

STUDI CLINICI SULL'EFFETTO ANTI-NEOPLASTICO DEGLI INIBITORI DI POMPA PROTONICA

Antonio Chiesi (a), Maria Lucia Marino (a), Martina Borghi (a), Luana Lugini (a), Licia Rivoltini (b), Michele Maio (c), Stefano Ferrari (d), Angelo De Milito (a), Stefano Fais (a)

(a) Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Istituto Nazionale Tumori, Milano

(c) Università degli Studi di Siena, Siena

(d) Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna

Introduzione

Otto Warburg, un pioniere nello studio della respirazione cellulare e grande studioso di metabolismo cellulare nel cancro, scoprì già nel 1920 che, anche in presenza di ossigeno, le cellule cancerose preferiscono metabolizzare glucosio per glicolisi, (effetto Warburg), benché quest'ultima, rispetto alla fosforilazione ossidativa, sia una via meno efficiente per la produzione di ATP. L'effetto Warburg è stato dimostrato in diversi tipi di tumori, e l'aumento dell'assorbimento di glucosio è stato recentemente sfruttato clinicamente per la rilevazione dei tumori per mezzo di tomografia ad emissione di positroni con fluorodesossiglucosio (FDG-PET). Oggi la glicolisi aerobica è generalmente accettata come un segno metabolico caratteristico e distintivo del cancro, seppure il suo rapporto di causalità con lo sviluppo e la progressione del cancro sia ancora oggetto di ricerca. Il Reparto Farmaci Antitumorali (RFA) dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), dedicato allo studio di nuovi approcci e nuovi farmaci nella terapia del cancro, ha focalizzato da alcuni anni la propria attività in ambito terapeutico sulle applicazioni cliniche dei principi Warburghiani relativi al metabolismo tumorale e in particolare alle implicazioni cliniche derivanti dalla comprensione delle dinamiche protoniche a livello tumorale e all'uso degli inibitori di pompa protonica (*Proton-pump inhibitor*, PPI) come chemosensibilizzanti. Il RFA conduce attività di ricerca di base e traslazionale e coordina diversi studi clinici multicentrici in oncologia, in Italia e all'estero.

Attività pre-clinica

L'attività di ricerca pre-clinica del RFA ha condotto ad importanti e significative scoperte e brevetti, dimostrando in particolare che: (i) il pre-trattamento con omeprazolo o esomeprazolo provoca una sensibilizzazione delle cellule di melanoma umano (*in vitro*) e melanomi (*in vivo*) ai chemioterapici (1); (ii) alte dosi di PPI, in condizioni di basso pH, inducono citotossicità in cellule di linfoma umane a cellule B e in modelli animali dello stesso tumore, secondo un *pathway* intracellulare molto particolare (2). Si rimanda agli articoli pubblicati dal gruppo per maggior dettaglio sui dati sperimentali. Più recentemente lo stesso gruppo ha dimostrato che (3):

- i PPI inducono effetti citotossici in cellule di melanoma, direttamente correlati con la riduzione del pH nel microambiente cellulare;
- l'effetto citotossico, che innesca fenomeni di apoptosi, indotto da PPI inizia con acidificazione del citosol e accumulo di ROS, seguito da attivazione delle caspasi, senza coinvolgimento di *pathway* mitocondriali. L'effetto citotossico appare quindi mediato

dall'inibizione del meccanismo che permette alle cellule tumorali di sopravvivere in condizioni di acidità, cioè l'attività delle pompe protoniche;

- i dati *in vitro*, in linea con i risultati ottenuti *in vivo* in modelli di xenotrapianto sub-cutaneo in topi SCID di melanoma umano, hanno dimostrato, usando la spettroscopia in risonanza magnetica, che il pH extracellulare (pHe) di melanomi umani è acido mentre è alcalino il pH intracellulare (pHi). Dopo trattamento con PPI il pHe si sposta verso la neutralità e il pHi diventa acido. Alla sospensione del trattamento con PPI il gradiente di pH del tumore torna ai valori originari. Ciò suggerisce una inibizione della crescita tumorale prodotta dal trattamento con PPI;
- la dose efficace *in vivo* è di circa 2,5 mg/kg/die, pari nell'uomo a circa 160-200 mg/die per un adulto di peso medio.

Restano tuttavia aperti importanti quesiti cui il RFA sta attualmente lavorando, tra cui:

- quale livello di acidità del tumore può impedire l'accesso di farmaci antineoplastici (basi deboli) all'interno delle cellule. Si ha evidenza infatti che il Cisplatino non entra nelle cellule di melanoma in coltura e che quella limitata quantità in grado di entrare finisce in vacuoli acidi espulsi in forma di esosomi. Ciò permetterebbe di capire come l'uso di PPI già da tempo introdotti nella pratica clinica come antiacidi e lo sviluppo di una nuova generazione di PPI possa favorire l'ingresso di chemioterapici all'interno delle cellule tumorali;
- se l'uso di PPI possa influenzare alcuni *pathway* delle cellule tumorali, tra cui il traffico esosomale. Si ha evidenza che i PPI inibiscono marcatamente il rilascio di esosomi da parte delle cellule tumorali;
- se l'uso di PPI possa aumentare l'efficacia sia della risposta immunitaria anti-tumorale che della immunoterapia adottiva. Studi preliminari condotti in collaborazione con il gruppo di Licia Rivoltini dell'Istituto Nazionale Tumori di Milano mostrano che i CTL specifici anti-tumore sono uccisi dall'acidità una volta raggiunto l'obiettivo;
- se l'uso dei PPI possa alterare la capacità invasiva e metastatica delle cellule di melanoma. È noto infatti che un basso pH è associato ad un aumento del potenziale metastatico delle cellule tumorali.

Attività clinica

Sulla base delle evidenze sperimentali della ricerca pre-clinica, il RFA ha avviato già a partire dal 2006 diversi studi clinici in cui sono utilizzati PPI, in associazione con la chemioterapia standard, con funzione di chemosensibilizzazione. Lo scopo è quello di aumentare la risposta dei pazienti alla chemioterapia standard, riducendone al contempo la tossicità. In particolare sono stati avviati 4 studi clinici in diverse forme tumorali: melanoma, osteosarcoma, e tumori del seno, prostata e tiroide. Una breve sinossi degli studi clinici condotti dal RFA è riportata in Tabella 1.

Tabella 1. Sinossi degli studi clinici condotti dal RFA dell'ISS sull'uso degli inibitori di pompa protonica nella terapia dei tumori

Titolo	Phase I-II trial with a fixed dose of cisplatin in combination with a dose-escalation of esomeprazole as first-line therapy of metastatic melanoma patients – m1a accessible disease	Phase II clinical study on efficacy of proton pump inhibitors pre-treatment in osteosarcoma patients undergoing chemotherapy	Randomized phase II clinical trial on the anticancer effects of omeprazole in association with second line chemotherapy (taxotere + cisplatin) in patients with metastatic and relapsing breast cancer	Phase II clinical study on high dose proton pump inhibitors in patients with advanced unresectable thyroid and prostate cancer
Codice Eudract o ClinTrial	Eudract: 2006-003978-10	Eudract: 2006-005179-17	ClinicalTrials.gov: NCT01069081	Eudract:
Sponsor	ISS e AstraZeneca casa madre	ISS e Agenzia Italiana dei Farmaci (AIFA)	ISS e Fudan University di Shanghai (Cina)	ISS ed Istituto Regina Elena in Roma
Centri clinici	Istituto Tumori di Milano; Policlinico Universitario Le Scotte di Siena; Ospedale S. Raffaele di Milano	Istituti Ortopedici Rizzoli di Bologna e centri clinici dell'Italian Sarcoma Group	Fudan University Cancer Hospital (FUCH)	Istituto Regina Elena in Roma
Obiettivo primario e valutazione dell'outcome	Valutazione dell'effetto chemosensibilizzante dei PPI. Risposta clinica dei pazienti valutata in termini di risposta clinica obiettiva secondo i criteri RECIST, durata della risposta e tempo di progressione. Risposta metabolica valutata come variazione dello Standardized Uptake Value (SUV) alla PET.	Valutazione dell'effetto chemosensibilizzante dei PPI. Risposta clinica dei pazienti valutata in termini di risposta clinica obiettiva secondo i criteri RECIST, durata della risposta e tempo di progressione. Risposta istologica valutata in relazione al grado di necrosi tumorale indotta nei campioni di tumore resecato.	Valutazione dell'effetto chemosensibilizzante dei PPI. Risposta clinica dei pazienti valutata in termini di risposta clinica obiettiva secondo i criteri RECIST, durata della risposta e tempo di progressione, in relazione al dosaggio di esomeprazole. Risposta metabolica valutata come variazione dello Standardized Uptake Value (SUV) alla PET.	Valutazione dell'effetto antineoplastico diretto dei PPI. Risposta clinica dei pazienti valutata in termini di risposta clinica obiettiva secondo i criteri RECIST, durata della risposta e tempo di progressione, in relazione al dosaggio di esomeprazole. Risposta metabolica valutata come variazione dello Standardized Uptake Value (SUV) alla PET.
Numero di pazienti	30, 10 per braccio	80, unico braccio (controllo storico)	90, 30 per braccio	200, unico braccio (controllo storico)

segue

continua

Titolo	Phase I-II trial with a fixed dose of cisplatin in combination with a dose-escalation of esomeprazole as first-line therapy of metastatic melanoma patients – m1a accessible disease	Phase II clinical study on efficacy of proton pump inhibitors pre-treatment in osteosarcoma patients undergoing chemotherapy	Randomized phase II clinical trial on the anticancer effects of omeprazole in association with second line chemotherapy (taxotere + cisplatin) in patients with metastatic and relapsing breast cancer	Phase II clinical study on high dose proton pump inhibitors in patients with advanced unresponsive thyroid and prostate cancer
Principali criteri di inclusione	Pazienti con melanoma in stadio IV elegibili ad una seconda linea di trattamento con Cisplatino	Pazienti con osteosarcoma di alto grado sottoposti a chemioterapia e resezione chirurgica del tumore	Pazienti con tumore del seno in stadio avanzato elegibili ad una seconda linea di trattamento con Taxotere e Cisplatino	Pazienti con tumore della tiroide e della prostata in stadio avanzato, che abbiano fallito la risposta ad ogni linea di trattamento approvata e che abbiano un'aspettativa di vita di almeno sei mesi
Bracci di trattamento	1. Cisplatino 2. Cisplatino + 80 mg di esomeprazole nei 2 giorni precedenti la chemioterapia 3. Cisplatino + 120 mg di esomeprazole nei 2 giorni precedenti la chemioterapia	1. Metotrexate + Cisplatino e Doxorubicina (controllo storico data la rarità della malattia) 2. Metotrexate + Cisplatino e Doxorubicina + 60 or 120 mg esomeprazole nei 2 giorni precedenti la chemioterapia	1. Taxotere + Cisplatino 2. Taxotere + Cisplatino + 160 mg omeprazole nei 3 giorni precedenti la chemioterapia + omeprazole in trattamento continuato intermittente nel corso degli intervalli dei cicli di chemioterapia 3. Taxotere + Cisplatino + 200 mg omeprazole nei 3 giorni precedenti la chemioterapia + omeprazole in trattamento continuato intermittente nel corso degli intervalli dei cicli di chemioterapia	I pazienti arruolati ricevono 200 mg/die di esomeprazole per tre giorni a settimana e per una durata complessiva di 12 mesi
Durata del trattamento	18 settimane	Chemioterapia adiuvante standard precedente la chirurgia	24 mesi	12 mesi
Durata dello studio	30 mesi	36 mesi	36 mesi	36 mesi
Stato	Terminato nella primavera 2010, report clinico del settembre 2010.	Terminato. Report clinico in fase di stesura.	In corso	In fase di avvio

Il razionale, comune a tutti gli studi clinici avviati, è che l'acidità del tessuto tumorale, che presenta un gradiente invertito rispetto ai tessuti normali (pHi acido nei tessuti normali e basico nel tessuto tumorale; pHe basico nei tessuti normali e acido nel tessuto tumorale), causata da una abnorme attivazione di pompe protoniche conseguenza del metabolismo glicolitico della cellula tumorale, è probabilmente uno dei principali meccanismi di *tumor escape* e di farmacoresistenza, causando sia protonazione dei farmaci chemioterapici nello spazio extracellulare che impedendone l'ingresso nelle cellule tumorali per uno sfavorevole gradiente di pH intra/extra cellulare. Pertanto il blocco delle pompe protoniche mediante PPI ha lo scopo di normalizzare il pH nel microambiente tumorale, ristabilendo condizioni favorevoli per l'azione antitumorale dei chemioterapici. Degli studi clinici avviati dal RFA, due sono conclusi, uno è in corso e uno è in fase di avvio. Nel primo studio, l'obiettivo principale era quello di incrementare la percentuale di pazienti con melanoma che presentano una buona risposta clinica al trattamento chemioterapico. In questo studio il trattamento di seconda linea con cisplatino in associazione ad esomeprazolo in pazienti con melanoma in stadio avanzato non ha chiaramente dimostrato di essere, in maniera statisticamente significativa, superiore al braccio con solo cisplatino per quanto riguarda la risposta nelle lesioni target e non target, sia cumulando sia frazionando il gruppo esomeprazolo, né in altri *end point* secondari come durata di risposta, tempo alla progressione di malattia, sopravvivenza globale. Tale risultato è stato condizionato dalla scarsa numerosità del campione studiato (30 soggetti, 10 per braccio) e dallo stadio clinico eccessivamente avanzato degli stessi che ha comportato l'uscita prematura dallo studio di ben 21 pazienti su trenta, alcuni fin dalle prime settimane di trattamento, per cause non correlate con il trattamento con PPI. Pur tuttavia, l'analisi dei dati ha consentito di osservare elementi di tendenziale maggiore efficacia del trattamento nel gruppo trattato con esomeprazolo evidenziando una più elevata frequenza di risposte sulle lesioni non target, una maggiore durata di risposta (CR+PR+SD) sulle lesioni target e non target (Figura 1), un tempo alla progressione più lungo (Figura 2) e una minore incidenza relativa di mortalità.

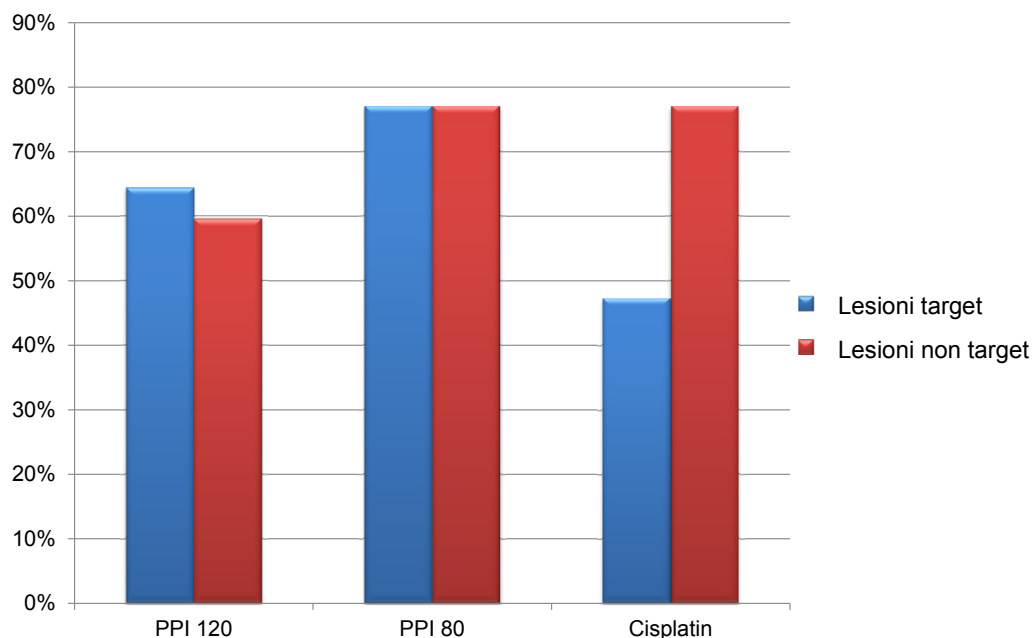


Figura 1. Durata della risposta (risposta completa+risposta parziale+stabilità)

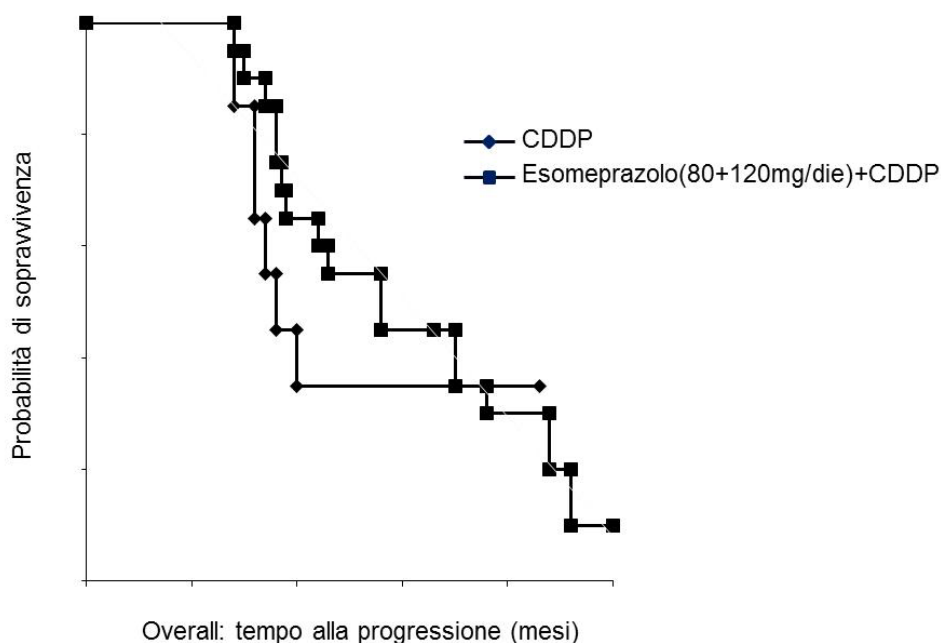


Figura 2. Tempo alla progressione (mesi) sulle lesioni target + non target

Nel secondo studio, l'obiettivo principale era quello di incrementare la percentuale di pazienti con osteosarcoma che presentano una buona risposta istologica ad un trattamento chemioterapico primario con cisplatino metotrexate, adriamicina e ifosfamide. Il trattamento dell'osteosarcoma prevede una fase di chemioterapia primaria cui segue la chirurgia della lesione primitiva. Successivamente alla rimozione della lesione il paziente viene sottoposto a chemioterapia post operatoria. Una delle principali ragioni dell'uso di chemioterapia primaria nell'osteosarcoma è la possibilità di valutare mediante esame istologico sul pezzo di resezione la necrosi tumorale indotta dalla chemioterapia, espressione della chemiosensibilità del tumore ai farmaci preoperatoriamente utilizzati. Casistiche storiche degli Istituti partecipanti alla sperimentazione mostravano che la percentuale di pazienti con una buona risposta istologica (necrosi tumorale chemio indotta $\geq 90\%$) era del 50%, senza significative differenze fra quanti avevano ricevuto una combinazione preoperatoria di 3 farmaci (Metotrexate, Cisplatino, Adriamicina) o di 4 farmaci (Metotrexate, Cisplatino, Adriamicina e Ifosfamide). L'obiettivo primario di questo studio quindi era quello di superare la percentuale di pazienti con buona risposta istologica alla combinazione dei 4 farmaci (50%). I risultati dell'analisi condotta su 98 pazienti valutati ha mostrato una buona risposta istologica (necrosi $\geq 90\%$) nel 57% dei pazienti con un incremento, seppur non statisticamente significativo, rispetto ai dati storici (49%). L'analisi della risposta nei sottotipi istologici, ha invece evidenziato in pazienti con osteosarcoma condroblastico, una variante di osteosarcoma nota per essere scarsamente responsiva alla chemioterapia, una percentuale di buone risposte istologiche più che doppia rispetto ai controlli storici: 61% vs 25 % (Tabella 2).

Tabella 2. Risposta istologica nei pazienti con osteosarcoma trattati con PPI rispetto ai controlli storici

Istologia	Necrosi	ISG/OS-1 (111 pazienti)	ISG/OS-PPI (98 pazienti)
Cumulativo	BR	56 (50%)	56 (57%)
	SR	55 (50%)	42 (43%)
Variante Osteoblastica	BR	37 (49%)	36 (55%)
	SR	38 (51%)	29 (45%)
Variante Condrolastica	BR	3 (25%)	11 (61%)
	SR	9 (75%)	7 (39%)
Variante Telangiectasica/ Fibroblastica	BR	16 (67%)	9 (60%)
	SR	8 (33%)	6 (40%)

BR=buona risposta; SR=scarsa risposta

In entrambe gli studi effettuati la tollerabilità agli alti dosaggi di PPI utilizzati è risultata molto buona, con qualche fenomeno a carico dell'apparato digerente, sostanzialmente legato ad ipocloridria gastrica (nausea, vomito e diarrea), prontamente risolto alla sospensione del trattamento.

Gli studi sul tumore al seno (Shangai) e sul tumore della tiroide e della prostata (Istituto Regina Elena, Roma) sono in corso e non si hanno ancora dati preliminari, che, per lo studio condotto in Cina, sono attesi per dicembre 2011.

Conclusioni e prospettive future

I risultati dei due studi conclusi, seppure condotti su piccoli numeri e in pazienti molto avanzati, sono incoraggianti e confermano i risultati ottenuti negli studi pre-clinici. In particolare l'evidenza della sorprendente risposta della variante condrolastica di sarcoma apre la strada a delle riflessioni importanti sulle caratteristiche chimico-farmaceutiche degli inibitori di pompa protonica oggi utilizzati. Fermo il dato sull'indiscussa efficacia *in vitro* e nei modelli animali di inibitori delle pompe protoniche (V-ATPasi e Anidrasi Carbonica IX), ampiamente descritti in letteratura anche dal nostro gruppo, resta per quanto riguarda i PPI, il quesito sulla miglior molecola da utilizzare in funzione delle caratteristiche di acidità del tessuto tumorale. I PPI sono infatti dei farmaci instabili a basso pH e attivati a pH acido, con breve emivita e lunga durata d'azione. La protonazione di due dei tre atomi di azoto (il piridinico e il benzimidazolico) di cui si compone una molecola di PPI sono necessari per la sua attivazione. Il pKa dell'azoto piridinico (pKa1) varia tra 3.83 (lansoprazolo e pantoprazolo) a 4.53 (rabeprazolo). Dal valore di pKa1 dipende il pH al quale l'azoto piridinico risulta in buona parte cationico ad un certo pH, intrappolando il farmaco nel sito di azione. Il pKa dell'azoto benzimidazolico (pKa2) è molto inferiore del pKa1 per tutti i PPI oggi noti e varia da 0,11 (pantoprazolo) a 0,79 (omeprazolo, esomeprazolo). Ciò significa che l'anello benzimidazolico viene protonato dopo l'anello piridinico e in misura molto minore. Quindi, più alto è il pKa2 maggiore è la tendenza dell'azoto benzimidazolico ad accettare protoni e divenire cationico. Peraltro, la protonazione dell'azoto benzimidazolico è indispensabile per l'attivazione dei PPI e tanto più veloce e consistente è questo passaggio tanto più efficiente è l'inattivazione delle pompe protoniche. È quindi evidente come il pKa dei PPI giochi un ruolo fondamentale nella loro attivazione al pH proprio in un determinato microambiente cellulare. I PPI oggi in commercio sono stati sviluppati per applicazioni in gastroenterologia (ulcera peptica e patologie legate ad una iperacidità gastrica), ma non per un uso in altre condizioni patologiche. Questo spiega perché in

particolare le forme tumorali che presentano un più elevato grado di acidità tissutale possano beneficiare dell'utilizzo dei farmaci oggi disponibili. La conoscenza e la valutazione delle condizioni di pH del microambiente tumorale sono quindi fondamentali sia per una corretta scelta del PPI da utilizzare che per una corretta previsione di efficacia in tumori diversi o in diversi stadi tumorali. Il disegno e la sintesi di PPI attivabili ad un più elevato pH è un passaggio indispensabile per un più ampio uso di questi farmaci nella terapia dei tumori. Un approccio combinato che consenta l'inibizione anche di altri meccanismi di trasporto protonico (2) consentirebbe probabilmente un miglior controllo della crescita tumorale interferendo con maggior efficacia con i meccanismi che consentono l'utilizzo di una via metabolica glicolitica ai tessuti tumorali.

In un futuro prossimo, l'approfondimento delle conoscenze sulle peculiarità e sulla vulnerabilità del metabolismo delle cellule tumorali consentirà l'identificazione di nuovi target terapeutici e la progettazione di nuovi farmaci antitumorali capaci di essere selettivamente captati dalle cellule tumorali o convertiti in forma attiva nei tumori. Allo stesso modo, lo studio del profilo metabolico e delle attività enzimatiche caratteristiche delle cellule tumorali potrà consentire di sviluppare nuovi test diagnostici per i tumori, mentre l'utilizzo di specifici metaboliti potrà essere utilizzato per l'*imaging* molecolare del cancro. Queste prospettive di sviluppo sia in ambito terapeutico che diagnostico sono estremamente suggestive e crediamo che lo studio delle dinamiche protoniche a livello del microambiente tumorale e, più in generale, del metabolismo tumorale e delle sue specificità siano fondamentali per arrivare ad un significativo *breakthrough* nella lotta ai tumori.

Bibliografia

1. Marino ML, Fais S, Djavaheiri-Mergny M, Villa A, Meschini S, Lozupone F, Venturi G, Della Mina P, Pattingre S, Rivoltini L, Codogno P, De Milito A. Proton pump inhibition induces autophagy as a survival mechanism following oxidative stress in human melanoma cells. *Cell Death Dis* 2010;1(10):e87.
2. Huber V, De Milito A, Harguindeguy S, Reshkin SJ, Wahl ML, Rauch C, Chiesi A, Pouyssegur J, Gatenby RA, Rivoltini L, Fais S. Proton dynamics in cancer. *J Transl Med* 2010;8:57.
3. Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, Coscia C, Iessi E, Logozzi M, Molinari A, Colone M, Tatti M, Sargiacomo M, Fais S. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* 2009;284(49):34211-22.
4. De Milito A, Canese R, Marino ML, Borghi M, Iero M, Villa A, Venturi G, Lozupone F, Iessi E, Logozzi M, Della Mina P, Santinami M, Rodolfo M, Podo F, Rivoltini L, Fais S. pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. *Int J Cancer* 2010;127(1):207-19.
5. Fais S, De Milito A, You H and Qin W. *Targeting* Vacuolar H⁺ ATPases as a New Strategy against Cancer. *Cancer Res* 2007;67(22):10627-30.
6. Peggy P. Hsu and David M. Sabatini. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell* 2008;134:703-07.
7. De Milito A, Iessi E, Logozzi M, Lozupone F, Spada M, Marino ML, Federici C, Perdicchio M, Matarrese P, Lugini L, Nilsson A, Fais S. Proton Pump Inhibitors Induce Apoptosis of Human B-Cell Tumors through a Caspase-Independent Mechanism involving Reactive Oxygen Species. *Cancer Res* 2007;67(11):5408-17.
8. Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 2007;8:917-29.

9. De Milito A, Fais S. Proton pump inhibitors may reduce tumour resistance. *Expert Opin Pharmacother* 2005;6(7):1-6.
10. De Milito A, Fais S. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. *Future Oncol* 2005;1(6):779-86.
11. Luciani F, Spada M, De Milito A, Molinari A, Rivoltini L, Montinaro A, Marra A, Lugini L, Logozzi M, Lozupone F, Federici C, Iessi E, Parmiani G, Arancia G, Belardelli F, Fais S. Effect of Proton Pump Inhibitor Pretreatment on Resistance of Solid Tumors to Cytotoxic Drugs. *Journal of the National Cancer Institute* 2004;96(22):1702-13.
12. Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, Ise T, Murakami T, Yoshida T, Nomoto M, Kohno K. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treatment Reviews* 2003;29:541-49.
13. Harguindey S, Arranz JL, Wahl ML, Orive G, Reshkin SJ. Proton transport inhibitors as potentially selective anticancer drugs. *Anticancer Res* 2009;29(6):2127-36.