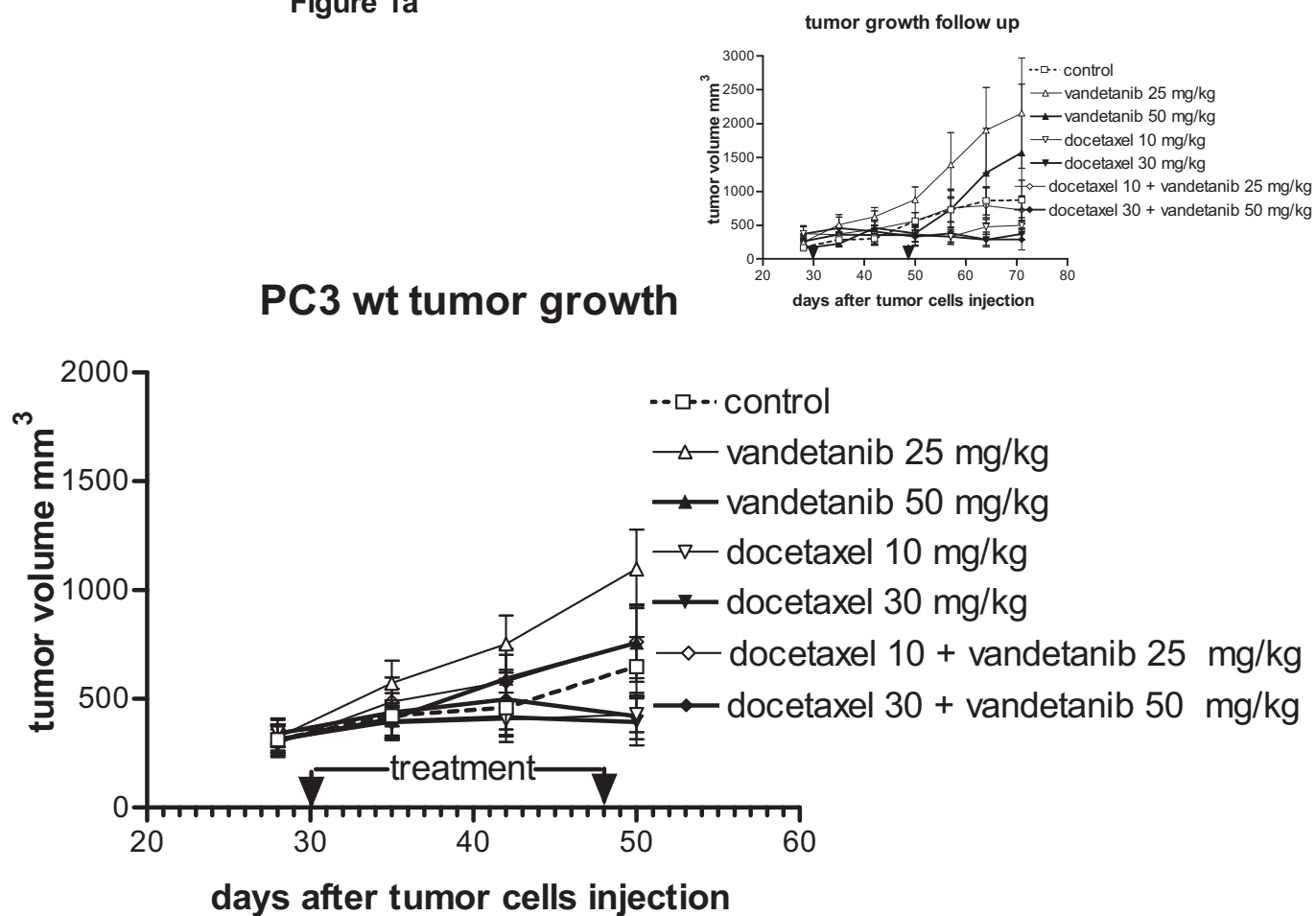


Figure 1b

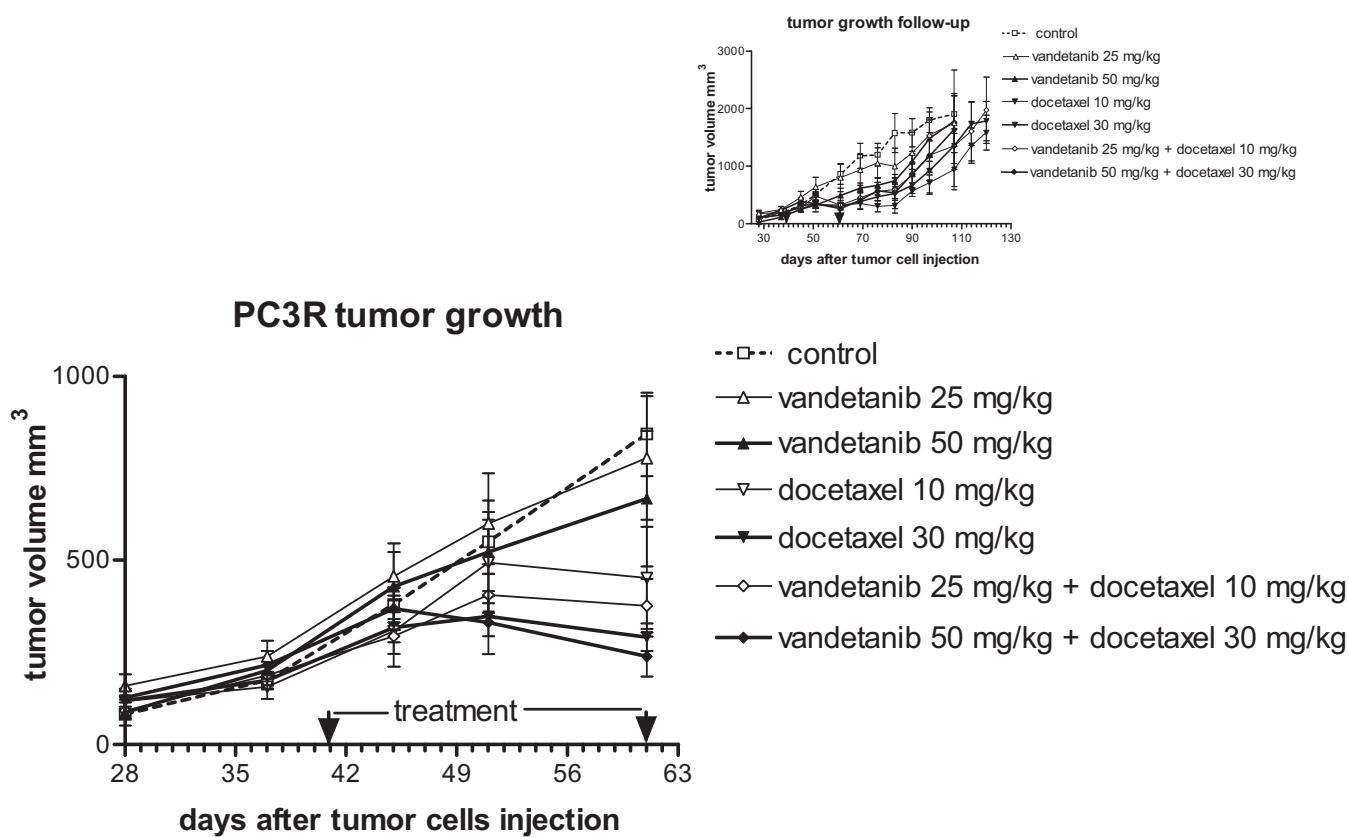


Figure 2

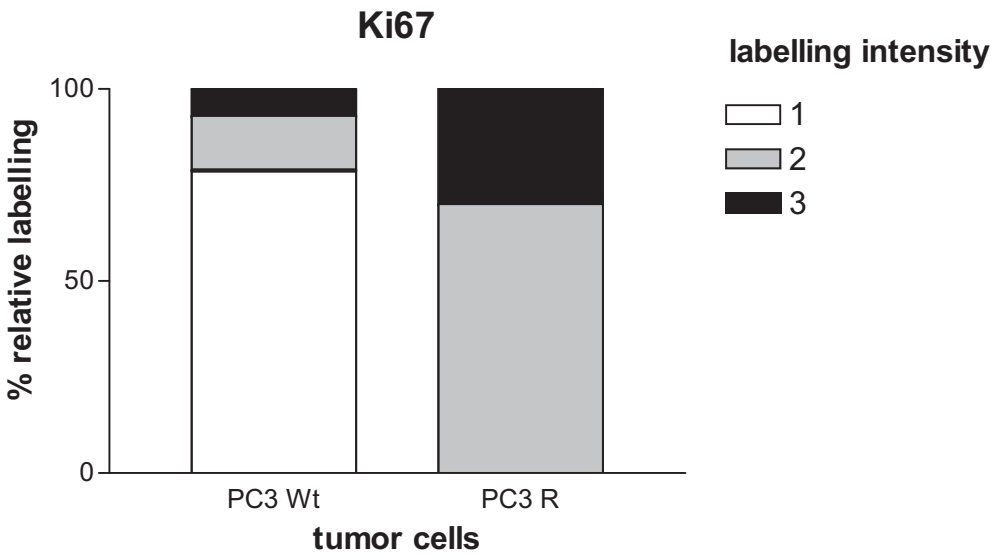


Figure 3a

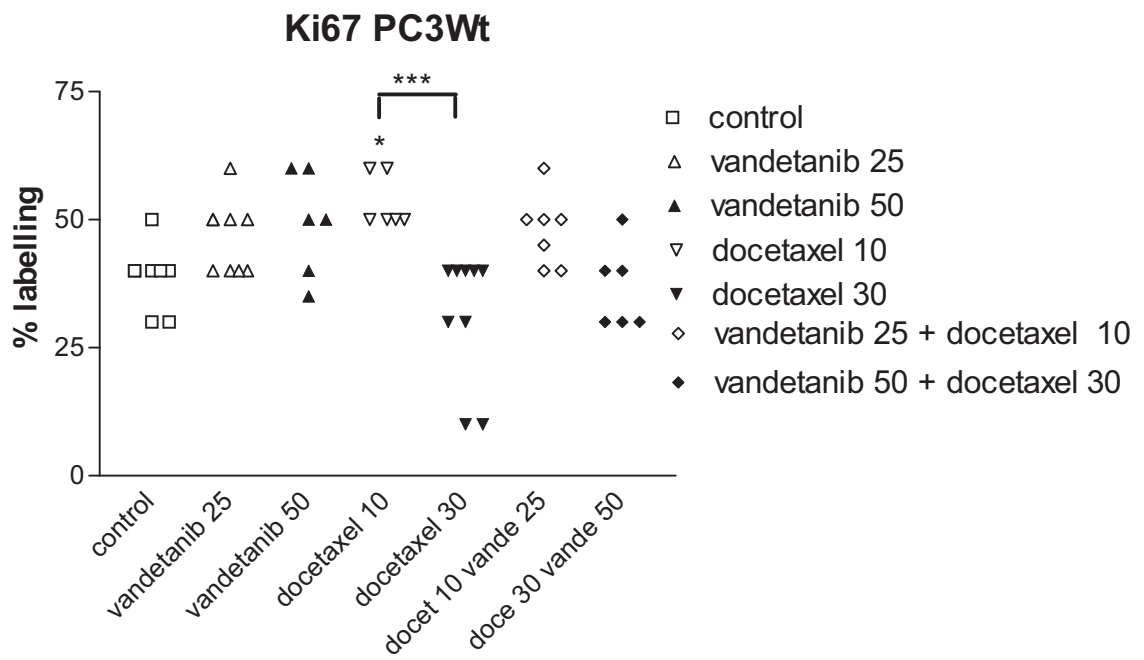


Figure 3b

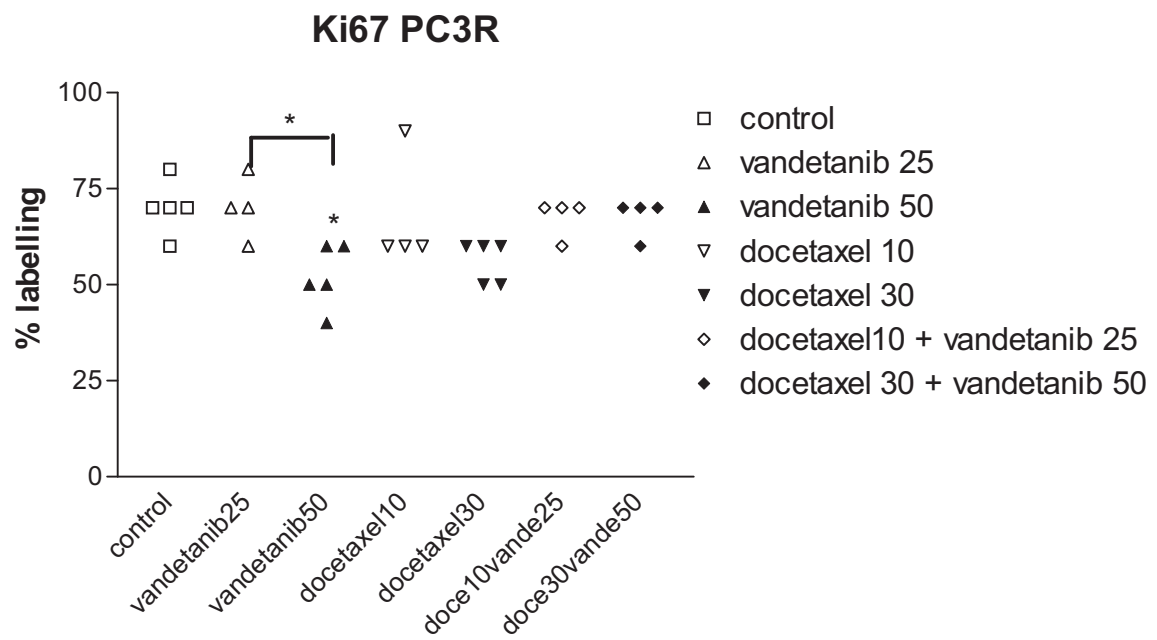


Figure 4a

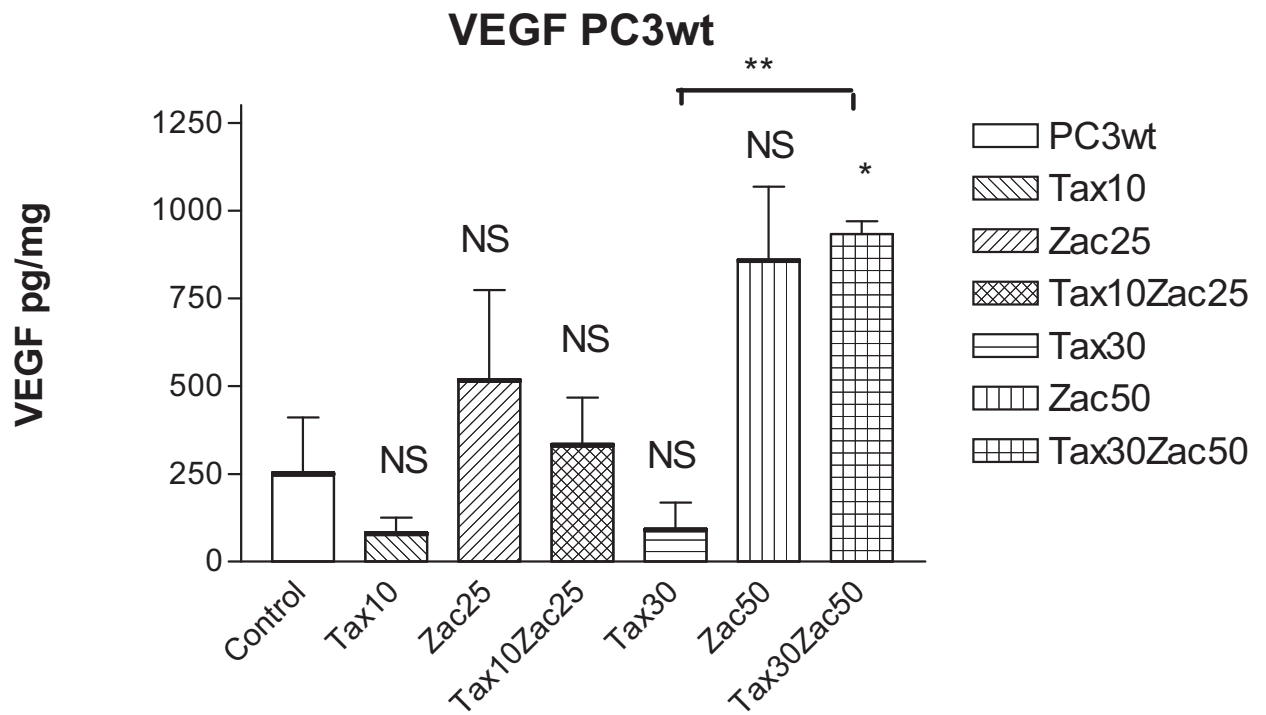


Figure 4b

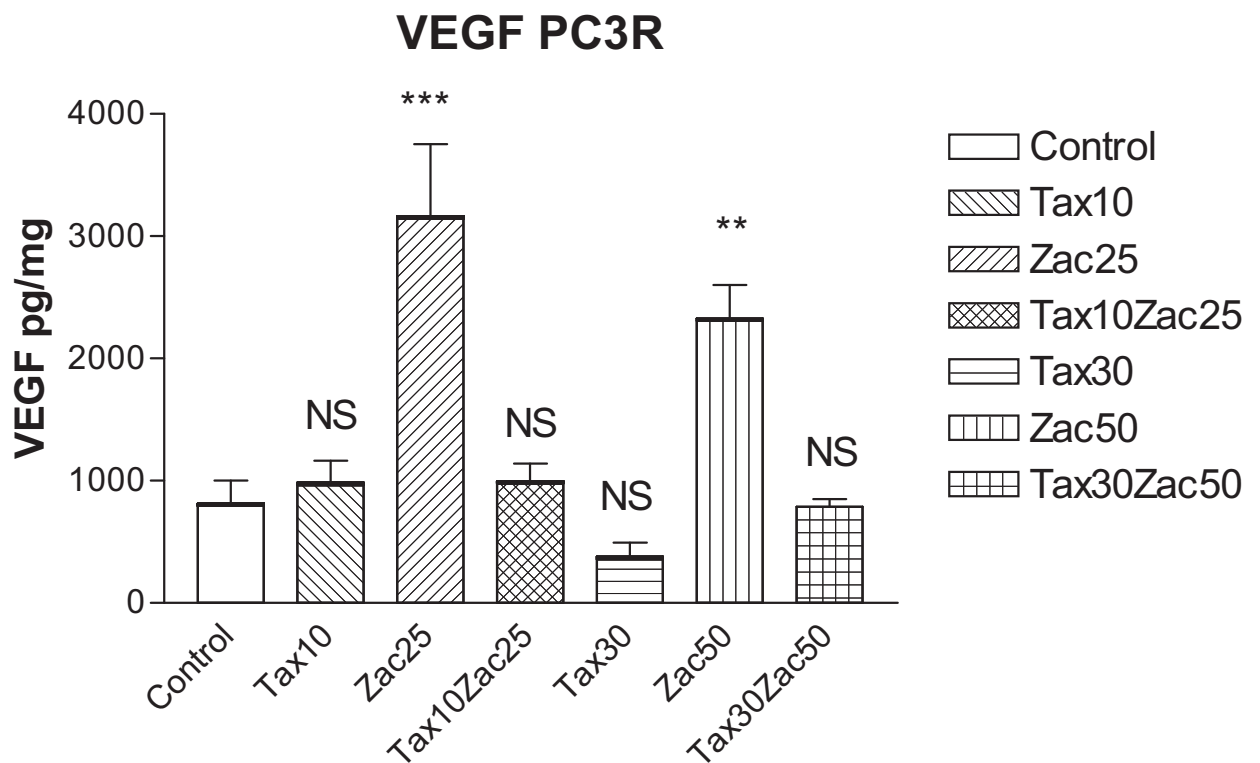


Figure 5

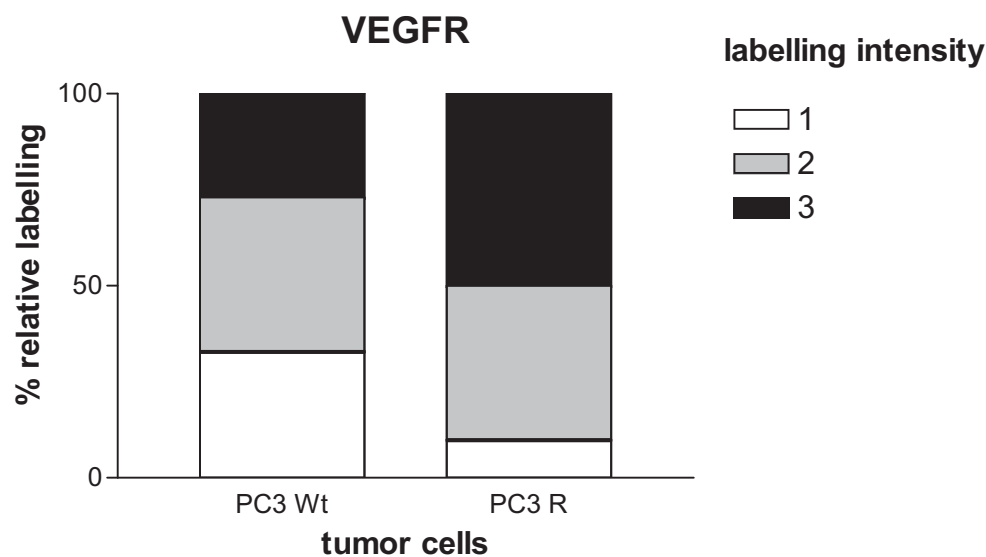


Figure 6a

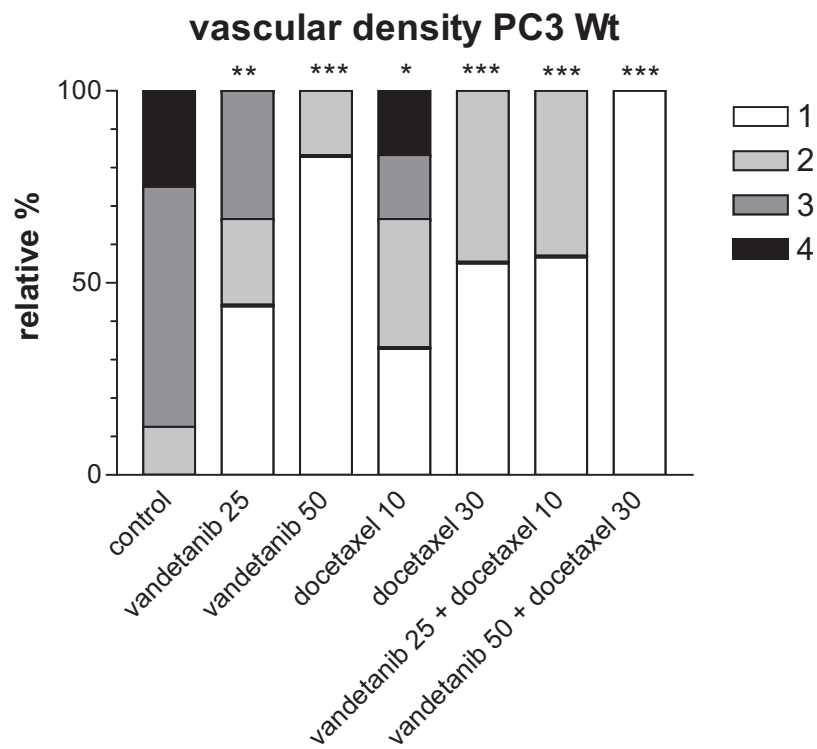


Figure 6b

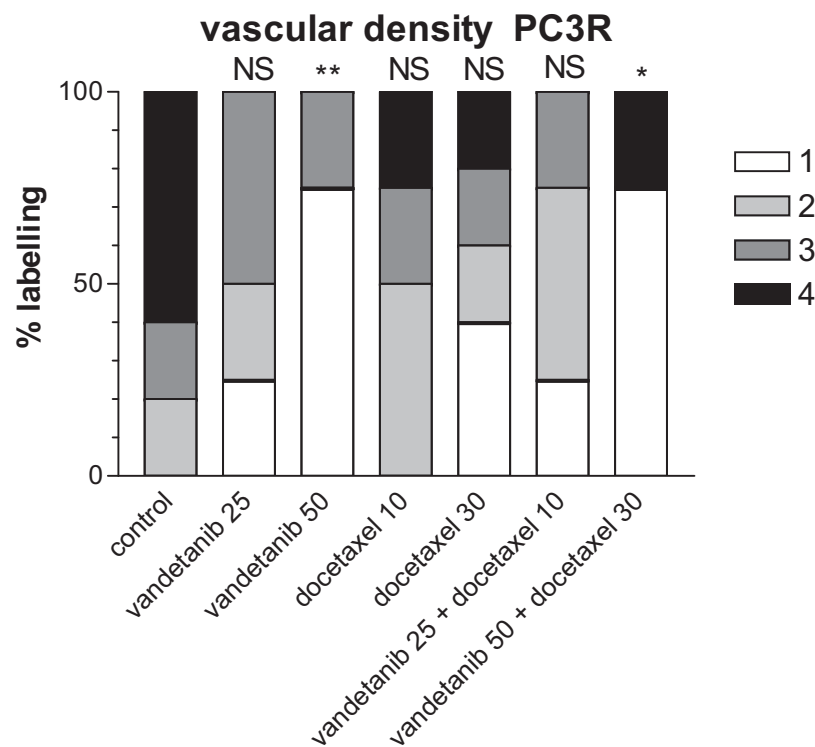


Figure 7 : ABCC1 mRNA expression

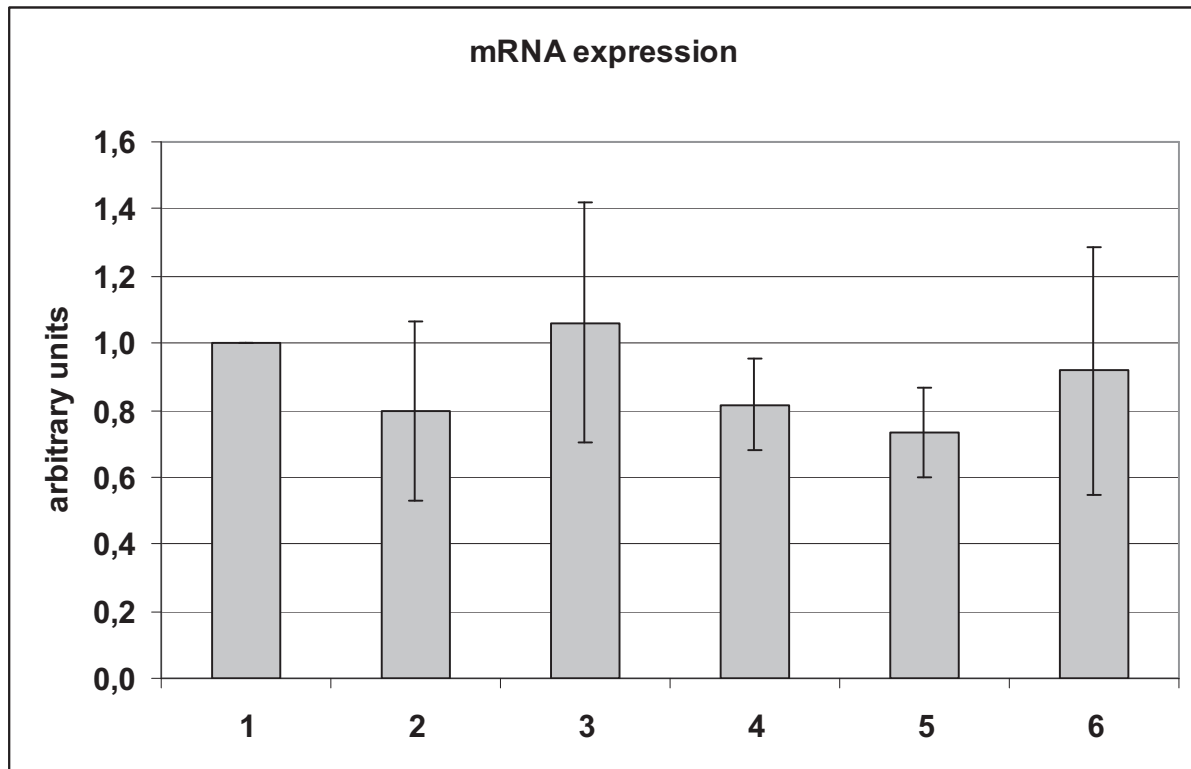


Figure 8a : MDR1 (ABCB1) mRNA expression

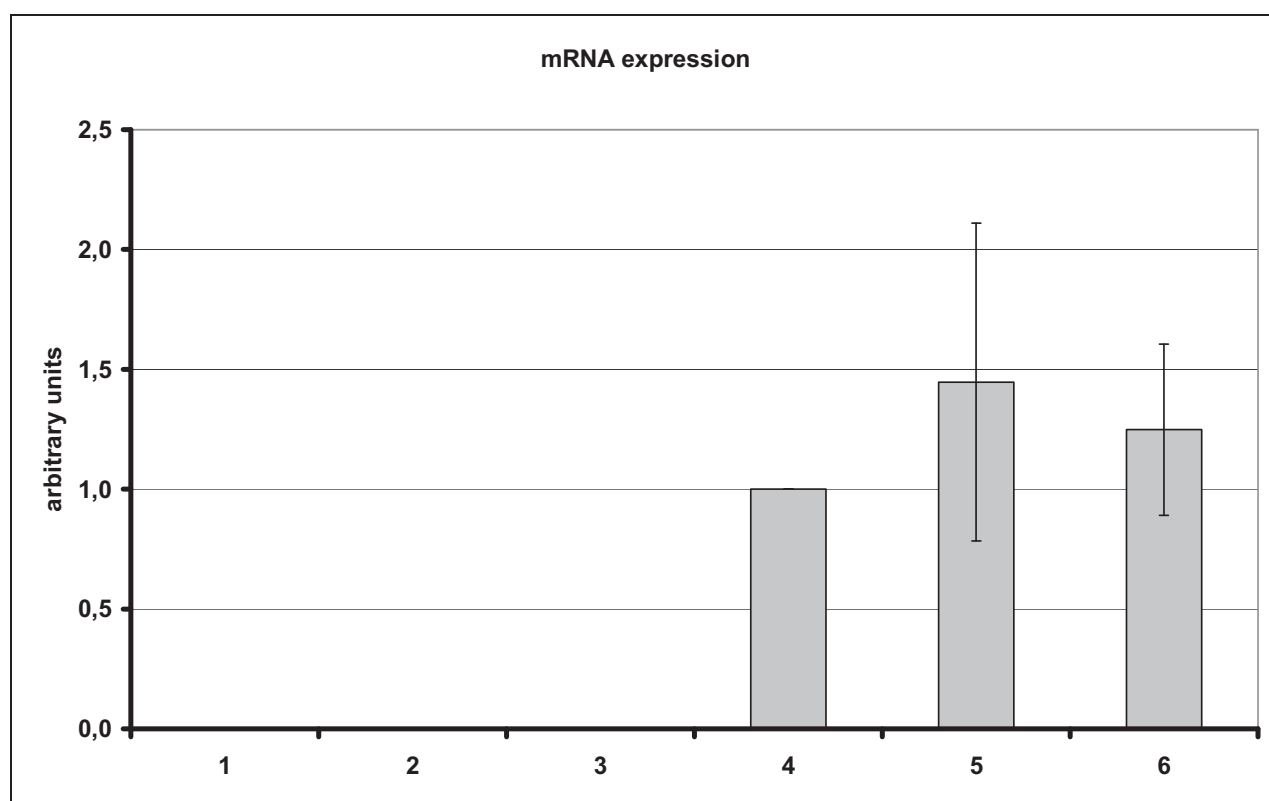


Figure 8b : MDR1 (ABCB1) protein expression

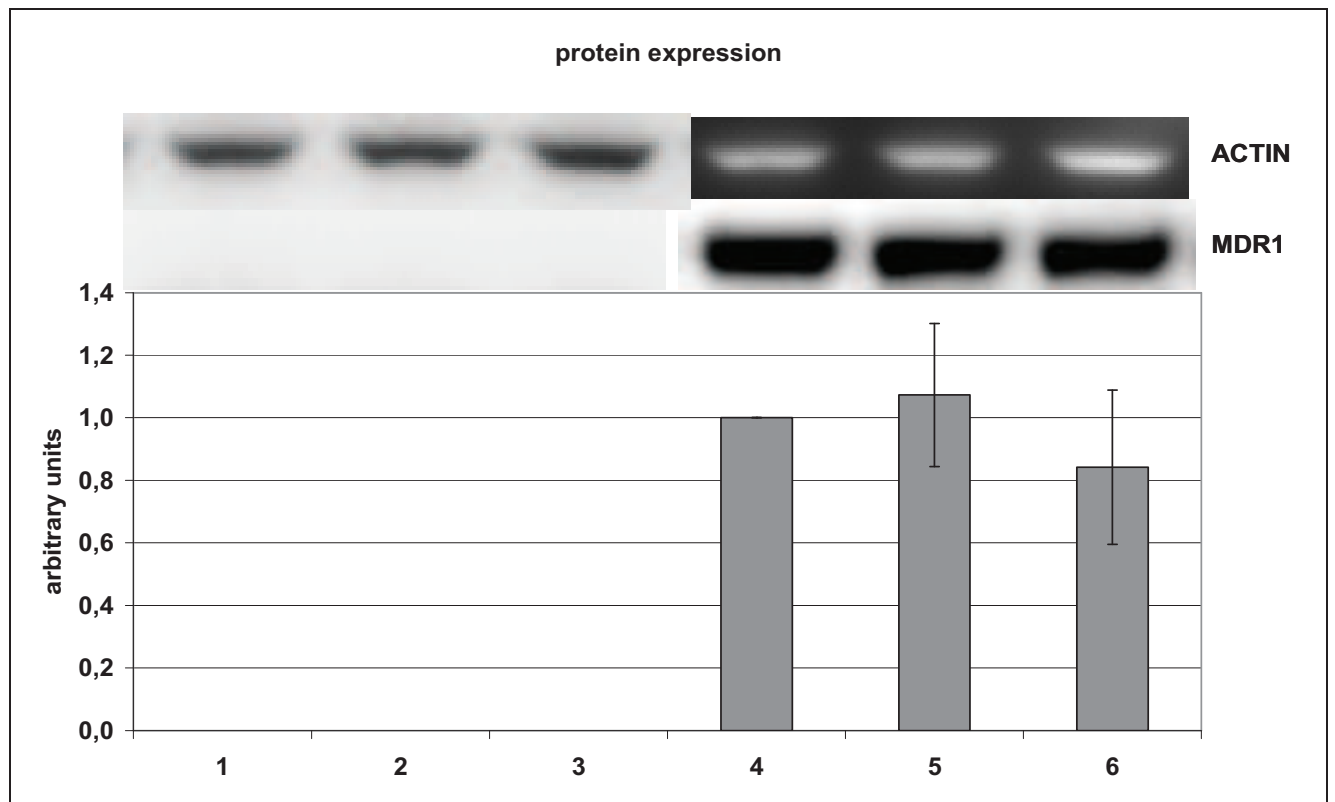


Figure 9a: EGFR mRNA expression

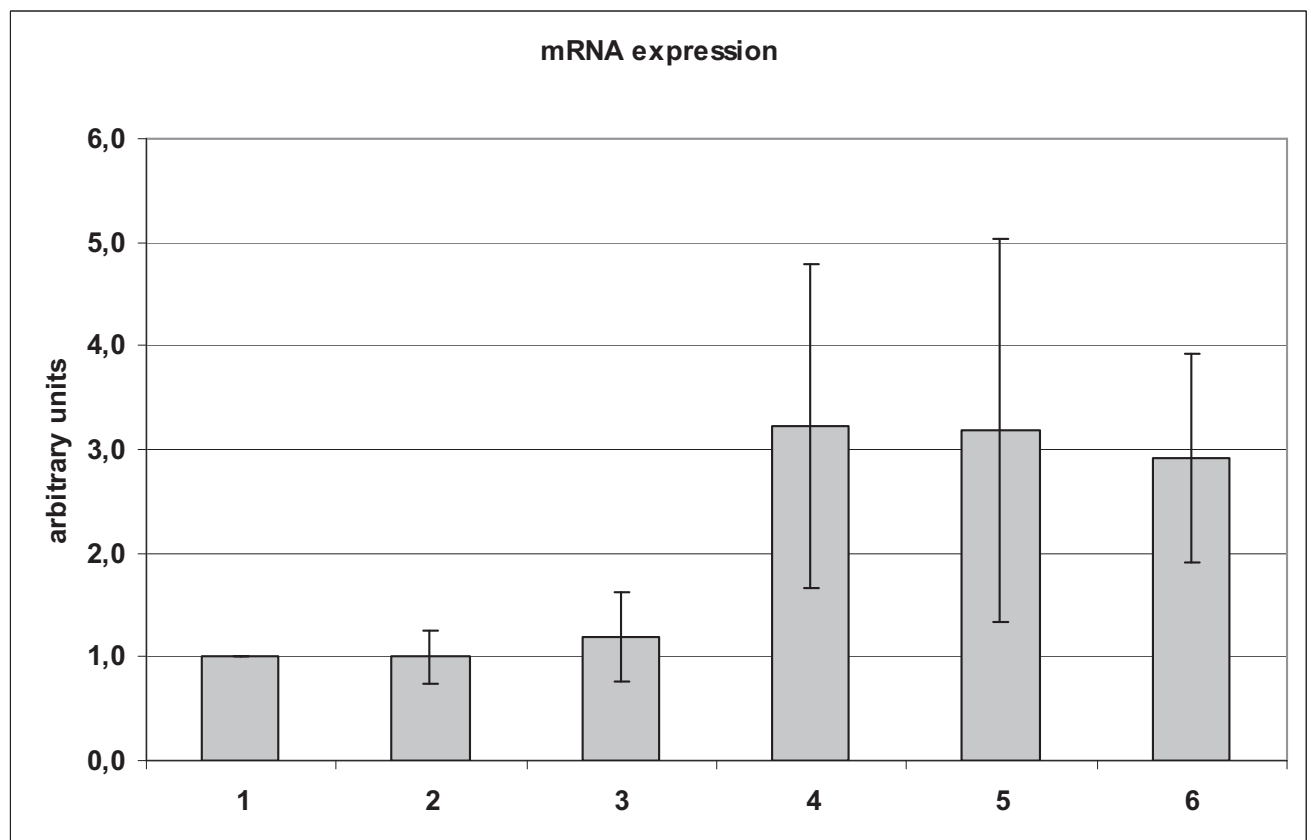


Figure 9b: EGFR protein expression

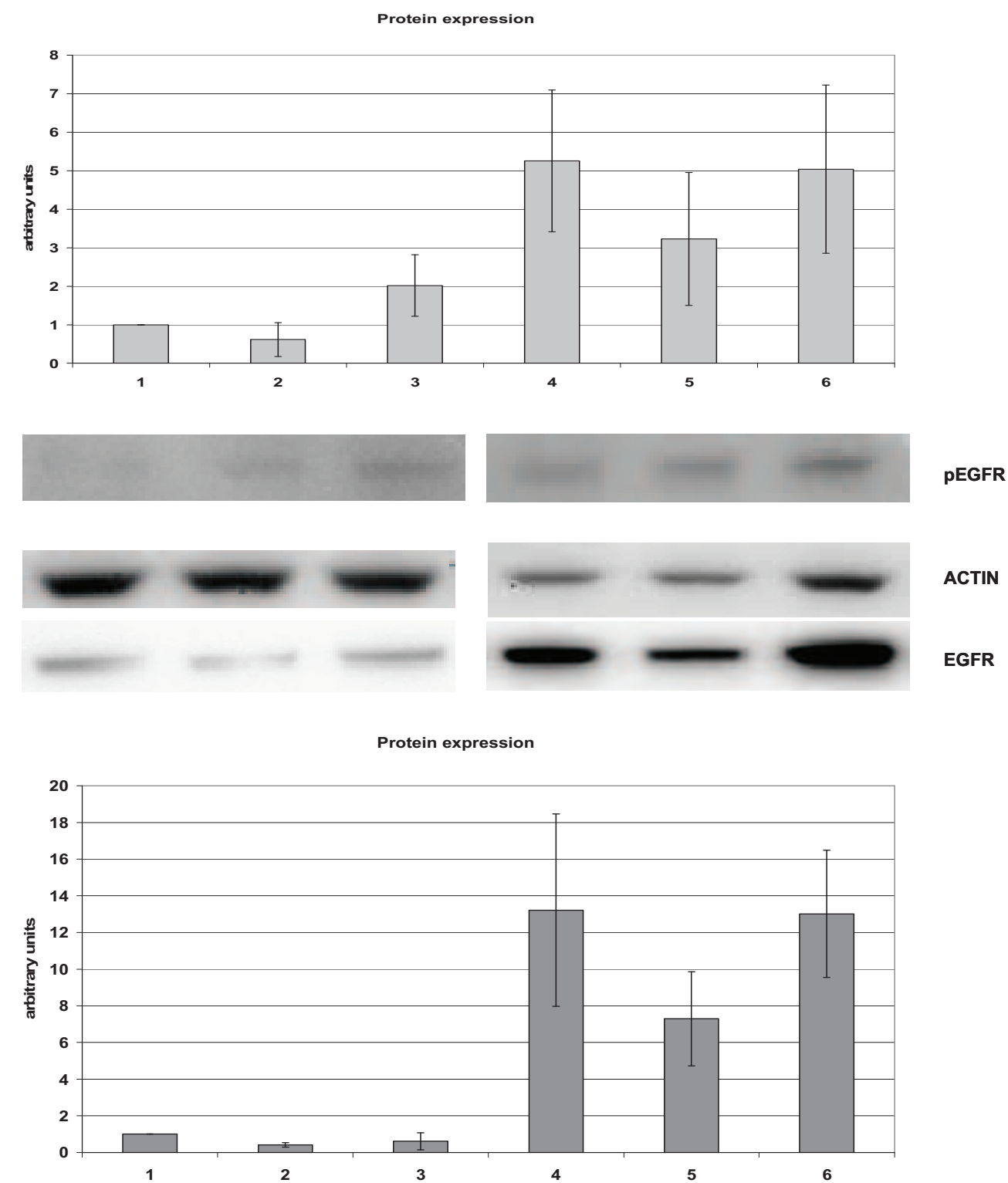
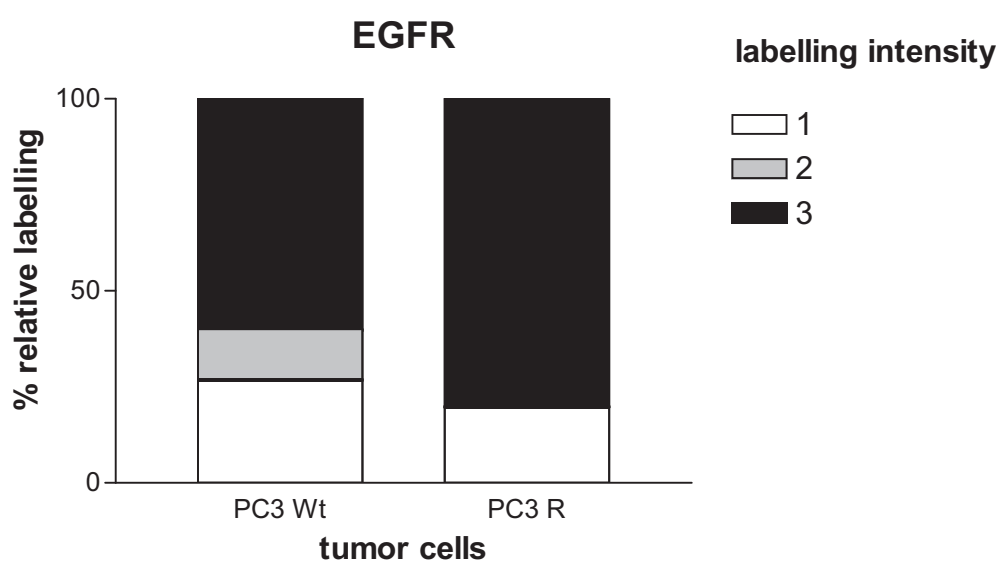


Figure 10



RESUME

Contexte et objectif

Le cancer de la prostate, premier cancer chez l'homme en France, a bénéficié largement des avancées thérapeutiques de la chirurgie, de la chimiothérapie, de la radiothérapie et, depuis une dizaine d'années, de l'hormonothérapie. Lorsque le cancer devient hormono-résistant, la chimiothérapie par docetaxel et prednisone est désormais le traitement de référence. Actuellement les traitements de deuxième ligne sont décevants et tout reste à faire. Notre travail a eu pour but d'évaluer l'impact de thérapies ciblées visant EGFR et VEGFR dans cette situation clinique actuellement très défavorable, données seules ou en association au docetaxel. Nous avons pour cela utilisé un modèle cellulaire PC3 xéno greffé sur la souris nude.

Matériels et méthodes

Un premier travail a consisté à tester l'efficacité anti-tumorale du sunitinib (agent anti-angiogénique), du cetuximab (agent anti-EGFR) et du docetaxel en monothérapies, bithérapies ou trithérapie in vivo, à partir d'une lignée cellulaire PC3 xéno greffée à la souris nude. Un deuxième travail a consisté à tester l'efficacité anti-tumorale du vandetanib (agent anti-VEGFR et anti-EGFR) associé ou non au docetaxel in vivo, à partir de deux lignées PC3 xéno greffées à la souris nude. Une lignée sauvage sensible au docetaxel, et une lignée résistante au docetaxel.

Résultats :

Dans notre premier travail, nous avons montré un effet supra-additif de l'association sunitinib – docetaxel et sunitinib - cetuximab, avec une bonne tolérance du traitement évaluée sur le poids des souris. Dans notre deuxième travail, le vandetanib n'a pas montré d'efficacité sur la souche sauvage, et même un effet activateur de croissance tumorale à faible dose. Sur la souche résistante, il n'a pas montré d'effet de resensibilisation au docetaxel. In vitro, il n'a pas montré d'effet modulateur sur MDR1.

Conclusion

Si le sunitinib a présenté des résultats intéressants dans le cadre de notre modèle préclinique pour le cancer de prostate hormono-résistant, il semble que le vandetanib soit à réserver éventuellement aux cancers de prostate hormono-résistants devenus docetaxel résistants, en deuxième ligne et en monothérapie, dans le cadre d'essais cliniques à venir.

ABSTRACT

Purpose

Prostate cancer is the first male cancer men in France. Clinical benefits were realized during the ten last year's concerning surgery, cytotoxic chemotherapy, hormoneotherapy and radiotherapy. The reference treatment for hormone-refractory prostate cancer combines docetaxel and prednisone. The current responses to second-line treatments are disappointing and considerable progress remains to be made. The aim of our studies was to test novel therapeutics approaches by combining docetaxel with EGFR and VEGFR targeting agents. Mice bearing well-established PC3 prostate tumors were used.

Methods

The aim of our first study was to test a rational therapeutic approach by combining docetaxel with an EGFR-targeting agent (cetuximab) and with an anti-angiogenic agent (sunitinib), using mice bearing PC3 prostate tumors.

The aim of our second study was to test a novel therapeutic approach by combining docetaxel with vandetanib, a dual EGFR and VEGFR targeting agent. Mice bearing docetaxel-sensitive-or-resistant PC3 were used.

Results

In our first study, supra-additive effects were observed with the sunitinib-docetaxel combination. Stable mean mouse weight suggested that no drug-induced toxicity was evident.

In our second study, vandetanib had growth-stimulation effects at the smallest concentration on PC3 wild type, and no effect concerning the other conditions on PC3 wild type. MDR1 was expressed in PC3 resistant only, but was neither modulated nor its action inhibited, by vandetanib in vitro.

Conclusion

Use of sunitinib might support innovative strategies in the management of hormone-refractory prostate cancer, in our preclinical model. Concerning vandetanib, it would be use for hormone-refractory prostate cancer only after relapse under docetaxel, as a second-line treatment.