



Cáncer de mama HER2⁺: mecanismos de resistencia a tratamientos dirigidos y nuevas dianas terapéuticas

TESIS DOCTORAL

Lucía Gandullo Sánchez

CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL CÁNCER
CSIC-UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Salamanca, 2021

D. Atanasio Pandiella Alonso, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

CERTIFICA

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Cáncer de mama HER2⁺: mecanismos de resistencia a tratamientos dirigidos y nuevas dianas terapéuticas” presentada por Dña. Lucía Gandullo Sánchez, graduada en Bioquímica por la Universidad de Sevilla y Universidad de Málaga, ha sido realizada bajo su dirección en el Centro de Investigación del Cáncer-Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CIC-IBMCC), centro mixto de la Universidad de Salamanca y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca a 25 de octubre de 2021.

Fdo: Atanasio Pandiella Alonso
Director de la tesis doctoral

A Juanfran
A mi familia

*“La ciencia siempre vale la pena porque sus descubrimientos,
tarde o temprano,
siempre se aplican”*

Severo Ochoa

ÍNDICE

ABREVIATURAS	IX
INTRODUCCIÓN	17
1. RECEPTORES TIROSINA QUINASA DE LA FAMILIA ErbB/HER.....	19
1.1. Componentes de la familia	19
1.2. Estructura	19
1.3. Activación	20
1.4. Ligandos de los receptores ErbB/HER.....	22
1.5. Vías de señalización.....	23
1.6. Inactivación de los receptores ErbB/HER	25
1.7. Relación entre los receptores ErbB/HER y cáncer.....	26
1.7.1. <i>EGFR</i>	27
1.7.2. <i>HER2</i>	27
1.7.3. <i>HER3</i>	28
1.7.4. <i>HER4</i>	29
1.7.5. <i>Papel de los receptores ErbB/HER en la generación de resistencia</i>	30
1.8. Terapias dirigidas contra los receptores ErbB/HER.....	31
2. CÁNCER DE MAMA	33
2.1. Epidemiología	33
2.2. Clasificación del cáncer de mama.....	34
2.2.1. <i>Clasificación según el perfil molecular. Subtipos moleculares</i>	34
2.2.1.1. <i>Subtipo luminal: luminal A y luminal B</i>	34
2.2.1.2. <i>HER2-enriched (HER2-E)</i>	35
2.2.1.3. <i>Basal-like</i>	36
2.2.1.4. <i>Normal breast-like</i>	36
2.2.1.5. <i>Claudin-low</i>	37
2.2.2. <i>Clasificación mediante inmunohistoquímica. Subtipos histológicos</i>	37
2.3. Tratamiento.....	38
3. TERAPIAS DIRIGIDAS EN CÁNCER DE MAMA HER2 ⁺	39
3.1. Anticuerpos monoclonales	39
3.1.1. <i>Trastuzumab</i>	39
3.1.2. <i>Pertuzumab</i>	40
3.1.3. <i>Margetuximab</i>	41
3.2. Inhibidores tirosina quinasa.....	41

3.2.1. <i>Lapatinib</i>	42
3.2.2. <i>Neratinib</i>	42
3.2.3. <i>Tucatinib</i>	43
3.3. Anticuerpos conjugados a fármaco.....	43
3.3.1. <i>Componentes de un ADC</i>	43
3.3.2. <i>T-DM1</i>	45
3.3.3. <i>T-DXd</i>	48
4. MECANISMOS DE RESISTENCIA A T-DM1.....	48
4.1. Tipos de resistencia.....	48
4.2. Alteraciones en HER2.....	49
4.3. Alteraciones en la internalización de T-DM1.....	51
4.4. Alteraciones a nivel lisosomal.....	52
4.5. Aumento de la expresión y actividad de bombas de expulsión de fármacos.....	53
4.6. Aumento de la producción de ligandos y activación de RTK alternativos.....	53
4.7. Alteraciones en proteínas implicadas en vías celulares.....	54
OBJETIVOS.....	57
MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
1. REACTIVOS.....	63
2. ANTICUERPOS.....	63
1.1. Conjugación de anticuerpos a SMCC-DM1.....	65
3. CULTIVOS CELULARES.....	65
3.1. Líneas celulares.....	65
3.2. Condiciones de cultivo y mantenimiento.....	66
3.3. Preservación de líneas celulares.....	66
3.4. Generación de líneas resistentes a terapias anti-HER2.....	67
4. INFECCIONES VIRALES.....	68
5. CONTAJE CELULAR. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR.....	69
6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	70
6.1. Preparación de lisados celulares.....	70
6.2. Preparación de extractos a partir de muestras humanas y animales.....	70
6.3. Inmunoprecipitación.....	71
6.4. Inmunoprecipitación de superficie.....	71
6.5. Electroforesis y detección de proteínas. Western blot.....	72
6.6. Etiquetado con biotina e internalización de EV20/MMAF.....	73
7. INMUNOFLUORESCENCIA.....	74

7.1.	Internalización de EV20/MMAF	74
7.2.	Análisis de colocalización entre EV20/MMAF y LAMP1	75
7.3.	Análisis del número de células mitóticas.....	75
8.	CITOMETRÍA.....	76
8.1.	Ciclo celular	76
8.2.	Apoptosis	77
8.3.	Marcaje de superficie celular	78
9.	ESTUDIOS IN VITRO	78
9.1.	Medición de la actividad de caspasa 3.....	78
10.	ESTUDIOS EN MODELOS ANIMALES	79
10.1.	Cepas de ratón y mantenimiento de los animales	79
10.2.	Producción de xenoinjertos	79
11.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	80
	RESULTADOS	81
	CAPÍTULO 1. EV20/MMAF, UN ANTICUERPO CONJUGADO A FÁRMACO, EN RESISTENCIA A TERAPIAS ANTI-HER2.....	83
1.	DETERMINACIÓN DE HER3 COMO POSIBLE DIANA EN CÁNCER DE MAMA HER2+	85
1.1.	Estado de los receptores ErbB/HER en líneas de cáncer de mama HER2+ resistentes a trastuzumab	85
1.2.	Niveles de HER3 en tumores de pacientes con cáncer de mama HER2+	86
2.	EV20/MMAF, UN ANTICUERPO CONJUGADO A FÁRMACO ANTI-HER3	86
3.	ACCIÓN DE EV20/MMAF EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HER2+ CON SENSIBILIDAD, RESISTENCIA PRIMARIA Y SECUNDARIA A TRASTUZUMAB	87
3.1.	Efecto de EV20/MMAF y sus componentes en las líneas BT474 y BTRH.....	87
3.1.1.	<i>Niveles de HER3 en superficie en las líneas BT474 y BTRH.....</i>	88
3.2.	Efecto de EV20/MMAF en un clon con resistencia secundaria a trastuzumab	89
3.3.	Efecto de EV20/MMAF en un modelo PDX con resistencia secundaria a trastuzumab	90
3.4.	Efecto de EV20 y EV20/MMAF en un panel de células de cáncer de mama HER2+.....	92
4.	EFEECTO DE LA NRG EN LA ACTIVIDAD DE EV20/MMAF.....	93
5.	RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE HER3 O pHER3 Y LA ACCIÓN DE EV20/MMAF.....	94

5.1.	Análisis de correlación entre el nivel de HER3 y la IC ₅₀ de EV20/MMAF en líneas de cáncer de mama HER2 ⁺	94
5.2.	Análisis de correlación entre el nivel de pHER3 y la IC ₅₀ de EV20/MMAF en líneas de cáncer de mama HER2 ⁺	94
5.3.	Efecto de EV20/MMAF en células con bajo nivel de expresión de HER3.....	95
5.4.	Análisis del silenciamiento de HER3 y su efecto sobre la acción de EV20/MMAF en BT474.....	96
6.	ESTUDIO DE LA INTERNALIZACIÓN DE EV20/MMAF EN LAS LÍNEAS CELULARES BT474 Y BTRH.....	96
6.1.	Análisis de la llegada de EV20/MMAF a los lisosomas	97
6.1.1.	<i>Internalización de pHrodo-EV20/MMAF</i>	99
6.2.	Internalización de EV20/MMAF marcado con biotina	101
7.	EFEECTO DE EV20/MMAF Y TRASTUZUMAB SOBRE LOS NIVELES DE HER2 Y HER3 DE BT474 Y BTRH	102
8.	ANÁLISIS DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE EV20/MMAF EN LAS LÍNEAS CELULARES BT474 Y BTRH.....	103
8.1.	Efecto de EV20/MMAF en el ciclo celular	103
8.2.	Efecto de EV20/MMAF en la formación del huso mitótico	103
8.3.	Efecto de EV20/MMAF en la apoptosis.....	104
9.	EFEECTO DE EV20/MMAF EN ESTUDIOS IN VIVO Y EN OTROS MODELOS DE RESISTENCIA A TERAPIAS ANTI-HER2	105
9.1.	Efecto de EV20/MMAF in vivo en el modelo de resistencia secundaria a trastuzumab generado con las células BTRH	105
9.1.1.	<i>Distribución tisular de EV20/MMAF</i>	106
9.1.2.	<i>Efecto de EV20/MMAF en tumores BTRH.....</i>	107
9.1.3.	<i>Seguimiento del crecimiento tumoral a largo plazo</i>	108
9.1.4.	<i>Cambio en la dosificación de EV20/MMAF y su efecto en tamaños tumorales grandes.....</i>	109
9.2.	Efecto de EV20/MMAF in vivo en el modelo de resistencia secundaria a trastuzumab generado con las células BTRH#10	109
9.2.1.	<i>Seguimiento del crecimiento tumoral a largo plazo</i>	110
9.2.2.	<i>Efecto de EV20/MMAF en tumores de gran tamaño</i>	111
9.3.	Efecto de EV20/MMAF in vivo en el modelo de resistencia primaria a trastuzumab generado con las células HCC1954	112
9.4.	Efecto de EV20/MMAF en modelos de resistencia secundaria a lapatinib, neratinib y T-DM1	112
9.4.1.	<i>Acción de EV20/MMAF in vitro en modelos de resistencia secundaria a lapatinib</i>	113

9.4.2. Acción de EV20/MMAF in vitro en modelos de resistencia secundaria a neratinib	113
9.4.3. Acción de EV20/MMAF in vitro en modelos de resistencia secundaria a T-DM1	114
9.4.4. Acción de EV20/MMAF in vivo en un modelo de resistencia secundaria a T-DM1	115
9.4.4.1. Seguimiento del crecimiento tumoral a largo plazo	116
9.4.4.2. Efecto de EV20/MMAF en tumores de gran tamaño	116
DISCUSIÓN	117
CAPÍTULO 1. EV20/MMAF, UN ANTICUERPO CONJUGADO A FÁRMACO, EN RESISTENCIA A TERAPIAS ANTI-HER2	119
CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA	133
FINANCIACIÓN	161
AGRADECIMIENTOS	165
ANEXOS	171

ABREVIATURAS

A

ABC	<i>ATP-binding cassette</i> , casete de unión a ATP
ABCP	<i>placental ABC transporter</i> , transportador ABC en placenta
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i> , desintegrina y metaloproteasa
ADC	<i>antibody-drug conjugate</i> , anticuerpo conjugado a fármaco
ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> , citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>

B

BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , ácido bicinconínico
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i> , proteína de resistencia al cáncer de mama
BRCA1/2	<i>breast cancer susceptibility gene 1/2</i> , proteína de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 1 ó tipo 2
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , albúmina de suero bovino
BTC	<i>betacellulin</i> , betacelulina
BTRH	BT474 resistente a herceptina
BTRL	BT474 resistente a lapatinib
BTRN	BT474 resistente a neratinib
BT-TDM1R	BT474 resistente a T-DM1

C

CAV1	<i>caveolin-1</i> , caveolina-1
CANX	<i>calnexin</i> , calnexina
CDK1	<i>cyclin dependent kinase 1</i> , quinasa 1 dependiente de ciclina
CHAPS	<i>3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfate</i> , <i>3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato</i>
CK	<i>cytokeratin</i> , citoqueratina
CPNM	cáncer de pulmón no microcítico
CSPG5	<i>chondroitin sulfate proteoglycan 5</i> , proteoglicano 5 condroitín sulfato
Cy	<i>cyanine</i> , cianina

D

DAR	<i>drug-to-antibody ratio</i> , relación fármaco-anticuerpo
DXd	deruxtecan
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> , medio de Eagle modificado de Dulbecco

DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i> , dimetilsulfóxido
DM1	<i>mertansine</i> , mertansina
DTT	<i>dithiothreitol</i> , ditiotreitól

E

ECD	<i>extracellular domain</i> , dominio extracelular
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , ácido etilendiaminotetraacético
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , factor de crecimiento epidérmico
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMA	<i>European Medicines Agency</i> , Agencia Europea de Medicamentos
EPG	<i>epithelial mitogen</i> , epigen
EPR	<i>epiregulin</i> , epiregulina
ER	<i>estrogen receptor</i> , receptor de estrógenos
ErbB	<i>avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i> , homólogo del oncogén viral de la leucemia eritroblástica aviar

F

FBS	<i>fetal bovine serum</i> , suero bovino fetal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i> , isotiocianato de fluoresceína

G

GAB1	<i>GRB2 associated binding protein 1</i> , proteína 1 de unión asociada a GRB2
GBM	glioblastoma
GEDs	genes expresados diferencialmente
GRB	<i>growth factor receptor bound protein</i> , proteína unida al receptor del factor de crecimiento

H

HB-EGF	<i>heparin binding EGF like growth factor</i> , factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> , ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i> , receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
HER2 ⁺	HER2 positivo

HER2-E	<i>HER2-enriched</i> , HER2 enriquecido
HR ⁺	<i>hormone receptor positive</i> , receptores hormonales positivo
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , peroxidasa de rábano

I

IC ₅₀	<i>half maximal inhibitory concentration</i> , concentración media inhibitoria
IF	<i>immunofluorescence</i> , inmunofluorescencia
IGF1R	<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i> , receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
IgG	<i>immunoglobulin G</i> , inmunoglobulina G
IHC	<i>immunohistochemistry</i> , inmunohistoquímica
IP	<i>immunoprecipitation</i> , inmunoprecipitación

K

KRH	<i>Krebs-Ringer-HEPES buffer</i> , tampón Krebs-Ringer-HEPES
-----	--

N

NRG	<i>neuregulin</i> , neuregulina
NGC	<i>neuroglycan C</i> , neuroglicano C
NK	<i>natural killer (cells)</i> , (células) naturales asesinas

L

LAMP1	<i>lysosomal-associated membrane protein 1</i> , proteína 1 de membrana asociada a lisosoma
LIFR	<i>leukemia inhibitory factor receptor</i> , receptor del factor inhibidor de la leucemia
Lys	<i>lysine</i> , lisina

M

mAb	<i>monoclonal antibody</i> , anticuerpo monoclonal
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> , proteína quinasa activada por mitógeno
MCC	<i>4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate</i> , 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato
MDR1	<i>multidrug resistance protein 1</i> , proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos
MMAF	<i>monomethyl auristatin F</i> , monometil auristatina F

MRP1	<i>multidrug resistance-associated protein 1</i> , proteína 1 asociada a resistencia a múltiples fármacos
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> , diana de la rapamicina en mamíferos
MXR	<i>mitoxantrone resistance</i> , resistencia a la mitoxantrona

O

OS	<i>Overall survival</i> , supervivencia global
----	--

P

PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , tampón fosfato salino
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i> , proteína de muerte celular programada 1
P-DM1	pertuzumab-DM1
PDX	<i>patient-derived xenograft</i> , xenoinjerto derivado de paciente
PFS	<i>progression free survival</i> , supervivencia libre de progresión
P-gp	<i>p-glycoprotein 1</i> , glucoproteína de permeabilidad
PI	<i>propidium iodide</i> , yoduro de propidio
PIP3	<i>phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate</i> , fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato
PIK3CA	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i> , subunidad catalítica de PI3K
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> , fosfatidilinositol 3-quinasa
PLK1	<i>polo-like kinase 1</i> , quinasa tipo polo 1
PLC γ	<i>phospholipase C γ</i> , fosfolipasa C γ
PR	<i>progesterone receptor</i> , receptor de progesterona
PS	<i>phosphatidylserine</i> , fosfatidilserina
PTB	<i>phospho-tyrosine-binding domain</i> , dominio de unión a fosfotirosina
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i> , homólogo de fosfatasa y tensina
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i> , difluoruro de polivinilideno

R

ROR1	<i>receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1</i> , receptor huérfano 1 similar al receptor tirosina quinasa
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTK	<i>receptor tyrosine kinase</i> , receptor tirosina quinasa

S

SD	<i>standard deviation</i> , desviación estándar
----	---

SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SEM	<i>standard error of the mean</i> , error estándar de la media
Ser	<i>serine</i> , serina
shRNA	<i>short hairpin RNA</i> , ARN en horquilla corto
SH2	<i>Src homology domain 2</i> , dominio de homología Src 2
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i> , transductor de señales y activador de transcripción

T

TACE	<i>tumor necrosis factor α converting enzyme</i> , enzima convertidora del factor de necrosis tumoral α
TBST	<i>Tris-buffer saline with Tween</i> , tampon Tris salino con <i>Tween</i>
T-DM1	<i>trastuzumab emtansine</i> , trastuzumab emtansina
T-DXd	trastuzumab deruxtecan
TGF α	<i>transforming growth factor α</i> , factor de crecimiento y transformación de tipo α
TGF β	<i>transforming growth factor β</i> , factor de crecimiento y transformación de tipo β
Thr	<i>threonine</i> , treonina
TKI	<i>tyrosine kinase inhibitor</i> , inhibidor de tirosina quinasa
TNBC	<i>triple-negative breast cancer</i> , cáncer de mama triple negativo
Tyr	<i>tyrosine</i> , tirosina

V

VEGF(R)	<i>vascular endothelial growth factor (receptor)</i> , (receptor del) factor de crecimiento de endotelio vascular
v-erbB	<i>avian erythroblastic leukemia viral</i> , leucemia eritroblástica aviar viral

W

WB	<i>Western blot</i>
----	---------------------

INTRODUCCIÓN

1. RECEPTORES TIROSINA QUINASA DE LA FAMILIA ErbB/HER

1.1. Componentes de la familia

La familia ErbB/HER de receptores tirosina quinasa (RTK, *receptor tyrosine kinase*) incluye el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *epidermal growth factor receptor*), también denominado HER1 (*human epidermal growth factor receptor 1*, receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 1) o ErbB1 (*avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog*, homólogo del oncogén viral de la leucemia eritroblástica aviar), HER2/ErbB2/neu, HER3/ErbB3 y HER4/ErbB4. Estos receptores se expresan fisiológicamente en tejido epitelial, mesenquimal, cardíaco y neuronal (Olayioye *et al.*, 2000). El miembro fundador de esta familia de RTKs fue EGFR, descubierto en 1982 por Stanley Cohen y colaboradores (Cohen *et al.*, 1982). Posteriormente fueron descubiertos los otros miembros de la familia: HER2 (Coussens *et al.*, 1985), HER3 (Kraus *et al.*, 1989) y finalmente, HER4 (Plowman *et al.*, 1993). La denominación de esta familia se basó en la homología que presentaba EGFR con la proteína v-erbB (*avian erythroblastic leukemia viral*, leucemia eritroblástica aviar viral), producto del oncogén del virus de la leucemia eritroblástica aviar (Downward *et al.*, 1984).

1.2. Estructura

Todos los receptores de la familia ErbB/HER poseen la misma estructura molecular. Estos receptores constan de un gran dominio extracelular (ECD, *extracellular domain*), un solo segmento transmembrana hidrofóbico y un dominio intracelular que consta a su vez de un dominio yuxtamembrana, un dominio tirosina quinasa y una cola C-terminal rica en residuos tirosina (Figura 1). El dominio extracelular está formado a su vez por cuatro subdominios, denominados dominios I-IV, que se reorganizan en dos conformaciones diferentes en función de la presencia o ausencia del ligando (Burgess *et al.*, 2003). Los dominios I y III, que son segmentos ricos en leucina, tienen plegamiento β -helicoidal y representan las regiones de unión al ligando. El dominio II, donde está presente el brazo de dimerización, participa en la formación de homo- y heterodímeros entre los miembros de la familia ErbB/HER (Lemmon & Schlessinger, 2010; Yarden, 2001).

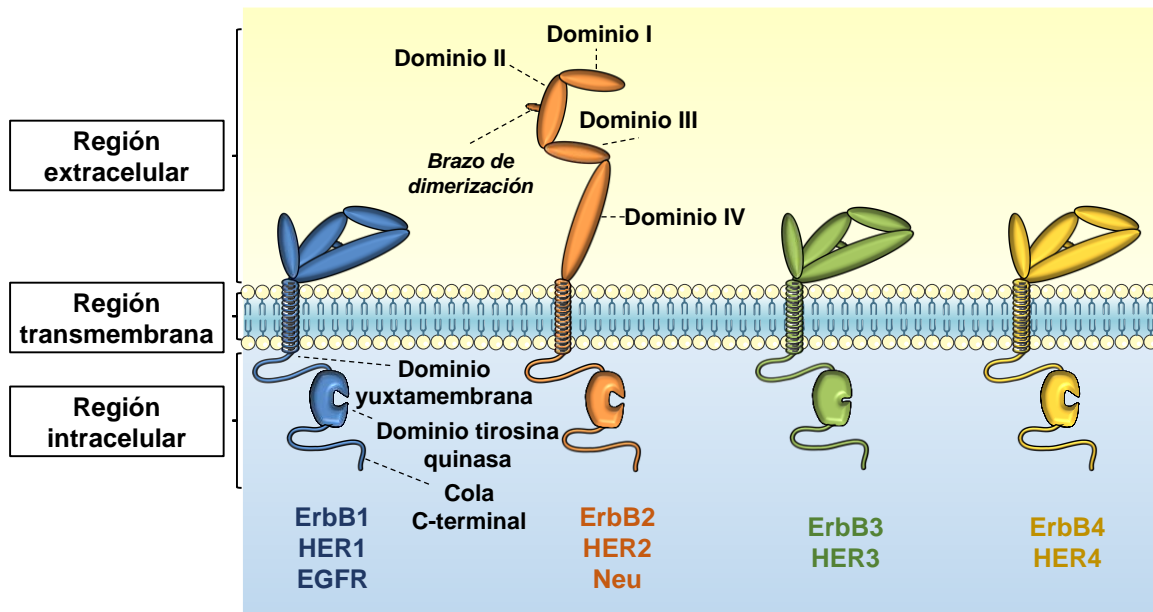


Figura 1. Representación de la estructura de los miembros de la familia ErbB/HER. Esta familia está formada por cuatro miembros. Cada miembro está compuesto por una región extracelular, una región transmembrana y una región intracelular. La región extracelular, a su vez, está formada por cuatro subdominios (I-IV). La región intracelular contiene el dominio yuxtamembrana, el dominio tirosina quinasa y la cola C-terminal con residuos fosforilables.

1.3. Activación

En ausencia de ligando, una interacción intramolecular entre los dominios II y IV mantiene una conformación inactiva o cerrada (Cho & Leahy, 2002). En presencia de ligando, los receptores adquieren una conformación activa o abierta en la que la reubicación de los dominios I y III dan como resultado la formación de un bolsillo de unión al ligando que permite interacciones entre estos dominios y una única molécula de ligando. Además, en el dominio II, el brazo de dimerización queda expuesto, lo que le permite interactuar con otro monómero para formar dímeros (Figura 2) (Burgess *et al.*, 2003).

Cuando el ligando se une a los receptores ErbB/HER, se produce un cambio conformacional de los mismos adquiriendo las conformaciones activas e interaccionando de manera antiparalela entre sus dominios II a través del brazo de dimerización. Debido a esto, los dos dominios quinasa tienen una interacción asimétrica de "cabeza a cola" en la que una quinasa activa alostéricamente a la otra. Luego, el dominio quinasa activado cataliza la transfosforilación de los residuos de tirosina de la cola C-terminal del monómero asociado (Zhang *et al.*, 2006). Además, se producen autofosforilaciones y transfosforilaciones recíprocas entre los componentes del dímero de receptores ErbB/HER. Estos residuos fosforilados crean sitios de acoplamiento para proteínas adaptadoras involucradas en las vías de

señalización aguas abajo. La asociación puede darse entre monómeros del mismo receptor (homodimerización) o con otro miembro de la familia ErbB/HER (heterodimerización) (Linggi & Carpenter, 2006; Roskoski, 2014a; Zhang *et al.*, 2006).

A pesar de que el mecanismo de activación es similar entre los receptores ErbB/HER, existen algunas peculiaridades entre los miembros de la familia. HER3 tiene una actividad quinasa débil. Es capaz de unir ATP y autofosforilarse, pero no de fosforilar sustratos exógenos (Jura *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2010). HER3 a su vez no se creía capaz de formar homodímeros (Berger *et al.*, 2004). Sin embargo, recientemente se han descrito homodímeros de HER3 (Pawar & Sengupta, 2019; Steinkamp *et al.*, 2014; Váradi *et al.*, 2019), aunque aparentemente no son funcionales debido a la débil actividad quinasa de HER3. A pesar de ello, HER3 dimeriza con otros miembros de la familia ErbB/HER, preferentemente HER2. Además, también se ha visto que HER2 y HER3 pueden formar heterodímeros independientes de ligando en células HER2 positivas (Junttila *et al.*, 2009). Por su parte, HER2 difiere significativamente de los otros miembros de la familia ErbB/HER en que no tiene ligando conocido y existe en una conformación abierta y parcialmente activa, observándose también homodímeros de HER2 en las células que sobreexpresan HER2 (Olayioye *et al.*, 2000; Roskoski, 2014b).

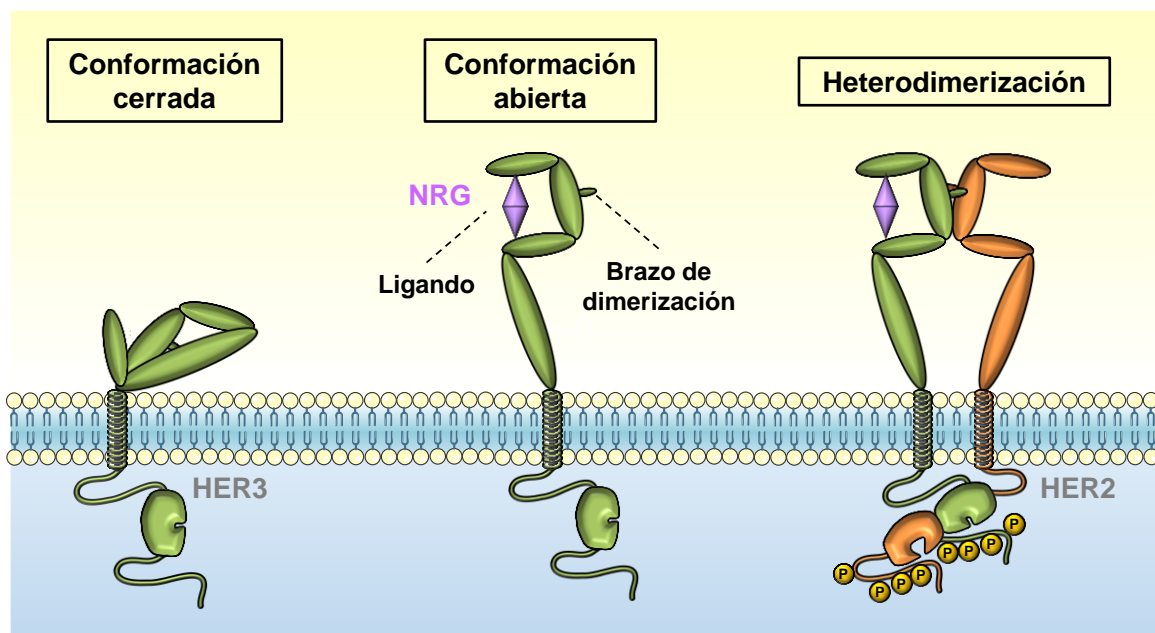


Figura 2. Representación esquemática de los cambios estructurales y la activación de los receptores ErbB/HER. Cuando el ligando se une a los subdominios I y III se induce un cambio conformacional en el dominio extracelular, quedando el brazo de dimerización expuesto. Gracias a ello, el receptor puede dimerizar con otro miembro de la familia en conformación abierta (heterodimerización) u otro receptor idéntico (homodimerización).

1.4. Ligandos de los receptores ErbB/HER

Los ligandos de los receptores de la familia ErbB/HER pertenecen a la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*) y se sintetizan como proteínas integrales de membrana. Estos precursores de ligandos constan de un componente extracelular, un segmento transmembrana y una pequeña porción intracelular (Gullick, 2001). Una característica de toda la familia de ligandos peptídicos EGF es que comparten un dominio EGF de aproximadamente 50 aminoácidos que es necesario y suficiente para la activación de los receptores ErbB/HER (Barbacci *et al.*, 1995). La región extracelular de los precursores es escindida proteolíticamente por proteasas, principalmente miembros de la familia ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*), liberando la forma soluble activa de la superficie celular al medio extracelular (Blobel, 2005; Massague & Pandiella, 1993; Schafer *et al.*, 2004). Las formas maduras solubles liberadas son entonces capaces de unirse a receptores de la propia célula que los sintetizan (señalización autocrina) o de células próximas (señalización paracrina). Sin embargo, los precursores anclados a la membrana plasmática pueden ser también funcionales, ya que en ciertos casos son capaces de unirse a receptores ErbB/HER de células adyacentes, por lo que estarían implicados en señalización yuxtacrina (Massagué, 1990; Massague & Pandiella, 1993).

Existe un gran número de ligandos de la familia EGF para los receptores ErbB/HER que poseen distinta afinidad por los receptores y cada uno de ellos presenta un patrón de expresión distinto, tanto durante el desarrollo embrionario como en los diferentes tipos de tejidos adultos. Dentro de la familia de ligandos se distinguen tres grupos en función a sus capacidades de unir y activar a los distintos receptores ErbB/HER (Figura 3) (Alroy & Yarden, 1997; Burden & Yarden, 1997; Kinugasa *et al.*, 2004; Riese & Stern, 1998).

- Aparte del propio EGF, el factor de crecimiento y transformación de tipo α (TGF α , *transforming growth factor α*), la anfiregulina (AR, *amphiregulin*) y el epigen (EPG, *epithelial mitogen*) se unen únicamente a EGFR.
- La betacelulina (BTC, *betacellulin*), el factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina (HB-EGF, *heparin-binding EGF-like growth factor*) y la epiregulina (EPR, *epiregulin*) pueden activar tanto a EGFR como a HER4.

- La tercera categoría incluye todas las neurregulinas (NRGs). Las NRG1 y NRG2 tienen capacidad de unión a HER3 y HER4. Por otra parte, las NRG3 y NRG4 se unen únicamente a HER4. También se ha descrito que el proteoglicano 5 condroitín sulfato (CSPG5, *chondroitin sulfate proteoglycan 5*) o también conocido como neuroglicano C (NGC, *neuroglycan C*) tiene capacidad de unión a HER3 (Kinugasa *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que los ligandos de la familia EGF pueden desencadenar diferentes efectos tras su señalización aguas abajo. Por ejemplo EGF, HB-EGF y BTC promueven la degradación del receptor y un pulso de señalización más corto, en contraste con TGF α , AR, EPR y EPG, que promueven el reciclaje del receptor y una señal mantenida (Mitchell *et al.*, 2018).

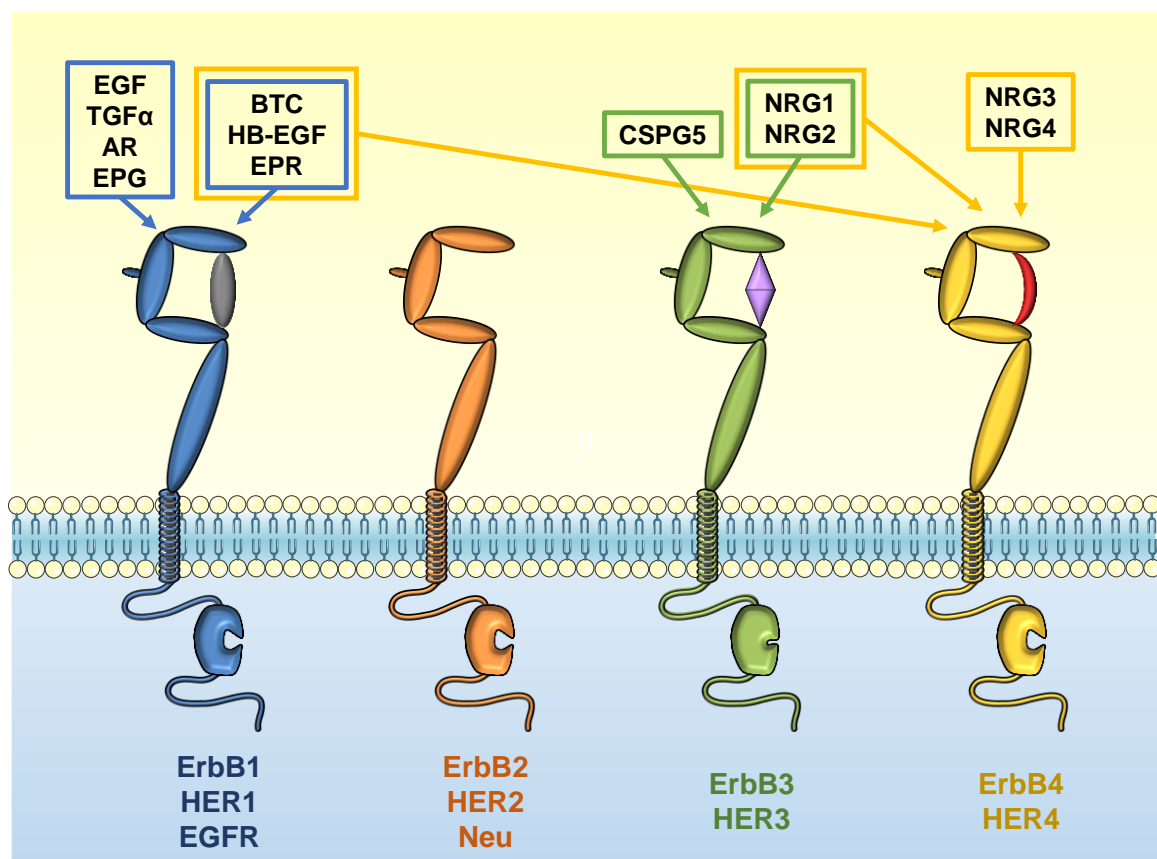


Figura 3. Ligandos de la familia del EGF que interaccionan con los receptores ErbB/HER. Los ligandos de los receptores de la familia ErbB/HER pertenecen a la familia del EGF. Cada uno de ellos se une específicamente a distintos receptores. Dos peculiaridades importantes de esta familia es que HER2 no tiene ligando conocido y el receptor HER3 posee una actividad tirosina quinasa débil.

1.5. Vías de señalización

Los residuos de fosfotirosina de la cola C-terminal de los receptores ErbB/HER proporcionan sitios de unión y anclaje para proteínas adaptadoras que

reclutan a otras proteínas transductoras o que bien actúan directamente como enzimas, mediando la activación aguas abajo de vías de señalización. Las principales rutas de señalización activadas por los receptores ErbB/HER son la vía de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K, *phosphatidylinositol 3-kinase*), la de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, *mitogen activated protein kinase*), la de las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT, *signal transducer and activator of transcription protein*) y la vía de la fosfolipasa C γ (PLC- γ , *phospholipase C γ*). Estas rutas de señalización activan programas transcripcionales que controlan la proliferación, el ciclo celular, la supervivencia, la regulación metabólica, la apoptosis y la angiogénesis entre otras funciones celulares (Figura 4) (Burgess, 2008; Warren & Landgraf, 2006; Yarden & Pines, 2012).

Las proteínas adaptadoras contienen dominios SH2 (*Src homology domain 2*, dominio de homología Src 2) o dominios PTB (*phospho-tyrosine-binding domain*, dominio de unión a fosfotirosina) que les permiten la unión directa a los residuos de tirosina fosforilados (Margolis, 1992; van der Geer & Pawson, 1995). Entre las proteínas adaptadoras destacan las proteínas 2 y 7 unidas al receptor del factor de crecimiento (GRB2/7, *growth factor receptor bound protein 2/7*), la proteína Shc (*SH2 domain-containing protein*) y la GAB1 (*GRB2 associated binding protein 1*, proteína 1 de unión asociada a GRB2) (Prigent & Gullick, 1994; Vijapurkar *et al.*, 1998).

Cada uno de los cuatro receptores ErbB/HER tiene vías de señalización preferentes. Por ejemplo, HER3 destaca por su capacidad de activar directamente la ruta PI3K/Akt y ser su principal activador. Esto es debido a que posee en su cola C-terminal seis residuos de tirosina que son excelentes sitios de unión tras su fosforilación del dominio SH2 de la subunidad p85 de PI3K (Hellyer *et al.*, 1998; Soltoff *et al.*, 1994; Suenaga *et al.*, 2005). Por su parte, HER4 contiene un único sitio de acoplamiento de p85, y HER2 y EGFR activan la ruta PI3K indirectamente a través de proteínas adaptadoras (Amin *et al.*, 2010; Yarden & Sliwkowski, 2001).

HER4 es el único receptor entre los receptores ErbB/HER que sufre un procesamiento proteolítico adicional después de la unión del ligando. El dominio intracelular de 80 kDa es escindido por las actividades secuenciales de la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral α (TACE, *tumor necrosis factor α converting enzyme*) y la γ -secretasa (Wang, 2017). La forma soluble liberada entra

en el núcleo y participa en la regulación de la transcripción génica (Sardi *et al.*, 2006).

La versatilidad y plasticidad de la señalización mediada por los receptores ErbB/HER y los ligandos de la familia EGF asociados residen en la identidad del ligando y los receptores que componen el dímero. Estos componentes van a determinar qué sitios se fosforilan y, por tanto, qué proteínas adaptadoras se asocian activando diferentes vías de señalización (Yarden, 2001).

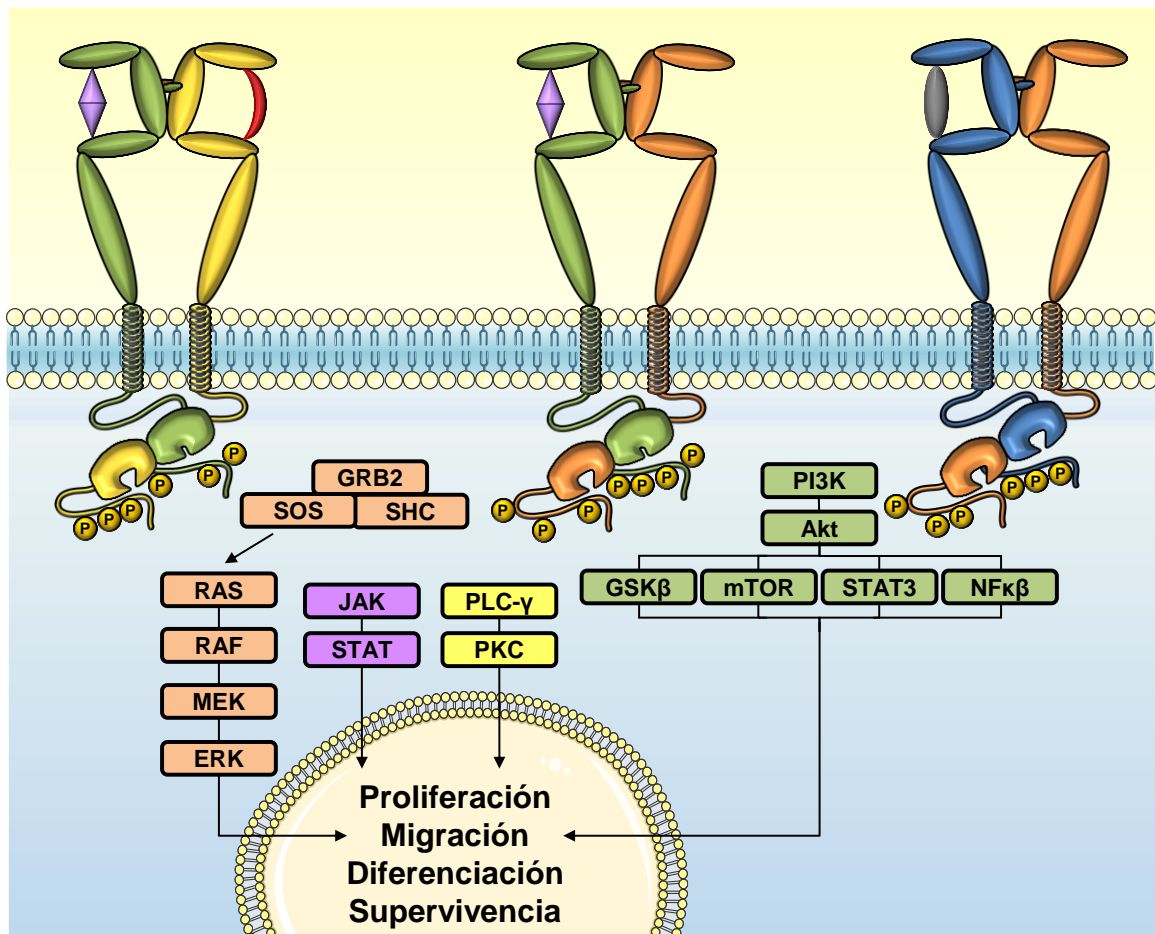


Figura 4. Principales vías de señalización de los receptores ErbB/HER. Tras la dimerización de los receptores, la activación de los dominios quinasa provoca la fosforilación de los residuos de tirosina de la cola C-terminal, desencadenando la activación de vías de señalización intracelular.

1.6. Inactivación de los receptores ErbB/HER

Una vez transmitidas las señales celulares por los receptores ErbB/HER, actúan diversos mecanismos capaces de atenuar la señalización para evitar la estimulación mitogénica continuada de la célula. Por un lado, existen sistemas rápidos de inactivación del receptor que pueden actuar en minutos, tales como proteínas quinasas reguladoras y fosfatasas implicadas en la defosforilación del

receptor. Por otra parte, existen sistemas lentos que actúan en horas, como es la internalización y degradación del receptor (Hernández-Sotomayor & Carpenter, 1992; Hunter *et al.*, 1984).

Generalmente el complejo ligando-receptor es internalizado hacia los endosomas tempranos mediante su inclusión en vesículas recubiertas de clatrina, aunque parecen existir otras vías de internalización independientes de éstas (Roepstorff *et al.*, 2008). Una vez que el receptor es internalizado, puede sufrir degradación proteolítica en los lisosomas o retornar a la membrana plasmática, en parte en función del ligando que ha activado al receptor (Sorkina *et al.*, 1999; Trowbridge *et al.*, 1993; Waterman *et al.*, 1998). Este mecanismo de internalización ha sido principalmente estudiado en EGFR, receptor que también puede sufrir ubiquitinación desencadenando su degradación lisosomal (Duan *et al.*, 2003; Thien & Langdon, 2001). Además, también se ha descrito que EGFR continúa enviando señales a lo largo de su ruta endocítica hasta su degradación en los lisosomas. Este fenómeno se conoce como señalización de EGFR en endosomas (Wang *et al.*, 2002; Wang, 2017).

Sin embargo, la internalización y degradación de los distintos receptores ErbB/HER no es un mecanismo uniforme. De hecho, las rutas endocíticas alternativas de los receptores contribuyen a la diversificación de la transducción de las señales. Por su parte, HER2 es menos susceptible a la internalización y degradación después de la activación que EGFR debido a una internalización ineficiente (Hommelgaard *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1999), y al reciclaje eficiente de HER2 endocitado a la membrana plasmática (Lenferink *et al.*, 1998). Además, también ha sido descrito la ubiquitinación y degradación de HER2 (Xu *et al.*, 2002). HER3 y HER4 tampoco se endocitan tan eficientemente como EGFR (Baulida *et al.*, 1996) pero también sufren ubiquitinación para su posterior degradación lisosomal (Cao *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2015; Omerovic *et al.*, 2007; Qiu & Goldberg, 2002). Por su parte, HER3 destaca por sufrir endocitosis independiente de ligando (Sak *et al.*, 2012).

1.7. Relación entre los receptores ErbB/HER y cáncer

En situaciones patológicas, como en el cáncer, los receptores ErbB pueden sobreactivarse por unión de ligando (expresados de manera aberrante), sobreexpresión de receptores y alteraciones estructurales en los mismos, debido a truncamientos y mutaciones en los genes que los codifican. La familia de receptores

ErbB/HER juega un papel importante en la carcinogénesis y, como resultado, esta familia en la actualidad se encuentra entre las oncoproteínas con más terapias dirigidas (Arteaga *et al.*, 2011; Maennling *et al.*, 2019).

1.7.1. EGFR

La desregulación en la señalización de EGFR se ha observado en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal y de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer anal, glioma, glioblastoma (GBM) y cáncer de páncreas (Arteaga & Engelman, 2014; Park *et al.*, 2015; Wang, 2017). Además de la sobreexpresión de EGFR en muchos tumores, en otros es frecuente observar receptores aberrantes truncados. En la mayoría de las ocasiones, los tumores presentan deleciones de exones que codifican parte del ECD del receptor que provocan que estén constitutivamente activos (EGFRvI) (Wong *et al.*, 1992) o que presenten un aumento de la actividad tirosina quinasa (EGFRvII y EGFRvIII) (Humphrey *et al.*, 1991). Menos frecuentes son las mutaciones que dan lugar a receptores truncados en su extremo C-terminal, lo que puede afectar al dominio tirosina quinasa y a su capacidad de interacción con las proteínas adaptadoras (EGFRvIV, EGFRvV) (Frederick *et al.*, 2000). EGFRvIII (deleción de los exones 2-7) se encuentra en aproximadamente el 40% de los GBMs con amplificación de *EGFR* (Sugawa *et al.*, 1990). La segunda variante de EGFR más común en GBM es EGFRc958 (carece de los aminoácidos 521-603), que se observa en aproximadamente el 20% de los tumores con amplificación de *EGFR* y muestra una mayor actividad quinasa dependiente de ligando (Frederick *et al.*, 2000). EGFR es la diana oncogénica más conocida y establecida en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) avanzado y metastásico. Las mutaciones de *EGFR* más comunes son la deleción en el exón 19 (del19) y una mutación puntual en el exón 21 (L858R). Ambas mutaciones conducen a la activación del dominio tirosina quinasa, pero estas versiones mutadas de EGFR son sensibles a inhibidores de la actividad tirosina quinasa (TKI, *tyrosine kinase inhibitor*) dirigidos contra este receptor (Harrison *et al.*, 2020; Linardou *et al.*, 2009).

1.7.2. HER2

La expresión de HER2 está alterada en varios tipos de cáncer, como el de vejiga, vesícula biliar, mama, cuello uterino, endometrial, ovario, testículo, colorrectal, esofágico, gástrico, de cabeza y cuello, hígado, pulmón, páncreas, GBM y glándulas salivales (Cornolti *et al.*, 2007; Vermeij *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2015). Además, se han descrito formas oncogénicas del receptor generadas

por duplicaciones, inserciones y mutaciones puntuales en *ERBB2* en distintos cánceres humanos (Arteaga & Engelman, 2014; Cocco *et al.*, 2019). Las mutaciones somáticas en *ERBB2* están presentes en aproximadamente el 4% de las pacientes con cáncer de mama y ocurren principalmente en el dominio tirosina quinasa y el ECD (Cocco *et al.*, 2019). Sin embargo, su papel oncogénico más relevante ha sido estudiado en cáncer de mama y cáncer gástrico, en los cuales la sobreexpresión de HER2 se asoció con un mal pronóstico (Jaehne *et al.*, 1992; Slamon *et al.*, 1987).

La amplificación del gen *ERBB2* y/o sobreexpresión a nivel de ARN mensajero o proteína ocurre en aproximadamente el 20% de los cánceres de mama y se asocia con una enfermedad más agresiva (Ross *et al.*, 2009; Slamon *et al.*, 1987). Estos estudios, junto con los datos preclínicos que corroboraron un papel pro-oncogénico de HER2 (Di Fiore *et al.*, 1987) promovieron el desarrollo de agentes que actúan específicamente sobre esta tirosina quinasa, y que han mejorado notablemente la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama HER2 positivo (HER2⁺) (Arteaga *et al.*, 2011). Este mismo beneficio de las terapias anti-HER2 ha sido expandido al cáncer gástrico HER2⁺ (Matsuoka & Yashiro, 2015).

1.7.3. HER3

La expresión o sobreexpresión de HER3 se ha descrito en cáncer de mama (Bobrow *et al.*, 1997), de ovario (Rajkumar *et al.*, 1996; Simpson *et al.*, 1995), de pulmón (Yi *et al.*, 1997), de colon (Ciardiello *et al.*, 1991), pancreático (Friess *et al.*, 1995), gástrico (Rajkumar *et al.*, 1993; Slesak *et al.*, 1998), de cabeza y cuello (Zhang *et al.*, 2015), de próstata (Leung *et al.*, 1997), de faringe (Brand *et al.*, 2017) y en melanoma (Reschke *et al.*, 2008). También se ha encontrado que HER3 se expresa altamente en el astrocitoma pilocítico, un glioma infantil (Addo-Yobo *et al.*, 2006) y en el rhabdomyosarcoma, un sarcoma pediátrico (Nordberg *et al.*, 2012).

La sobreexpresión de HER3 a menudo se asocia con sobreexpresión de HER2 y/o EGFR, desempeñando un papel importante como correceptor en el cáncer de mama HER2⁺ y en un subconjunto de cáncer de pulmón dependiente de EGFR (Engelman *et al.*, 2007; Holbro *et al.*, 2003; Lee-Hoeflich *et al.*, 2008; Stern, 2008). Además, el cáncer de mama a menudo muestra coexpresión y correlación positiva entre HER2 y HER3 (Bieche *et al.*, 2003; McIntyre *et al.*, 2010) que conduce a una disminución de la supervivencia del paciente (Wiseman *et al.*, 2005). Por otra parte, HER3 se expresa significativamente en el cáncer de mama luminal o receptor

de estrógenos (RE, *estrogen receptor*) positivo (Balko *et al.*, 2012; Morrison *et al.*, 2013).

Ocaña y colaboradores realizaron un metaanálisis sobre la sobreexpresión de HER3 y su relación con la supervivencia en tumores sólidos (concretamente en cáncer colorrectal, gástrico, mama, melanoma, ovario, cabeza y cuello, páncreas y cuello uterino) utilizando los datos de IHC. Llegaron a la conclusión de que el porcentaje medio de tumores con sobreexpresión de HER3 era del 42,2%. Además, mostraron que más del 50% de los cánceres de melanoma, cuello uterino y ovario tienen sobreexpresión de HER3. Por otro lado, esta sobreexpresión se da en el 20-60% de los casos de cáncer colorrectal, gástrico y de mama. Además, HER3 se asoció con una peor supervivencia general tanto a 3 años como a 5 años, especialmente en cánceres con sobreexpresión de HER2 (Ocana *et al.*, 2013).

Recientemente, se han publicado mutaciones oncogénicas en el gen *ERBB3* principalmente en cánceres gástricos y de colon, y menos frecuentes en CPNM. Sin embargo, la actividad oncogénica del *ERBB3* mutante era independiente del ligando, pero requería la actividad quinasa de HER2. La mayoría de las mutaciones *ERBB3* estaban en el ECD y algunas en el dominio quinasa (Jaiswal *et al.*, 2013). Actualmente, las mutaciones en *ERBB3* están en estudio debido a sus posibles implicaciones terapéuticas (Kiavue *et al.*, 2020; M. Li *et al.*, 2019; Rosalin Mishra *et al.*, 2018; Ross *et al.*, 2018).

1.7.4. HER4

A diferencia de EGFR y HER2, que son oncogenes bien establecidos en cáncer, para HER4 se han propuesto tanto funciones oncogénicas como supresoras de tumores (Wang, 2017). Se ha descrito que *ERBB4* está mutado principalmente en melanoma, pero también se han observado mutaciones en cáncer colorectal, de pulmón, gástrico y de mama (Prickett *et al.*, 2009; Soung *et al.*, 2006). Concretamente, HER4 parece actuar como un supresor tumoral débil en el cáncer de mama, promoviendo la diferenciación y la inhibición del crecimiento de las células (Sartor *et al.*, 2001). Además, HER4 se relaciona de manera más consistente con un pronóstico favorable en el cáncer de mama (Naresh *et al.*, 2006; Sartor *et al.*, 2001; Suo *et al.*, 2002). Por otra parte, la pérdida de expresión de HER4 puede representar un marcador de resistencia al tamoxifeno (Karamouzis *et al.*, 2007; Koutras *et al.*, 2010). También se ha descrito que el dominio intracelular de HER4 soluble media múltiples actividades en cáncer de mama (Han *et al.*, 2016;

Knittle *et al.*, 2017). Por el contrario, la presencia de HER4 en el cáncer de pulmón se asocia con una mayor tasa proliferativa (Starr *et al.*, 2006).

1.7.5. Papel de los receptores ErbB/HER en la generación de resistencia

En la familia de receptores ErbB/HER, cuando un determinado miembro está bloqueado, es posible que la señalización de los otros miembros de la familia aumente para equilibrar la pérdida de señalización. Por ejemplo, cuando EGFR es inhibido por TKIs, el bloqueo de la señalización puede superarse por un aumento de la expresión de HER3 en cáncer de páncreas (Frolov *et al.*, 2007) o por la amplificación de otro receptor quinasa como MET, que conduce a la activación de PI3K dependiente de HER3 en cáncer de pulmón (Engelman *et al.*, 2007). MET también ha sido relacionado con resistencia a trastuzumab (Shattuck *et al.*, 2008), al igual que otros receptores como EphA2 y el receptor del factor de crecimiento y transformación de tipo β (TGF β) (Wang *et al.*, 2008; Zhuang *et al.*, 2010). La resistencia a cetuximab en cáncer de pulmón también se asocia con niveles elevados de EGFR como consecuencia de la desregulación de la internalización y degradación de este receptor que conduce a la activación de HER3 dependiente de EGFR (Wheeler *et al.*, 2008). Además, la señalización de HER2 y HER3 se ha relacionado con resistencia a TKIs dirigidos a EGFR en cáncer de cabeza y cuello (Erjola *et al.*, 2006).

Por otra parte, también se ha observado que la alta expresión de NRG es un posible mecanismo de resistencia a cetuximab en cáncer colorrectal (Yonesaka *et al.*, 2011). También ha sido descrita la relación entre una mayor expresión y activación de HER3 y NRG en cáncer de mama HER2⁺ resistente a T-DM1 (Phillips *et al.*, 2014). Un aumento de la expresión o señalización de HER3, a veces mediante la sobreexpresión de NRG, también se ha asociado con resistencia a lapatinib o trastuzumab en el cáncer de mama HER2⁺ (Garrett *et al.*, 2011; Narayan *et al.*, 2009; Ritter *et al.*, 2007; Sergina *et al.*, 2007). Huang y colaboradores encontraron que el complejo heterotrimérico HER2/HER3/IGF1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*, receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1) conduce a resistencia a trastuzumab al desencadenar las vías de señalización de HER3/PI3K/Akt y IGF1R/Src (Huang *et al.*, 2010). El mismo grupo de investigación también reportó que la señalización de HER3/PI3K/Akt juega un papel fundamental

en el desarrollo de resistencia a lapatinib en las células de cáncer de mama HER2⁺ resistentes a trastuzumab (Lyu *et al.*, 2016).

HER2, HER3 y EGFR desempeñan un papel importante en la resistencia a terapia hormonal (fulvestrant y tamoxifeno) en el cáncer de mama RE⁺ (Frogne *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2007; Osipo *et al.*, 2007). En el cáncer de mama HER2⁺, la expresión elevada de HER3 a través de la regulación positiva de survivina produce resistencia a paclitaxel (Wang *et al.*, 2010). La coexpresión de HER2 y HER3 y su señalización mediante PI3K/Akt en líneas celulares de cáncer de mama se ha asociado con un aumento de la resistencia a agentes quimioterapéuticos de amplio espectro, como paclitaxel, doxorubicina, 5-fluorouracilo, etopósido, y camptotecina (Knuefermann *et al.*, 2003).

La señalización y expresión de HER3 juegan un papel crucial en el desarrollo de quimiorresistencia y resistencia a pertuzumab en cáncer de ovario (Amler *et al.*, 2008; Bezler *et al.*, 2012). En cáncer de próstata, la señalización de HER3/PI3K/Akt juega un papel fundamental en el desarrollo de la resistencia a terapia hormonal y a docetaxel (Jathal, Chen, Mudryj y Ghosh, 2011). Además, la regulación positiva de la expresión de HER3 está relacionada con resistencia a inhibidores de RAF y MEK en melanoma y carcinoma de tiroides (Abel *et al.*, 2013; Montero-Conde *et al.*, 2013).

Todos estos ejemplos muestran la importancia de los receptores ErbB/HER en la progresión del cáncer y la intercomunicación entre los mismos para el desarrollo de resistencias a terapias antitumorales.

1.8. Terapias dirigidas contra los receptores ErbB/HER

La familia de receptores ErbB/HER juega un papel importante en la carcinogénesis y, como resultado, esta familia en la actualidad se encuentra entre las oncoproteínas con más terapias dirigidas (Maennling *et al.*, 2019). La mayoría de estas terapias pertenecen a dos categorías: anticuerpos monoclonales (*mAb*, *monoclonal antibody*) y TKIs. Una tercera categoría más recientemente implementada en la clínica son los anticuerpos conjugados a fármacos (ADC, *antibody-drug conjugate*). En la tabla 1 se resumen los fármacos contra los receptores ErbB/HER aprobados en clínica, tanto por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, *Food and Drug Administration*) como por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, *European Medicines Agency*). En

el apartado 3 se profundizará en el estudio de los tratamientos dirigidos contra HER2.

Tabla 1. Terapias en la práctica clínica dirigidas contra receptores ErbB/HER

Nombre genérico (nombre comercial)	Diana	Uso clínico	Aprobado por FDA y/o EMA
Anticuerpos monoclonales			
Cetuximab (Erbix®)	EGFR	- Cáncer colorrectal EGFR ⁺ metastásico con <i>RAS</i> no mutado - Cáncer de células escamosas de cabeza y cuello	FDA y EMA
Panitumumab (Vectibix®)	EGFR	Cáncer colorrectal EGFR ⁺ metastásico con <i>RAS</i> no mutado	FDA y EMA
Necitumumab (Portrazza®)	EGFR	CPNM escamoso metastásico	FDA
Nimotuzumab (Theraloc®)	EGFR	Glioma (medicamento huérfano)	FDA y EMA
Trastuzumab (Herceptin®) y fármacos biosimilares de trastuzumab	HER2	- Cáncer de mama HER2 ⁺ tanto precoz como metastásico - Cáncer gástrico HER2 ⁺ metastásico	FDA y EMA
Pertuzumab (Perjeta®)	HER2	Cáncer de mama HER2 ⁺ tanto precoz como metastásico	FDA y EMA
Margetuximab (Margetenza®)	HER2	Cáncer de mama HER2 ⁺ metastásico	FDA
Inhibidores tirosina quinasa			
Gefitinib (Iressa®)	EGFR	CPNM localmente avanzado o metastásico con mutaciones activadoras en el dominio tirosina quinasa de <i>EGFR</i>	FDA y EMA
Erlotinib (Tarceva®)	EGFR	- CPNM localmente avanzado o metastásico con mutaciones activadoras en <i>EGFR</i> . En pacientes con tumores sin mutaciones, erlotinib está indicado cuando otras opciones de tratamiento no se consideran adecuadas. - Cáncer de páncreas metastásico	FDA y EMA
Osimertinib (Tagrisso®)	EGFR	CPNM metastásico con mutaciones activadoras o con mutación T790M en <i>EGFR</i>	FDA y EMA
Vandetanib (Caprelsa®)	EGFR	Cáncer medular de tiroides metastásico	FDA y EMA

Lapatinib (Tykerb®)	EGFR HER2	Cáncer de mama HER2 ⁺ metastásico	FDA y EMA
Tucatinib (Tukysa®)	HER2	Cáncer de mama HER2 ⁺ avanzado inoperable o metastásico	FDA y EMA
Neratinib (Nerlynx®)	EGFR HER2 HER4	Cáncer de mama HER2 ⁺ en estadio inicial y metastásico	FDA y EMA
Afatinib (Giotrif®)	EGFR HER2 HER4	CPNM localmente avanzado o metastásico con mutaciones activadoras en <i>EGFR</i> o que progrese durante o tras quimioterapia basada en platino	FDA y EMA
Dacomitinib (Vizimpro®)	EGFR HER2 HER4	CPNM localmente avanzado o metastásico con mutaciones activadoras en <i>EGFR</i>	FDA y EMA
Vandetinib (Caprelsa®)	EGFR VEGFR RET	Cáncer medular de tiroides agresivo y sintomático	FDA y EMA
Anticuerpos conjugados a fármaco			
Trastuzumab emtansina (T-DM1, Kadcyla®)	HER2	Cáncer de mama HER2 ⁺ precoz y metastásico	FDA y EMA
Trastuzumab deruxtecan (T-DXd, DS-8201a, Enhertu®)	HER2	Cáncer de mama HER2 ⁺ metastásico Cáncer gástrico o adenocarcinoma de la unión gastroesofágica HER2 ⁺ localmente avanzado o metastásico	FDA y EMA FDA

VEGFR: receptor de VEGF (factor de crecimiento de endotelio vascular). CPNM: cáncer de pulmón no microcítico

2. CÁNCER DE MAMA

2.1. Epidemiología

En 2020, la incidencia mundial del cáncer aumentó a 19,3 millones de nuevos casos y casi 10 millones de muertes. El cáncer de mama fue el cáncer que se diagnosticó con más frecuencia a nivel mundial teniendo en cuenta ambos sexos (2,3 millones de nuevos casos estimados, 11,7%), seguido de cáncer de pulmón (11,4%), colorrectal (10%), de próstata (7,3%) y de estómago (5,6%). Sin embargo, fue el quinto tumor responsable del mayor número de fallecimientos a nivel mundial (6,9% del total de muertes por cáncer) (Ferlay J, 2020; Sung *et al.*, 2021). Concretamente en España, en 2020 se diagnosticaron 32.953 mujeres con cáncer

de mama y 6.606 murieron a causa de esta enfermedad. Además, se estima que en España los cánceres más frecuentemente diagnosticados durante el año 2021 serán los de colon y recto, próstata y, en tercer lugar, mama. Si nos centramos únicamente en las mujeres, el cáncer más diagnosticado será el cáncer de mama (SEOM, 2021).

A pesar de los muchos avances que se han logrado en la detección temprana y el tratamiento adyuvante del cáncer de mama en las últimas décadas, una proporción significativa de pacientes con cáncer de mama continúa desarrollando enfermedad recurrente o metastásica, además de resistencia a las terapias dirigidas. De hecho, una de cada tres pacientes desarrollará metástasis. En consecuencia, el cáncer de mama sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres (Ayala de la Peña *et al.*, 2019).

2.2. Clasificación del cáncer de mama

2.2.1. Clasificación según el perfil molecular. Subtipos moleculares

Los cánceres de mama son heterogéneos, muestran características morfológicas y biológicas variables y, por lo tanto, diferente comportamiento clínico y respuesta al tratamiento. Por lo tanto, la agrupación precisa de los cánceres de mama en subtipos clínicamente relevantes es de particular importancia para la toma de decisiones terapéuticas (Blows *et al.*, 2010). Las técnicas de *microarrays* de expresión génica han permitido analizar los genes de cada cáncer de mama. En 2000, Perou y colaboradores publicaron el primer artículo que clasificó el cáncer de mama en subtipos intrínsecos según el perfil de expresión génica (Perou *et al.*, 2000). Los avances en los últimos años han dado lugar a una clasificación molecular más precisa del cáncer de mama que se correlaciona mejor con el riesgo de recaída de la enfermedad. Actualmente, la clasificación molecular establece seis tipos de cáncer de mama: luminal A, luminal B, *HER2-enriched*, *basal-like*, *normal breast-like* y *claudin-low* (Eroles *et al.*, 2012).

2.2.1.1. Subtipo luminal: luminal A y luminal B

Los tumores pertenecientes al subtipo luminal expresan receptores hormonales, ER y receptor de progesterona (PR, *progesterone receptor*), y tienen un patrón de expresión más similar al componente epitelial luminal de la glándula mamaria (Perou *et al.*, 2000). Expresan citoqueratinas (CK, *cytokeratin*) luminales

8/18, ER y genes asociados con su activación, como *LIV1* y *CCND1*. Afortunadamente, menos del 20% de los tumores luminales tienen mutación en *TP53* (Sotiriou *et al.*, 2003).

Dentro de la categoría de tumor luminal existen dos subtipos: luminal A y luminal B. El luminal A en comparación con el luminal B tiene menor grado histológico (células de crecimiento más lento y se parecen más al tejido mamario normal), mayor expresión de genes relacionados con el ER y menor expresión de genes relacionados con la proliferación celular (Sørli *et al.*, 2001; Sorlie *et al.*, 2003; Sotiriou *et al.*, 2003). De hecho, una distinción adicional entre luminal A y luminal B, es que el luminal A tiene una baja tinción de Ki-67 (medida de la proliferación celular) y expresión de HER2 negativa, mientras que dentro del subtipo luminal B la tinción de Ki-67 es alta y existe un subgrupo que expresa HER2 (Cheang *et al.*, 2009; Fragomeni *et al.*, 2018; Tsang & Tse, 2020). El subtipo luminal A es el más frecuente, representando del 50 al 60 % de los casos de cáncer de mama. En cambio, el luminal B representa del 10-20% de los casos totales (Eroles *et al.*, 2012; Tsang & Tse, 2020). Los subtipos luminales son de buen pronóstico, sin embargo, el luminal B tiene peor pronóstico que el luminal A debido a la diferente respuesta de cada subtipo al tratamiento. De hecho, los subtipos luminales son tratados con terapia hormonal. El subtipo luminal A puede ser tratado sólo con hormonoterapia, y el subtipo luminal B, con más genes ligados a proliferación celular, se suele beneficiar de la terapia hormonal junto con quimioterapia (Brenton *et al.*, 2005; Sorlie *et al.*, 2003).

2.2.1.2. HER2-enriched (HER2-E)

El subtipo HER2 enriquecido (HER2-E, *HER2-enriched*) representa del 15 al 20% de todos los casos de cáncer de mama. Los tumores pertenecientes a esta categoría se caracterizan por la sobreexpresión de *ERBB2*, genes asociados a la señalización de HER2 y de otros genes dentro del mismo amplicon, tal como *GRB7* (Perou *et al.*, 2000). Los subtipos HER2-E tienen alta proporción de mutaciones en *TP53* (40-80%) y el gen que codifica para la subunidad catalítica de PI3K (*PIK3CA*), y suelen tener un grado histológico alto (Dai *et al.*, 2015; Vuong *et al.*, 2014). Los tumores con sobreexpresión de HER2 tienen mal pronóstico (Sørli *et al.*, 2001), aunque en las últimas dos décadas, las terapias dirigidas a HER2 han mejorado sustancialmente la supervivencia no solo en el ámbito metastásico, sino también en las etapas iniciales (Arteaga *et al.*, 2011; Pernas & Tolaney, 2019).

2.2.1.3. Basal-like

Este subtipo tumoral engloba tumores con un patrón de expresión semejante al de las células epiteliales basales y a las células mioepiteliales normales del tejido mamario y representan del 10-20% de los casos de carcinomas de mama. Además, se caracteriza por falta de expresión de ER, PR y HER2, y alta expresión de CKs como la 5, 6 y 17, además de EGFR y de genes relacionados con la proliferación celular (Perou *et al.*, 2000; Sotiriou *et al.*, 2003). Debido a la falta de expresión de los tres principales receptores en cáncer de mama, en la práctica clínica también se ha denominado como triple negativo (TNBC, *triple-negative breast cancer*), aunque no son términos equivalentes (Eroles *et al.*, 2012). La falta de expresión de los tres receptores característicos de otros tipos de cáncer de mama condiciona que los tumores basales no sean susceptibles de tratamientos dirigidos contra el cáncer de mama, por lo que la quimioterapia es la única opción terapéutica. De hecho, su mal pronóstico no se debe a la quimiorresistencia inicial, sino a las pocas opciones de tratamiento disponibles (Dai *et al.*, 2015).

Los intentos de identificar el grupo *basal-like* mediante un perfil de inmunohistoquímica (IHC, *immunohistochemistry*) han llevado a la selección de cinco marcadores: ER, PR, HER2, EGFR y CK 5/6. Estos marcadores clasifican este subtipo con una especificidad del 100% y una sensibilidad del 76% (Eroles *et al.*, 2012; Nielsen *et al.*, 2004). Este subtipo se caracteriza por un alto grado histológico y se ha asociado también con mutación en *BRCA1* (*breast cancer susceptibility gene 1*, proteína de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 1) (Foulkes *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2004). Estos tumores tienen la tendencia a ser muy agresivos y con mutación en *TP53* (Carey *et al.*, 2006).

2.2.1.4. Normal breast-like

Estos tumores representan alrededor del 5 al 10% de todos los cánceres de mama y se caracterizan por expresar genes característicos del tejido adiposo mamario y la expresión de genes similares al epitelio mamario normal. Presentan un pronóstico intermedio entre luminal y basal. Carecen de la expresión de ER, PR y HER2, pero además son negativos para CK5 y EGFR, característica que les distingue del grupo *basal-like* (Eroles *et al.*, 2012). Esta categoría es un subgrupo controvertido y se ha planteado que su identificación en el estudio inicial sea consecuencia de la contaminación de células epiteliales normales de un tumor de bajo contenido en células malignas (Tsang & Tse, 2020).

2.2.1.5. Claudin-low

Los tumores de esta categoría se caracterizan por una baja expresión de genes implicados en las uniones estrechas y la adhesión intercelular, incluyendo claudina 3/4/7, cingulina, ocludina y cadherina E, de ahí el nombre de *claudin-low* (expresión baja de claudina). Además, este subtipo tumoral presenta baja expresión de ER, PR y HER2, pero su característica peculiar es que sobreexpresa un conjunto de 40 genes relacionados con la respuesta inmune. Con respecto al total de carcinomas de mama, representan del 12 al 14%, tienen alto grado histológico y tienen mal pronóstico (Eroles *et al.*, 2012; Prat *et al.*, 2010).

2.2.2. Clasificación mediante inmunohistoquímica. Subtipos histológicos

El costo y la complejidad técnica de los *microarrays* han limitado la aplicación de los perfiles de expresión génica en la práctica clínica diaria. Por ello, la clasificación del subtipo al que pertenece el carcinoma de mama se suele basar en el análisis de IHC de ER, PR, HER2 y Ki-67 (Tabla 2). Esta técnica es económica y se puede aplicar fácilmente en la práctica habitual (Reis-Filho & Pusztai, 2011; Tsang & Tse, 2020; Vuong *et al.*, 2014). Los marcadores de IHC clásica junto con las variables clínico-patológicas tradicionales como el tamaño y grado del tumor y la afectación ganglionar, se utilizan convencionalmente para el pronóstico y el tratamiento del paciente (Cheang *et al.*, 2009).

El análisis de IHC clasifica el cáncer de mama en cuatro subtipos histológicos: tumores receptores hormonales positivo (HR⁺, *hormone receptor positive*), que se subdividen en (i) luminal A y (ii) luminal B y por otro lado (iii) tumores HER2⁺ y (iv) TNBC. Aproximadamente el 80% de los cánceres de mama expresan ER, PR o ambos y, por lo tanto, se consideran tumores HR⁺, englobando a los tumores luminal A y luminal B. Por tanto, realizando IHC de ER, PR, HER2 y Ki-67 se consigue identificar los tres subtipos moleculares principales del cáncer de mama: luminal A, luminal B y HER2⁺. El resto de los tumores se han clasificado en un único grupo que se caracteriza por la pérdida o mínima expresión de los tres receptores característicos en cáncer de mama, de ahí que se les haya denominado TNBC. El TNBC es conocido por su fenotipo agresivo y su mal pronóstico basado en la heterogeneidad genética, transcriptómica e histológica que presenta. Debido a la falta de expresión de ER, PR y HER2, los pacientes con TNBC no responden a las terapias dirigidas contra estos receptores (Reddy, 2011). El tratamiento estándar

actual para pacientes con TNBC en estadio temprano incluye quimioterapia combinada con terapia basada en taxanos y antraciclinas (Pareja *et al.*, 2016).

Tabla 2. Subtipos histológicos y moleculares del cáncer de mama

Subtipo histológico	Subtipo molecular	Prevalencia (%)	IHC	Pronóstico	Terapia
Tumores receptores hormonales positivo: - Luminal A - Luminal B	Luminal A	50-60	ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁻ , Ki-67 < 20%	Bueno	Hormonoterapia
	Luminal B	10-20	ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁻ , Ki-67 ≥ 20%	Intermedio	Hormono- + quimioterapia
HER2 ⁺	HER2-E	15-20	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺ Ki-67 alto	Intermedio	Terapia dirigida contra HER2
	Luminal B (HER2 ⁺)*		ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁺ Ki-67 alto		
TNBC	<i>Basal-like</i>	10-20	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻ Ki-67 variable	Malo	Quimioterapia
	<i>Normal breast-like</i>	5-10			
	<i>Claudin-low</i>	12-14			

*Subtipo dentro de los tumores tipo luminal B que expresan HER2. IHC: inmunohistoquímica.

2.3. Tratamiento

La elección del tratamiento en el cáncer de mama se basa en el subtipo tumoral, el estadio del tumor, la presencia de mutaciones germinales en los genes *BRCA1* o *BRCA2* (*breast cancer susceptibility gene 2*, proteína de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 2), el riesgo de recurrencia, edad, estado de salud general, condición menopáusica y/o preferencias de la paciente (Ayala de la Peña *et al.*, 2019). Clásicamente en los estadios iniciales del cáncer de mama el tratamiento se comienza con la cirugía y posteriormente se administra el tratamiento sistémico (terapia hormonal, terapia dirigida contra HER2 y/o quimioterapia) y la radioterapia a nivel local. Estos tratamientos son considerados tratamientos adyuvantes al ser administrados de manera complementaria después del tratamiento principal (cirugía). En la actualidad, se puede administrar tratamiento sistémico antes de proceder a la cirugía y la radioterapia (tratamiento neoadyuvante) para reducir el tamaño tumoral y facilitar su extirpación. En los estadios avanzados, el tratamiento

principal suele ser el tratamiento sistémico, aunque puede emplearse la cirugía o la radioterapia en determinadas situaciones (Bertrán, 2020).

3. TERAPIAS DIRIGIDAS EN CÁNCER DE MAMA HER2⁺

Los agentes dirigidos a HER2 han cambiado drásticamente el panorama terapéutico del cáncer de mama HER2⁺ y han mejorado significativamente la supervivencia de las pacientes con este subtipo tumoral (Bertrán, 2020). De manera general, en los estadios iniciales operables, se procede a la cirugía y se administra trastuzumab adyuvante con taxanos durante 1 año. Este tratamiento adyuvante se puede administrar a la vez que la radioterapia y durante la hormonoterapia si las características del tumor así lo aconsejan. En algunos casos puede valorarse combinar trastuzumab con pertuzumab o neratinib tras finalizar el tratamiento con trastuzumab. Además, actualmente puede considerarse administrar tratamiento neoadyuvante en tumores mayores de 2 cm o con afectación ganglionar (Bertrán, 2020). En un corto período de tiempo, la rápida introducción de nuevas terapias dirigidas llevó a la aprobación del uso de trastuzumab, pertuzumab y un taxano como tratamiento estándar en primera línea de pacientes con cáncer de mama HER2⁺ metastásico (Martínez-Sáez & Prat, 2021). Si las pacientes presentan progresión de la enfermedad, se administra T-DM1 como tratamiento estándar en segunda línea. Si el tumor es persistente y no hay respuesta, se administra en tercera línea neratinib o lapatinib más capecitabina o trastuzumab con otros agentes quimioterapéuticos o con lapatinib sin quimioterapia. Los fármacos dirigidos a HER2 más recientemente aprobados en la clínica, tucatinib, margetuximab y trastuzumab-deruxtecan (T-DXd), se están empleando actualmente como tratamiento en segunda o tercera línea (Martínez-Sáez & Prat, 2021).

3.1. Anticuerpos monoclonales

3.1.1. Trastuzumab

Trastuzumab (o su nombre comercial, Herceptina, *Herceptin*®) es un mAb humanizado dirigido contra HER2 y fue la primera terapia dirigida a HER2 aprobada por la FDA en 1998. Trastuzumab es el tratamiento estándar para pacientes con cáncer de mama HER2⁺ y se utiliza actualmente con éxito en la terapia de este subtipo tumoral tanto en estadio precoz como metastásico, en monoterapia o en combinación con otros agentes (quimioterapia y/o pertuzumab) (Nahta & Esteva, 2007; Slamon *et al.*, 2001). Sin embargo, no todas las pacientes con cáncer de

mama HER2⁺ responden a trastuzumab, demostrando resistencia primaria, y una fracción de las pacientes que logran una respuesta inicial a los regímenes basados en trastuzumab desarrollan resistencia adquirida en un año (Valabrega *et al.*, 2007).

El mecanismo de acción de trastuzumab se basa en varios procesos. Trastuzumab se une al dominio IV del ECD de HER2, reduciendo la activación de las vías PI3K/Akt y RAS/MAPK principalmente (Baselga *et al.*, 2001; Ghosh *et al.*, 2011). Debido a este bloqueo, trastuzumab provoca la disminución de pAkt, lo cual aumenta la expresión de p27 provocando parada en la fase G1 del ciclo celular e inhibiendo la proliferación celular (Yakes *et al.*, 2002). Trastuzumab disminuye los niveles de HER2 al acelerar la endocitosis y la degradación del receptor (Cuello *et al.*, 2001). Además, también puede interferir en el procesamiento de HER2. Cuando se sobreexpresa HER2, esta proteína sufre una escisión proteolítica que da como resultado la liberación del dominio extracelular y la producción de un fragmento unido a la membrana (p95HER2) que desencadena una señalización constitutiva aguas abajo del receptor. Molina y colaboradores demostraron que trastuzumab puede bloquear el desprendimiento del dominio extracelular de HER2 (Molina *et al.*, 2001). Sin embargo, también se ha observado que tumores de mama que expresan p95HER2 son resistentes a trastuzumab (Scaltriti *et al.*, 2007). Además, trastuzumab tiene la ventaja de que al ser un anticuerpo tiene la capacidad de modular el sistema inmunológico y promueve la apoptosis a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) (Arnould *et al.*, 2006; Cooley *et al.*, 1999). La acumulación de trastuzumab en los tejidos HER2⁺ atrae a las células naturales asesinas (NK, *natural killer*) que expresan el receptor Fc gamma, que se une al dominio Fc de trastuzumab, activando así la destrucción de las células cancerosas unidas a trastuzumab. Otro mecanismo posiblemente implicado en la acción de trastuzumab, pero menos validado, es la inhibición de la angiogénesis (Izumi *et al.*, 2002; Klos *et al.*, 2003; Petit *et al.*, 1997).

3.1.2. Pertuzumab

Pertuzumab (Perjeta®) es un mAb humanizado que se une a un epítipo en el dominio II, inhibiendo la homodimerización y heterodimerización de HER2 con otros miembros de la familia. Esta propiedad de pertuzumab conduce a la inhibición de activación de las cascadas de señalización aguas abajo que median la proliferación y supervivencia de las células tumorales (Agus *et al.*, 2002; Baselga,

2002; Metzger-Filho *et al.*, 2013). Además, pertuzumab también ejerce su actividad antitumoral a través de ADCC (Tóth *et al.*, 2016; Yamashita-Kashima *et al.*, 2011). La monoterapia con pertuzumab tiene una eficacia clínica limitada, pero en particular la adición de pertuzumab a los regímenes basados en trastuzumab mejora la respuesta clínica de las pacientes con cáncer de mama HER2⁺. De hecho, en el ensayo clínico CLEOPATRA, donde se combinaron pertuzumab, trastuzumab y quimioterapia, se demostró una mejor respuesta de las pacientes (Baselga *et al.*, 2012; Swain *et al.*, 2013). Estos resultados llevaron a la aprobación de la combinación de pertuzumab, trastuzumab (también conocido como doble bloqueo de HER2) y docetaxel para el tratamiento en primera línea de pacientes con cáncer de mama HER2⁺ metastásico. Además de esta aplicación clínica, actualmente pertuzumab también se administra en combinación con trastuzumab y quimioterapia como tratamiento neoadyuvante y adyuvante de cáncer de mama precoz (Ishii *et al.*, 2019).

3.1.3. Margetuximab

Margetuximab (Margenza®) es un mAb IgG1 quimérico humano/ratón dirigido contra HER2 con especificidad y afinidad similar a trastuzumab, pero con un dominio Fc modificado y diseñado para aumentar la unión al receptor FcγIIIA activador (CD16A) y disminuir la unión al receptor FcγIIB inhibidor (CD32B) de las células NK y macrófagos (Tarantino *et al.*, 2021). Gracias a estas modificaciones, se ha mejorado la inducción de ADCC y las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas que desencadena. Además, tiene mayor efectividad que trastuzumab en células resistentes a trastuzumab o que expresan niveles bajos de HER2 (Nordstrom *et al.*, 2011). En base en los resultados del ensayo clínico de fase III SOPHIA, en diciembre de 2020 margetuximab ha sido aprobado por la FDA en combinación con quimioterapia para el tratamiento del cáncer de mama metastásico HER2⁺ tratado previamente con dos o más regímenes anti-HER2, al menos uno de ellos para enfermedad metastásica (Markham, 2021; Rugo *et al.*, 2021).

3.2. Inhibidores tirosina quinasa

Los TKIs son moléculas pequeñas que generalmente se unen al sitio de unión de ATP del dominio quinasa de los receptores ErbB/HER, inhibiendo su actividad quinasa intracelular y por tanto evitando la transducción de señales (Schlam & Swain, 2021). Actualmente, los TKIs pueden ser inhibidores reversibles

(por unión no covalente) o irreversibles (unión covalente). Cuando un TKI inhibe a EGFR, HER2 y HER4, se le denomina pan-HER TKI.

3.2.1. Lapatinib

Lapatinib (Tykerb®) es un TKI dual reversible de EGFR/HER2 (Arteaga *et al.*, 2011; Howe & Brown, 2011). En 2007, la FDA aprobó el uso de lapatinib y capecitabina como tratamiento en tercera línea para pacientes con cáncer de mama HER2⁺ avanzado previamente tratadas con trastuzumab y quimioterapia (Geyer *et al.*, 2006). En este mismo contexto clínico, lapatinib también se administra en combinación con trastuzumab (Blackwell *et al.*, 2012; CIMA; Martínez-Sáez & Prat, 2021). En 2010, la FDA aprobó en uso de lapatinib, en combinación con un inhibidor de la aromatasas (letrozol), como terapia en primera línea para el tratamiento de mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama RH⁺/HER2⁺ (Appert-Collin *et al.*, 2015). Un dato importante es que trastuzumab no se une a las formas truncadas de HER2, ya que carecen del ECD al que normalmente se uniría trastuzumab. Sin embargo, lapatinib puede inhibir estas formas truncadas de HER2 (Scaltriti *et al.*, 2007).

3.2.2. Neratinib

Neratinib (Nerlynx®) se une irreversiblemente y de manera covalente al sitio de unión de ATP del dominio quinasa de los receptores ErbB/HER y bloquea la transducción de señales de EGFR, HER2 y HER4 (Canonici *et al.*, 2013; Rabindran *et al.*, 2004; Wissner & Mansour, 2008). Una ventaja potencial de neratinib es que, al igual que lapatinib, puede inhibir el dominio quinasa de las formas truncadas de HER2 que carecen del sitio de unión de trastuzumab, pertuzumab y T-DM1. Por lo tanto, se espera que la expresión de p95HER2 produzca resistencia a trastuzumab, pertuzumab y T-DM1, pero conserve la sensibilidad a los TKIs. Neratinib fue aprobado por la EMA para el tratamiento adyuvante extendido del cáncer de mama HER2⁺/HR⁺ en estadio temprano, que haya finalizado el tratamiento adyuvante a base de trastuzumab hace menos de un año. Por su parte, la FDA aprobó el uso de neratinib para el tratamiento adyuvante extendido del cáncer de mama HER2⁺ en estadio temprano después de la cirugía y la terapia adyuvante basada en trastuzumab (Chan *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2017). En 2020, la FDA aprobó el uso de neratinib en combinación con capecitabina para el tratamiento en tercera línea de pacientes con enfermedad avanzada/metastásica después de 2 ó más líneas previas de terapia dirigida a HER2 (Deeks, 2017; Martínez-Sáez & Prat, 2021).

3.2.3. Tucatinib

Tucatinib (Tukysa®) es un potente TKI selectivo de HER2. Esta selectividad mejora la tolerabilidad, ya que los otros TKIs (lapatinib y neratinib) al ser casi equipotentes para EGFR y HER2, se asocian con eventos adversos gastrointestinales y dermatológicos (Kulukian *et al.*, 2020; Moulder *et al.*, 2017). Tras los prometedores resultados del ensayo clínico de fase III HER2CLIMB, la combinación de tucatinib, trastuzumab y capecitabina fue aprobada por la FDA en 2020 para el tratamiento del cáncer de mama HER2⁺ metastásico avanzado, incluidas las pacientes con metástasis cerebrales, que han recibido uno o más regímenes previos basados en terapia anti-HER2 (Lee, 2020). De hecho, la actividad de tucatinib fue particularmente evidente en pacientes con cáncer de mama con metástasis cerebrales, incluidas aquellas no tratadas previamente con radioterapia (Lin *et al.*, 2020; Murthy *et al.*, 2020). En diciembre de 2020, la EMA autorizó la comercialización de tucatinib en el mismo escenario clínico, aunque la FDA establece que tucatinib está indicado en pacientes que han recibido uno o más regímenes previos basados en terapia anti-HER2 en el entorno metastásico, mientras que la EMA establece que tucatinib está indicado en pacientes que han recibido al menos dos regímenes de tratamiento anti-HER2 previos (Corti & Criscitiello, 2021; Martínez-Sáez & Prat, 2021).

3.3. Anticuerpos conjugados a fármaco

3.3.1. Componentes de un ADC

Los ADC son compuestos dirigidos que combinan la especificidad de un anticuerpo con la citotoxicidad del agente citotóxico unido al mismo. El objetivo de estas moléculas es dirigir el agente citotóxico a las células tumorales, potenciando su eficacia y minimizando la toxicidad del agente en tejidos no tumorales (Chari *et al.*, 2014; García-Alonso *et al.*, 2018). Un ADC tiene tres componentes: (i) el mAb, (ii) un enlace y (iii) el agente citotóxico (Figura 5) (Kostova *et al.*, 2021).

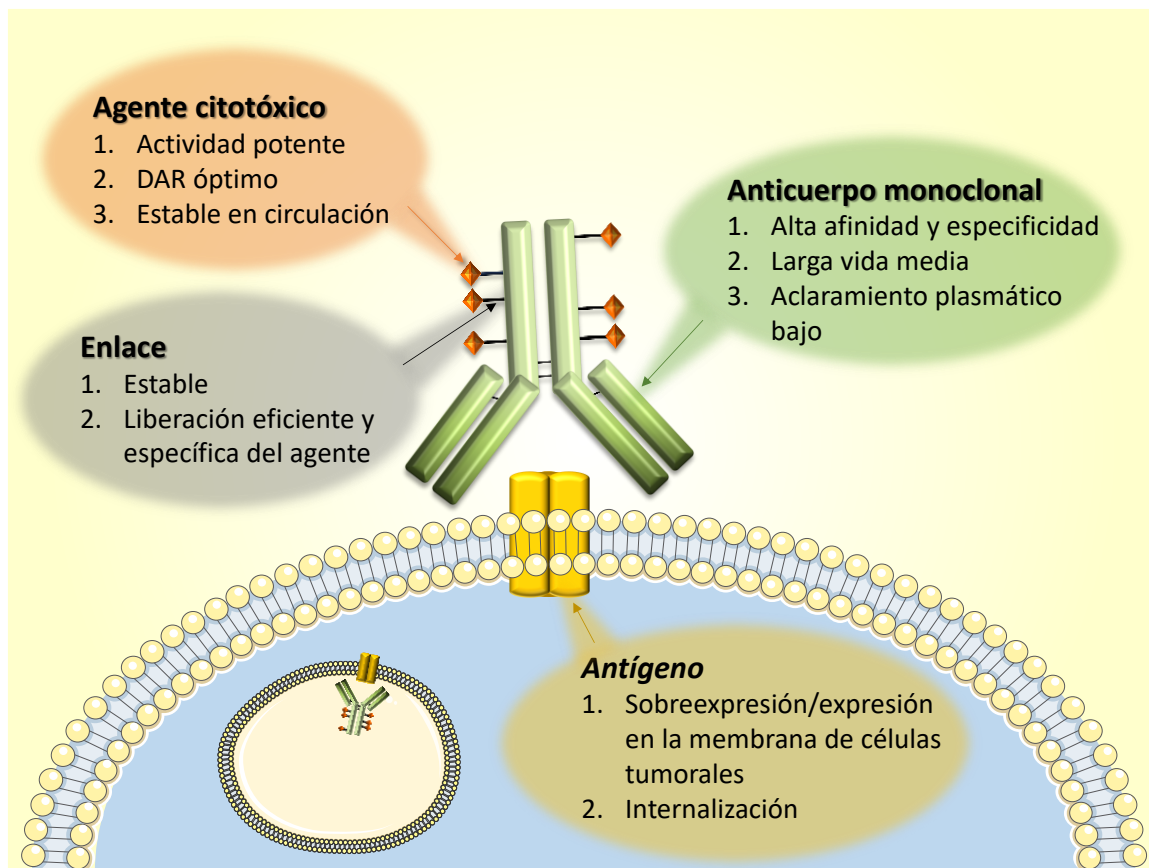


Figura 5. Estructura de un ADC y características principales de sus componentes y del antígeno al que reconoce. Figura adaptada de Gandullo-Sánchez *et al.*, 2021. DAR: relación fármaco-anticuerpo

El mAb debe reconocer un antígeno asociado a la membrana de la célula tumoral. Una característica deseada pero no necesaria del antígeno, es que se sobreexpresen en las células cancerosas, una circunstancia que facilitaría el direccionamiento del ADC al tumor con respecto a los tejidos normales que también expresan la proteína. Otro requisito es que la molécula diana, principalmente una proteína, debe internalizarse para permitir la acción del agente citotóxico en las células tumorales (Chari, 2008).

Un segundo componente del ADC es el enlace, una estructura química que se utiliza para unir el mAb al agente citotóxico. El enlace debe ser estable en la circulación para evitar la liberación inespecífica del fármaco y, por tanto, un posible efecto tóxico en las células de los tejidos sanos (Alley *et al.*, 2008). Además, el método de conjugación utilizado no debe modificar la afinidad y especificidad del mAb. Actualmente se utilizan dos clases de enlaces en el campo de los ADCs: enlaces escindibles y no escindibles. El primer grupo libera el agente citotóxico cuando son procesados por determinadas condiciones químicas del ambiente (como

el pH o condiciones reductoras) o por enzimas específicas presentes en diferentes compartimentos de las células. Por otro lado, los enlaces no escindibles necesitan de la degradación proteolítica del ADC en los lisosomas después de su internalización para liberar la carga útil activa (Nolting, 2013).

En tercer lugar, los agentes citotóxicos utilizados para la generación de ADCs pueden dividirse en dos amplios grupos: agentes inhibidores de la polimerización de los microtúbulos (análogos de auristatina, maitansinoides y tubulisinas) y agentes que dañan el ADN (caliqueamicinas, duocarmicinas y pirrolobenzodiazepinas). La primera clase de agentes citotóxicos induce catástrofe mitótica y la segunda altera el ADN, conduciendo en ambos casos a la apoptosis (Chen *et al.*, 2017). Si se considera el moxetumomab pasudotox como un ADC, también se puede incluir un tercer grupo de agentes citotóxicos que actúan sobre la síntesis de proteínas. Este ADC usa como agente citotóxico PE38, un fragmento de 38 kDa de la exotoxina A de *Pseudomonas* que actúa como un potente inhibidor de la síntesis de proteínas causando la muerte celular (Kreitman & Pastan, 2011). Una característica importante de los ADCs es la relación fármaco-anticuerpo (DAR, *drug-to-antibody ratio*) que representa el número de moléculas del agente citotóxico conjugadas por molécula de anticuerpo.

El mecanismo de acción de los ADC depende de varios pasos: unión a su antígeno diana en la superficie de la célula tumoral, internalización del complejo, liberación del agente citotóxico, interacción del agente citotóxico con su diana molecular en el citoplasma o núcleo y finalmente la inducción de muerte celular (Beck *et al.*, 2017; Joubert *et al.*, 2020).

3.3.2. T-DM1

T-DM1 está compuesto por trastuzumab unido mediante un residuo de lisina a un enlace tioéter no escindible llamado 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (MCC) covalentemente unido a su vez al derivado de maitansinoide DM1, un potente inhibidor de la polimerización de microtúbulos (Phillips *et al.*, 2008). Tras su aprobación en 2013 por la FDA, T-DM1 se ha convertido en el tratamiento estándar en segunda línea en pacientes con cáncer de mama HER2⁺ avanzado, pero también se administra en primera línea si se da recurrencia de la enfermedad durante el tratamiento adyuvante o en los seis meses siguientes a su terminación (Amiri-Kordestani *et al.*, 2014). Esta decisión fue consecuencia de los resultados obtenidos en dos ensayos clínicos de fase III: EMILIA y TH3RESA. En el ensayo

EMILIA, T-DM1 demostró una mayor eficacia clínica y mejor perfil de seguridad que lapatinib y capecitabina (el tratamiento en segunda línea en ese momento) después del tratamiento con trastuzumab y un taxano o como primera línea en pacientes con progresión rápida después de trastuzumab adyuvante (≤ 6 meses) (Verma *et al.*, 2012). Por otra parte, el ensayo TH3RESA mostró una ventaja clínica en el uso de T-DM1 frente al tratamiento de elección del médico en pacientes que habían recibido previamente trastuzumab, lapatinib y un taxano (Krop *et al.*, 2017).

Otros estudios clínicos han sido realizados con T-DM1. El estudio MARIANNE investigó el uso de T-DM1 en monoterapia o en combinación con pertuzumab como tratamiento de primera línea para el cáncer de mama HER2⁺ metastásico. Sin embargo, ninguno de los tratamientos mostró una eficacia estadísticamente superior al tratamiento con trastuzumab más un taxano aunque si una mejor tolerabilidad y un aumento en la calidad de vida relacionada con la salud (Perez *et al.*, 2017). En el ensayo KRISTINE, T-DM1 más pertuzumab fue menos eficaz que la terapia estándar de trastuzumab, pertuzumab, docetaxel y carboplatino como tratamiento neoadyuvante (Hurvitz *et al.*, 2019; Okines, 2017). Sin embargo, recientemente gracias a los resultados del ensayo clínico KATHERINE, ha sido aprobado el uso de T-DM1 para tratar pacientes con cáncer de mama HER2⁺ precoz que tienen enfermedad residual invasiva, en mama y/o ganglios linfáticos, tras el tratamiento neoadyuvante basado en terapia dirigida a HER2 y taxano (von Minckwitz *et al.*, 2019).

T-DM1 se une a HER2 y los complejos T-DM1-HER2 se internalizan en los endosomas tempranos por endocitosis mediada por receptores (Ritchie *et al.*, 2013). Las vesículas endocíticas maduran y se fusionan con los lisosomas o se reciclan de regreso a la membrana plasmática. La degradación lisosomal de T-DM1 da como resultado la liberación de residuos de lisina-MCC-DM1 (Lys-MCC-DM1), que como derivados de lisina, tienen carga positiva a pH fisiológico y, por lo tanto, son impermeables a la membrana. Por tanto, la Lys-MCC-DM1 requiere un transporte activo a través de la membrana lisosomal (Erickson *et al.*, 2006). Debido a su impermeabilidad, Lys-MCC-DM1 posee una capacidad limitada para difundir a células proximales que no sobreexpresen HER2 para inducir un efecto citotóxico de vecindad (*efecto bystander*). Esta falta de toxicidad es responsable de que T-DM1 sea efectivo únicamente en células que expresan altos niveles de HER2, pero tiene una actividad limitada en otras células con expresión baja o moderada (García-

Alonso *et al.*, 2018; Ocaña *et al.*, 2020). Finalmente, en el citoplasma Lys-MCC-DM1 se une a la tubulina inhibiendo su polimerización y por tanto la formación del huso mitótico. Como resultado, T-DM1 provoca parada en fase G₂/M del ciclo celular, conduciendo finalmente a catástrofe mitótica y muerte celular (Barok *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2008).

Por ello, T-DM1 tiene múltiples mecanismos de acción. Por un lado, los mecanismos específicos derivados de la acción de Lys-MCC-DM1. Por otra parte, se ha demostrado que T-DM1 retiene los mecanismos de acción de trastuzumab, incluyendo el bloqueo de las vías de señalización de HER2, la inhibición de la eliminación del ectodominio de HER2 y la inducción de ADCC (Junttila *et al.*, 2011).

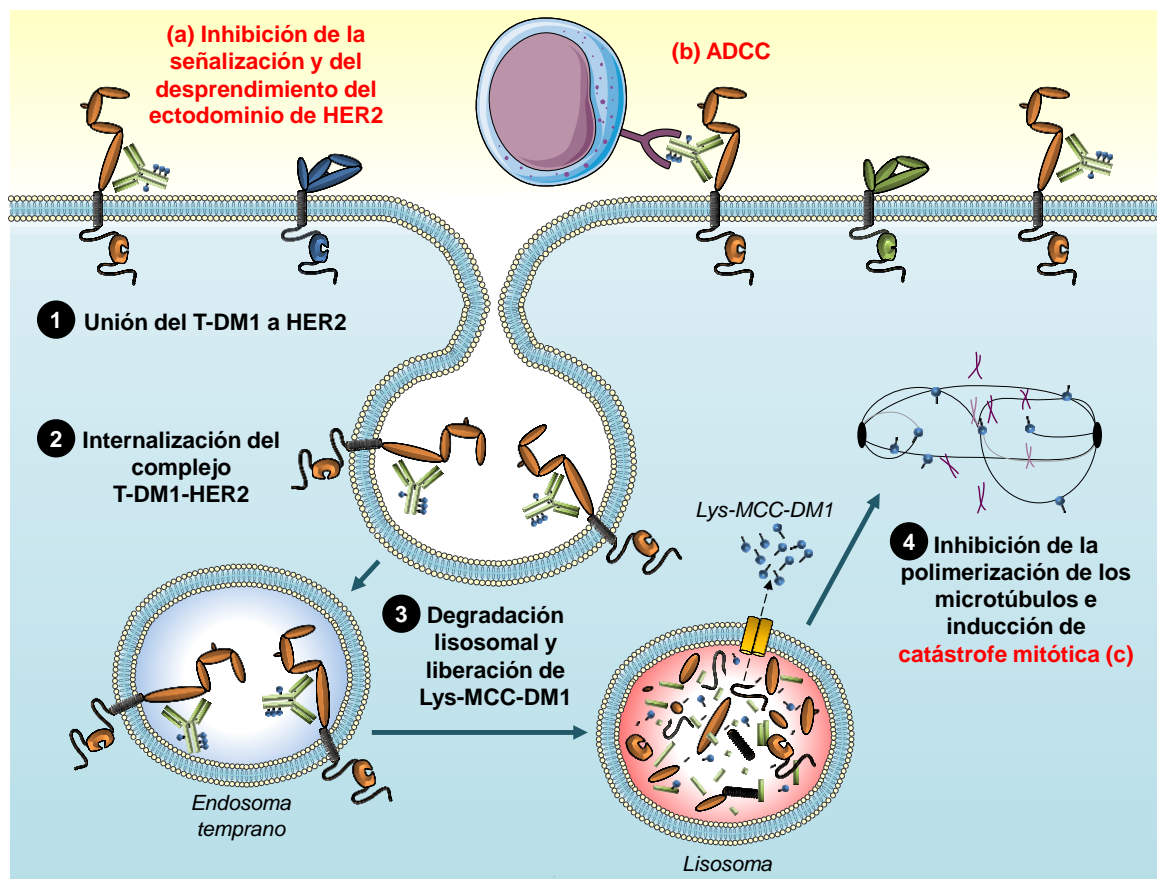


Figura 6. Internalización y mecanismo de acción de T-DM1. (1) Unión de T-DM1 a su antígeno HER2, seguida de (2) la internalización de los complejos T-DM1-HER2 hacia los endosomas y luego (3) a los lisosomas; donde se produce la digestión completa de trastuzumab para liberar los metabolitos activos, Lys-MCC-DM1. Al presentar carga positiva a pH fisiológico, el metabolito activo es incapaz de atravesar la membrana, por lo tanto, requiere de un transportador a través de la membrana lisosomal. Una vez en el citoplasma, se une a la tubulina (4), inhibiendo su polimerización e induciendo catástrofe mitótica. El mecanismo de acción del T-DM1 está indicado con las letras a, b y c y marcado en rojo.

3.3.3. T-DXd

T-DXd (Enhertu®) es un ADC compuesto por trastuzumab unido deruxotecan (DXd, derivado del exatecan), un inhibidor de la topoisomerasa I, mediante un enlace escindible sensible a enzimas lisosomales (Ogitani *et al.*, 2016). T-DXd mantiene las funciones de trastuzumab como ADCC e induce daño en el ADN y apoptosis gracias a la acción de DXd. La ventaja de T-DXd es que es efectivo en tumores con bajos niveles de HER2 en comparación con T-DM1 debido en parte a tener un DAR de 8 (en comparación con T-DM1, DAR=3,5). Otra de las ventajas de este ADC con respecto a T-DM1, es que DXd es permeable a través de la membrana y tiene efecto citotóxico de vecindad que permite eliminar células que no sobreexpresan HER2 en tumores heterogéneos. Además, DXd al tener una vida media corta minimiza una amplia exposición sistémica. Esto permitiría el uso de T-DXd en pacientes con tumores FISH-negativo, HER2 1+ o 2+, las cuales no responden a terapias anti-HER2.

Basado principalmente en los resultados del ensayo clínico de fase II DESTINY-Breast01, T-DXd fue aprobado por la FDA en 2019 y por la EMA en 2021 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama HER2⁺ metastásico que han recibido dos o más terapias anti-HER2 previamente. Muy recientemente, T-DXd ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con adenocarcinoma gástrico HER2⁺ o de la unión gastroesofágica localmente avanzado o metastásico que han recibido un régimen previo basado en trastuzumab (Keam, 2020; Modi *et al.*, 2020; Shitara *et al.*, 2021).

4. MECANISMOS DE RESISTENCIA A T-DM1

4.1. Tipos de resistencia

La plasticidad de las células cancerígenas les permite adaptarse y sobrevivir en presencia de fármacos antitumorales. La resistencia a estos fármacos puede ser primaria (también denominada de novo o intrínseca) o secundaria. La resistencia primaria ocurre cuando no hay respuesta desde el inicio del tratamiento. Por otro lado, la resistencia secundaria se refiere a las células tumorales que tienen una respuesta inicial al fármaco, pero desarrollan resistencia con el tiempo (Sharma *et al.*, 2017). Dentro de esta última clase de resistencia, se han considerado dos subtipos. La resistencia adaptativa ocurre cuando un clon o varios clones de células resistentes están presentes en un tumor heterogéneo. Esos clones resistentes

suelen representar una minoría con respecto a poblaciones sensibles y este es el motivo de la respuesta inicial del tumor. El tratamiento con el fármaco antitumoral reduce el volumen del tumor al actuar sobre la población sensible, pero no es tan eficaz contra los clones resistentes. Esa circunstancia permite que las células resistentes crezcan y se vuelvan predominantes en el tumor recidivante. Este tipo de resistencia secundaria se considera el más frecuente. El otro tipo de resistencia secundaria se denomina resistencia adquirida, que se caracteriza por la aparición de nuevas alteraciones moleculares en las células tumorales durante el tratamiento con el agente antitumoral. Estas alteraciones permiten a las células tumorales sobrevivir en presencia del fármaco.

4.2. Alteraciones en HER2

T-DM1 es un ADC dirigido contra HER2, por tanto, la disminución de sus niveles o su alteración estructural son posibles causas de resistencia (Burris *et al.*, 2011; LoRusso *et al.*, 2011). Recientemente se ha demostrado, en líneas celulares y en muestras de pacientes, que el tratamiento dual con trastuzumab y pertuzumab reduce los niveles de HER2, reduciendo la eficacia de T-DM1 como tratamiento en segunda línea (Bon *et al.*, 2020). Un estudio reciente afirma la necesidad de reanalizar el estado de HER2 en cáncer de mama metastásico por los cambios de expresión observados en HER2 (Van Raemdonck *et al.*, 2021). En este estudio, las pacientes con pérdida de HER2 mostraron una peor respuesta a T-DM1 y peor supervivencia global (*overall survival*, OS). Otros estudios previos también han demostrado discrepancias (tanto pérdida como ganancia) en los niveles de expresión de HER2 entre las lesiones primarias y metastásicas de cáncer de mama, siendo más frecuente la pérdida, así como en muestras pre- y post-tratamiento con terapias anti-HER2 (Aurilio *et al.*, 2014; Lower *et al.*, 2017; Mittendorf *et al.*, 2009; Niikura *et al.*, 2012; Schrijver *et al.*, 2018). Por tanto, la pérdida de HER2 es recurrente en pacientes con cáncer de mama HER2⁺ pretratado o metastásico.

En el ensayo KRISTINE, un subgrupo de 15 pacientes tratados con T-DM1 y pertuzumab que habían experimentado progresión locorregional antes de la cirugía mostraron una alta heterogeneidad en la expresión de HER2, que se asoció con niveles bajos de expresión, lo que podría haber contribuido a los peores resultados clínicos observados en el tratamiento con T-DM1 (Hurvitz *et al.*, 2019). Este fenómeno también ha sido observado en cáncer gástrico HER2⁺, donde se observó pérdida de la positividad para el estado de HER2 y menor respuesta a T-DM1 en un

buen número de pacientes (Seo *et al.*, 2019). Por otra parte, en pacientes con resistencia primaria a T-DM1 se observó pérdida de amplificación de *ERBB2* en el ADN tumoral circulante (Sakai *et al.*, 2018).

En varias líneas celulares con resistencia secundaria a T-DM1 generadas *in vitro*, se ha observado una disminución de la expresión de HER2 en comparación con las células parentales (Barok *et al.*, 2020; Endo *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Frank Loganzo *et al.*, 2015; Nadal-Serrano *et al.*, 2020; Sabbaghi *et al.*, 2017; Schwarz *et al.*, 2017; Sung *et al.*, 2018).

Sin embargo, no solo la pérdida de HER2 conduce a resistencia a trastuzumab y/o T-DM1, pues la expresión de formas truncadas de HER2 también puede desencadenar este fenotipo. Por ejemplo, p95HER2 genera resistencia a trastuzumab al carecer del subdominio IV al que se une el mAb (Scaltriti *et al.*, 2007). La expresión de MUC4, una mucina asociada a la membrana, está relacionada con resistencia a trastuzumab al enmascarar parcialmente a HER2 e impedir su unión (Nagy *et al.*, 2005). Este tipo de alteraciones podría darse también en resistencias a T-DM1. Por otra parte, se ha descrito una variante de corte y empalme que elimina el exón 16 en el dominio extracelular de HER2 (d16HER2) en cánceres de mama y líneas celulares HER2⁺. En un principio se observó que las líneas celulares que expresaban d16HER2 eran resistentes a trastuzumab (aunque el epítipo de trastuzumab se conservase) al estabilizar los homodímeros de HER2 y mantenerlos constitutivamente activos. Además, se describió que la variante d16HER2 interactuaba directamente con la tirosina quinasa Src. Gracias a esta observación, se describió que el tratamiento con el inhibidor de Src dasatinib revertía la resistencia a trastuzumab (Castiglioni *et al.*, 2006; Mitra *et al.*, 2009). Recientemente también se ha descrito que la isoforma d16HER2 confiere resistencia a T-DM1 *in vitro* debido a la baja internalización de d16HER2 (Turpin *et al.*, 2016). Sin embargo, otros estudios realizados *in vivo* o con datos y muestras de pacientes con cáncer HER2⁺ de mama y gastrointestinal reportan que tumores que expresan la isoforma d16HER2 son sensibles al tratamiento con trastuzumab (Alajati *et al.*, 2013; Castagnoli *et al.*, 2017; Castagnoli *et al.*, 2014; Volpi *et al.*, 2019). A pesar de estas controversias respecto a d16HER2, observándose resistencia *in vitro* y susceptibilidad *in vivo* a trastuzumab, no hay evidencias clínicas que asocien d16HER2 a resistencia a trastuzumab y/o T-DM1 (Castagnoli *et al.*, 2019). Además, mutaciones en *ERBB2*, principalmente en el dominio quinasa, se han relacionado

con resistencia a trastuzumab tanto en líneas celulares como en pacientes (Cocco *et al.*, 2019; Zuo *et al.*, 2016). Este mismo fenómeno podría darse en resistencias a T-DM1.

4.3. Alteraciones en la internalización de T-DM1

Una vez que T-DM1 se une a HER2, los complejos T-DM1-HER2 se internalizan en endosomas. La internalización de HER2 puede ser promovida por la proteína endofilina A2. De hecho, se ha observado que el silenciamiento de esta proteína en células HER2⁺ reduce la internalización de HER2 y disminuye la respuesta a trastuzumab y T-DM1 (Baldassarre *et al.*, 2017).

Los procesos de ubiquitinación y tráfico de HER2 hacia los lisosomas pueden verse alterados por su asociación constitutiva con la chaperona HSP90 y, por tanto, alterar la eficacia de las terapias dirigidas a HER2 como T-DM1. De hecho, la inhibición de HSP90 mediada por 17-AAG en combinación con trastuzumab potencia la captación endocítica de HER2 hacia los lisosomas y su degradación. Además, la combinación de 17-AAG y trastuzumab tiene efectos antiproliferativos y apoptóticos sinérgicos en las células de cáncer de mama HER2⁺ (Raja *et al.*, 2008).

Por otra parte, un mayor reciclaje a la membrana plasmática de los endosomas que contienen HER2 podría desviar a T-DM1 del tráfico hacia los lisosomas y, por lo tanto, disminuir su actividad antitumoral mediada por Lys-MCC-DM1. HER2 se caracteriza por su reciclaje rápido y se ha observado este proceso tras la unión de trastuzumab (Austin *et al.*, 2004). De hecho, Austin y colaboradores reportaron que la geldanamicina, otro inhibidor de HSP90, disminuye el reciclaje de HER2, aumenta la localización de RTK en las vesículas intracelulares, mejora su degradación y aumenta la concentración de complejos HER2-trastuzumab en células tumorales. En un modelo preclínico de resistencia adquirida a T-DM1 se ha observado un mayor reciclaje de los complejos T-DM1-HER2 y una liberación intracelular reducida de DM1. Sin embargo, este modelo tiene de partida unos niveles de HER2 más bajos que la línea parental, lo que también contribuye al fenotipo de resistencia (F. Loganzo *et al.*, 2015).

Un posible mecanismo de resistencia a T-DM1 descrito recientemente, es la internalización de T-DM1 a través de caveolas compuestas por caveolina-1 (CAV1), limitando su llegada a los lisosomas. En el modelo preclínico analizado se observó una sobreexpresión de CAV1 en la línea celular con resistencia adquirida a T-DM1.

Además, la colocalización de T-DM1 y CAV1 se correlacionó con una disminución de la respuesta a T-DM1 en un panel de células HER2⁺. Sin embargo, el silenciamiento de CAV1 no fue suficiente para resensibilizar la línea resistente a T-DM1 (Sung *et al.*, 2018). De hecho, otros autores han relacionado la internalización dependiente de CAV1 con mayor sensibilidad a T-DM1 (Chung *et al.*, 2018; Chung *et al.*, 2015).

4.4. Alteraciones a nivel lisosomal

La llegada de T-DM1 a los lisosomas y su procesamiento por las enzimas lisosomales es esencial para la liberación de los catabolitos activos Lys-MCC-DM1. Los lisosomas son compartimentos ácidos y su capacidad proteolítica depende de las bombas de protones vacuolar H⁺-ATPasa (V-ATPasa) que regulan el pH lisosomal. Dado que las membranas lisosomales son impermeables a los catabolitos que presentan carga, Lys-MCC-DM1 requiere mecanismos de transporte desde el interior del lisosoma al citosol. Alteraciones en todos estos pasos han sido observadas en modelos con resistencia adquirida a T-DM1 (Barok *et al.*, 2014; García-Alonso *et al.*, 2020).

Nuestro grupo describió que un incremento del pH lisosomal, así como una reducción de la actividad de proteasas lisosomales, son causa de resistencia a T-DM1 (Ríos-Luci *et al.*, 2017). En otro modelo de resistencia a T-DM1 también se reportó una disminución de la acidificación del lisosoma. En este caso, se observó una reducción de las concentraciones intracelulares de Lys-MCC-DM1 como consecuencia de una actividad aberrante de la V-ATPasa en los lisosomas de las células resistentes que disminuyó el metabolismo de T-DM1 y la producción del catabolito activo (Wang *et al.*, 2017).

Por otra parte, se ha descrito que SLC46A3 es una proteína de la membrana de los lisosomas que media el transporte de Lys-MCC-DM1 del interior lisosomal al citoplasma celular. La pérdida de expresión de SLC46A3 se ha observado en varios modelos con resistencia adquirida a T-DM1 y su expresión lentiviral restaura la sensibilidad a T-DM1 (Hamblett, Jacob, *et al.*, 2015; Kinneer *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018).

4.5. Aumento de la expresión y actividad de bombas de expulsión de fármacos

El aumento de expresión y/o actividad de bombas de expulsión ha sido un mecanismo ampliamente estudiado en resistencias a quimioterapia (Robey *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2012). Con respecto a T-DM1, se ha descrito que algunas bombas de expulsión de fármacos de la familia ABC (*ATP-binding cassette*, casete de unión a ATP) pueden expulsar el compuesto Lys-MCC-DM1 al medio extracelular, evitando que se una a la tubulina y ejerza su acción antitumoral. Concretamente, se ha reportado que la alteración en la expresión de ABCB1/MDR1/P-gp, ABCC1/MRP1, ABCC2 y ABCG2/BCRP/MXR/ABCP conduce a resistencia a T-DM1 en modelos preclínicos (Le Joncour *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2018; F. Loganzo *et al.*, 2015; Takegawa *et al.*, 2017; Yamazaki *et al.*, 2021). En estos estudios, la inhibición de la actividad de los transportadores restauraba la sensibilidad a T-DM1.

4.6. Aumento de la producción de ligandos y activación de RTK alternativos

En un estudio *in vitro*, la adición de NRG inhibió la acción del T-DM1 en algunas líneas celulares HER2⁺. Esto fue debido a la dimerización de HER2/HER3 y la activación de la vía PI3K/Akt. De hecho, este efecto se revirtió mediante la adición de pertuzumab, que inhibe dicha dimerización (Phillips *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que ligandos como NRG pueden afectar la sensibilidad a T-DM1 y por tanto ser un posible biomarcador de refractariedad a T-DM1. Un estudio reciente ha demostrado que un incremento de NRG1 exógena atenúa el efecto citotóxico de T-DM1 en células BT474 cultivadas en 3D y que los niveles de ARNm de NRG1 se correlacionan positivamente con un aumento de la concentración media inhibitoria (IC₅₀, *half maximal inhibitory concentration*) de T-DM1 en un panel de líneas celulares HER2⁺ (Schwarz *et al.*, 2017). De hecho, en las líneas celulares de cáncer de mama HER2⁺ con resistencia secundaria a T-DM1 se observó una mayor expresión y activación de HER3 y de su ligando NRG1. Por otra parte, se observó un aumento significativo de los transcritos de NRG1 en muestras tumorales pareadas que progresaron después de terapias anti-HER2, incluyendo T-DM1 (Schwarz *et al.*, 2017). En este mismo estudio también se observó reducción de los niveles proteicos de HER2 (en un 63,6% de las muestras pareadas) tras el tratamiento e incluso pérdida de amplificación.

Dos trabajos independientes han reportado que en sus modelos con resistencia adquirida a T-DM1 y resistencia primaria a trastuzumab, la disminución de los niveles de HER2 ha ido acompañada de un aumento de los niveles de EGFR (Endo *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018). Sin embargo, el silenciamiento de EGFR no es suficiente para revertir el fenotipo de resistencia (Li *et al.*, 2018). Endo y colaboradores observaron que el aumento de los niveles de EGFR conducía a un aumento de los niveles de integrinas ($\alpha 5\beta 1$ y $\alpha V\beta 3$) que resultaba en una mayor movilidad e invasión de las células resistentes.

4.7. Alteraciones en proteínas implicadas en vías celulares

Sabbaghi y colaboradores observaron que en líneas celulares de cáncer de mama HER2⁺ sensibles a T-DM1, el tratamiento con el ADC provocaba un incremento de la ciclina B1 y arresto en la fase G₂/M, proceso que desencadena catástrofe mitótica. Sin embargo, este fenómeno no se observó en células resistentes a T-DM1, donde no se produjo una acumulación de la ciclina B1. En este estudio, el silenciamiento de ciclina B1 en las líneas parentales generó resistencia a T-DM1 y el aumento de los niveles de ciclina B1 sensibilizó parcialmente a las líneas resistentes (Sabbaghi *et al.*, 2017). Cabe destacar que los autores también observaron en una cohorte de 18 explantes de cáncer de mama HER2⁺ que el efecto de T-DM1 fue paralelo a la acumulación de ciclina B1. La ciclina B1 es una proteína esencial para la actividad de la quinasa 1 dependiente de ciclina (CDK1, *cyclin dependent kinase 1*) y la progresión a la fase M, y su degradación es requerida para salir de la mitosis. Por tanto, la inducción defectuosa de ciclina B1/CDK1 por T-DM1 en las células resistentes impide la progresión del ciclo celular, ocasionando la salida mitótica y la citocinesis, y por tanto, impidiendo el arresto en la fase G₂/M y el fenómeno de catástrofe mitótica (Hunter *et al.*, 2020).

En otro estudio se ha observado un aumento de la expresión de la quinasa tipo polo 1 (PLK1, *polo-like kinase 1*) en modelos resistentes a T-DM1 en comparación con las líneas celulares parentales. La inhibición de PLK1, tanto a nivel genómico como farmacológico con volasertib, revertió la resistencia a T-DM1 en los modelos preclínicos (Saatci *et al.*, 2018). PLK1 juega un papel importante tanto en el inicio como en la finalización de la mitosis y su regulación dinámica a través de esta fase del ciclo celular es esencial para la ejecución correcta de la misma (Schmucker & Sumara, 2014).

En células con resistencia adquirida a T-DM1 se ha descrito que la disminución de los niveles de PTEN (*phosphatase and tensin homolog*, homólogo de fosfatasa y tensina) contribuye al fenotipo de resistencia. De hecho, la disminución de los niveles de PTEN en la línea parental redujo la acción de T-DM1 y de trastuzumab. Además, un inhibidor de PI3K revertió la resistencia a T-DM1 ocasionada por la pérdida de PTEN (Li *et al.*, 2018). PTEN es una fosfatasa que actúa como supresor tumoral al desfosforilar a fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), un producto lipídico y mensajero secundario de PI3K. Mediante esta acción, antagoniza directamente la función de PI3K y bloquea, por tanto, la activación de eventos de señalización descendentes, incluyendo la vía Akt y la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR, *mammalian target of rapamycin*) entre otras (Chalhoub & Baker, 2009; Molinari & Frattini, 2013). De hecho, la pérdida y la disminución de los niveles de PTEN han sido relacionadas con resistencia a trastuzumab (Aghazadeh & Yazdanparast, 2017; Du *et al.*, 2014; Nagata *et al.*, 2004). En general, deleciones en *PTEN* y mutaciones activantes en *PIK3CA* ocasionan la activación constitutiva de PI3K/Akt, que se han relacionado con resistencia a terapias contra receptores HER (Arteaga & Engelman, 2014; Berns *et al.*, 2007).

En células de carcinoma de esófago resistentes a T-DM1 se han observado alteraciones en la expresión de genes implicados en la adhesión celular y la señalización de prostaglandinas (Sauveur *et al.*, 2018). Estos cambios promueven alteraciones en la morfología celular, aumento de la migración y la supervivencia. Sin embargo, el mecanismo específico por el cual estos cambios de expresión en genes implicados en la adhesión celular y la ruta de señalización de prostaglandinas conducen a resistencia a T-DM1 está por elucidar.

Recientemente se ha reportado que la activación de STAT3 mediada por la sobreexpresión del receptor del factor inhibidor de la leucemia (LIFR, *leukemia inhibitory factor receptor*) confiere resistencia a T-DM1. Dicha activación conduce a la expresión y secreción de factores que inducen a la resistencia. La inhibición de STAT3 resensibiliza las células a la acción del T-DM1, tanto *in vitro* como *in vivo* (Wang *et al.*, 2018). Por otra parte, se ha relacionado el aumento de expresión del receptor huérfano 1 similar al receptor tirosina quinasa (ROR1, *receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1*) y un incremento de células madre cancerosas con resistencia a T-DM1 (Islam *et al.*, 2019).

Recientemente, en una línea de cáncer de mama HER2⁺ con resistencia adquirida a T-DM1, se observó un aumento de la resistencia a los agentes anti-tubulina. Estas células presentaban menores niveles de tubulina polimerizada y tubulina βIII y un aumento de la aneuploidía basal. Sin embargo, el silenciamiento de tubulina βIII en la línea parental no fue suficiente para generar resistencia a T-DM1. Es probable que la causa de la resistencia sea multifactorial y uno de estos factores sean las modificaciones del complejo microtúbulos/tubulina y la inestabilidad cromosómica (Sauveur *et al.*, 2020).

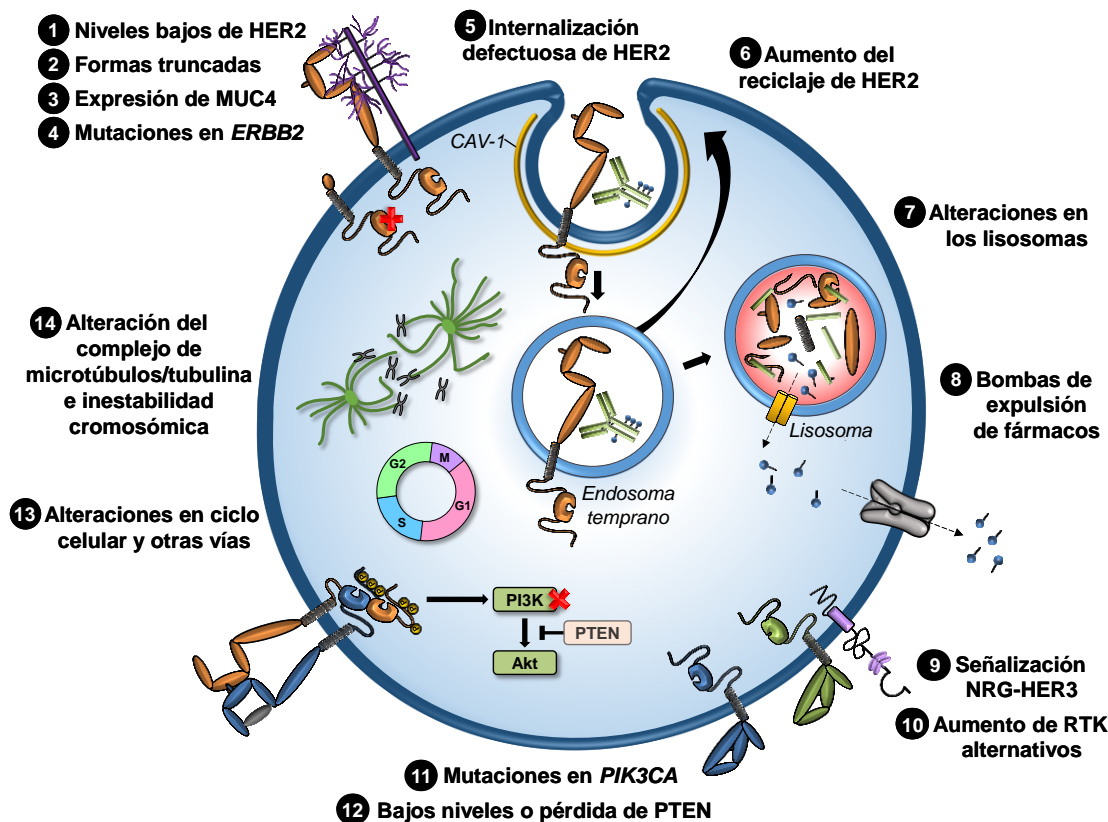


Figura 7. Mecanismos de resistencia a T-DM1. Esquema representativo de los mecanismos (posibles o descritos) implicados en la resistencia a T-DM1.

OBJETIVOS

La tirosina quinasa transmembrana HER2 es importante en la homeostasis humana y su desregulación se ha relacionado con ciertos tipos de cáncer, como el cáncer de mama, en el que el 15-20% sobreexpresa HER2. Estos tumores tienden a crecer y diseminarse más rápido que otros cánceres de mama, pero es mucho más probable que respondan al tratamiento dirigido contra HER2. De hecho, las terapias anti-HER2 han demostrado ser muy eficaces y han aumentado las tasas de supervivencia de los pacientes con cáncer de mama HER2⁺ en los últimos 20 años.

A pesar de la impresionante eficacia clínica observada, la resistencia primaria y secundaria a dichos fármacos ha surgido como un problema clínico. Aunque se han descrito diferentes mecanismos de resistencias a terapias dirigidas contra HER2, la incidencia de resistencias a tratamientos anti-HER2 es significativamente mayor que la frecuencia de presentación de las anomalías moleculares descritas, lo cual indica que deben existir mecanismos alternativos de resistencia.

Considerando lo anterior, nos planteamos el objetivo de identificar nuevas dianas terapéuticas en cáncer de mama HER2⁺ y su aplicabilidad en el escenario de resistencia a terapias anti-HER2.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

Los productos químicos genéricos usados en el laboratorio de forma rutinaria fueron obtenidos a través Sigma-Aldrich (Madrid, España), Roche Biochemicals (St Louis, Estados Unidos) y Merck (Darmstadt, Alemania). Los medios de cultivo, antibióticos, tripsina-EDTA y suero bovino fetal (FBS, *fetal bovine serum*) fueron adquiridos a través de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Estados Unidos). El material de plástico estéril de BD Biosciences (Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos) y Corning Incorporated (Corning, Nueva York, Estados Unidos) fueron adquiridos también a través de Thermo Fisher Scientific.

Para transfecciones celulares se empleó jetPEI® de Polyplus Transfection (Illkirch, France) y vectores lentivirales suministrados por Cultek (Madrid, España), Addgene (Cambridge, MA, USA) o Sigma-Aldrich. La puromicina empleada para la selección fue de Sigma-Aldrich.

La monometil auristatina F (MMAF) se adquirió a través de Sigma-Aldrich. Lapatinib y neratinib a través de Selleckchem (Houston, TX). EV20 y EV20/MMAF fueron generados por Mediapharma y fueron proveídos a través del Dr. Gianluca Sala (Universidad de Chieti-Pescara, Chieti, Italia). Trastuzumab, pertuzumab y T-DM1, de Hoffmann-La Roche (Basilea, Suiza), se compraron a través de una farmacia local.

La proteína A-Sefarosa® y estreptavidina-sefarosa *High Performance* fueron distribuidas por GE Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido).

Las membranas de PVDF Immobilon®-P fueron compradas a Millipore Corporation (Billerica, Massachusetts, Estados Unidos) y las películas de autorradiografía, a Agfa (Mortsel, Bélgica).

2. ANTICUERPOS

Los anticuerpos utilizados en la presente tesis doctoral se detallan en la tabla 3 (anticuerpos primarios) y tabla 4 (anticuerpos secundarios). Todos los anticuerpos generados en el laboratorio son anticuerpos policlonales de conejo y fueron generados como se describe en Sánchez-Martín & Pandiella, 2012.

Tabla 3. Anticuerpos primarios

Antígeno	Aplicación, dilución/cantidad	Referencia	Casa comercial
Calnexina	WB, 1:40.000	ADI-SPA-860-F	Enzo Life Science
Calnexina (E-10)	WB, 1:20.000	sc-46669	Santa Cruz
GAPDH	WB, 1:10.000	sc-166574	Santa Cruz
BUBR1	WB, 1:3.500	612503	BD Biosciences
Caspasa 3 procesada	WB, 1:1.000	#9664	Cell Signaling
Fosfo-histona H3 en Ser10 (pHistona H3)	WB, 1:6.000	06-570	Merck
Fosfo-Akt en Ser473 (pAkt)	WB, 1:5.000	560397	BD Biosciences
EGFR (528)	IP, 1 µg	sc-120	Santa Cruz
EGFR	WB, 1:15.000	(Sánchez-Martín & Pandiella, 2012)	Hecho en el laboratorio
HER2 (Ab3)	WB, 1:10.000	OP15	Calbiochem
HER2	IP, 1 µg	Trastuzumab	Roche
Fosfo-HER2 en Tyr1221/22, (pHER2)	WB, 1:1.000	#2249	Cell Signaling
HER3	WB, 1:5.000 IP, 1 µg	(Sánchez-Martín & Pandiella, 2012)	Hecho en el laboratorio
Fosfo-HER3 en Tyr1289 (pHER3)	WB, 1:5.000	#4791	Cell Signaling
HER4	WB, 1:2.500 IP, 1 µg	(Sánchez-Martín & Pandiella, 2012)	Hecho en el laboratorio
Fosfo-Tyr (PY99)	WB, 1:10.000	sc-7020	Santa Cruz
β-tubulina	IF, 1:200	T4026	Sigma-Aldrich
LAMP1	IF, 1:100 WB, 1:3.000	#9091	Cell Signaling

WB: Western blot, IP: inmunoprecipitación, IF: inmunofluorescencia

Tabla 4. Anticuerpos secundarios y reactivos de detección

Especie reconocida – antígeno (molécula conjugada)	Aplicación, dilución	Referencia	Casa comercial
Conejo – IgG (HRP)	WB, 1:20.000	1706515	Bio-Rad Laboratories
Ratón – IgG (HRP)	WB, 1:10.000	NA931	GE Healthcare
Humano – IgG (HRP)	WB, 1:40.000	109-035-088	Jackson ImmunoResearch

Conejo – IgG (Starbright 700)	WB, 1:5.000	12004162	Bio-Rad Laboratories
Ratón – IgG (Starbright 520)	WB, 1:5.000	12005867	Bio-Rad Laboratories
Conejo – IgG (Cy2)	IF, 1:100	111-225-144	Jackson ImmunoResearch
Ratón – IgG (Cy2)	IF, 1:100	PA42002	GE Healthcare
Humano – IgG (Cy3)	IF, 1:800	109-165-003	Jackson ImmunoResearch
Estreptavidina-HRP	WB, 1:50.000	N100	Thermo Fisher Scientific

IgG: Inmunoglobulina G, WB: Western blot, IF: inmunofluorescencia, Cy: cianina, HRP: peroxidasa de rábano

1.1. Conjugación de anticuerpos a SMCC-DM1

La conjugación de pertuzumab y cetuximab a SMCC-DM1 se realizó mediante el reactivo SET0101 de Levena Biopharma (San Diego, California, Estados Unidos) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3. CULTIVOS CELULARES

3.1. Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas en la tesis doctoral se detallan en la Tabla 5. Todas las líneas celulares que son de procedencia humana se obtuvieron de la ATCC (*American Type Culture Collection*) excepto PDX118, TR1 y TR2, que fueron generosamente proporcionadas por el laboratorio del Dr. Joaquín Arribas (VHIO, Barcelona).

Tabla 5. Líneas celulares

Línea celular	Tejido	Medio de cultivo
BT474 y líneas celulares resistentes a terapias anti-HER2 derivadas de la misma	Carcinoma ductal de mama HER2 ⁺	DMEM
PDX118, TR1 y TR2 (líneas resistentes a trastuzumab)	Obtenido de un xenoinjerto tumoral derivado del paciente (PDX, <i>patient-derived xenograft</i>). Este tumor provenía de una paciente con cáncer de mama HER2 ⁺	DMEM
HCC1419	Carcinoma ductal primario de mama HER2 ⁺	RPMI 1640

HCC1569	Carcinoma metaplásico primario de mama HER2 ⁺	RPMI 1640
HCC1954	Carcinoma ductal de mama HER2 ⁺	RPMI 1640.
HCC2218	Carcinoma ductal de mama HER2 ⁺	RPMI 1640
SKBR3	Adenocarcinoma de mama HER2 ⁺	DMEM
MDA-MB-361	Adenocarcinoma de mama HER2 ⁺	DMEM
BT549	Carcinoma ductal de TNBC	RPMI 1640
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de TNBC	DMEM
HS-5	Fibroblastos de médula ósea/estroma	DMEM
HEK-293T	Fibroblasto embrionario de riñón (variante de la línea HEK-293 que contiene el antígeno T largo de SV40)	DMEM

3.2. Condiciones de cultivo y mantenimiento

Las líneas celulares se cultivaron en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) o RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (detallado en la tabla 5) suplementado con FBS al 10% y antibióticos (penicilina/estreptomicina) al 1%.

Las células se cultivaron en placas estériles en incubadores con atmósfera húmeda al 5% de CO₂ y temperatura constante de 37°C. Periódicamente, las células se subcultivaron para su mantenimiento y/o plaqueo de experimentos. Para ello, se lavaron con tampón fosfato salino (PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄) y se incubaron aproximadamente 5 minutos con tripsina-EDTA, que se neutralizó pasado este tiempo con medio de cultivo. Posteriormente, la suspensión celular se diluyó adecuadamente según la línea celular en nuevas placas de cultivo para su mantenimiento.

3.3. Preservación de líneas celulares

Las células fueron congeladas a partir de cultivos en fase de crecimiento exponencial. Para congelar las células, las monocapas celulares a una confluencia del 70-80% fueron tripsinizadas y centrifugadas a 219 x g durante 3 minutos. Pasado este tiempo, las células se resuspendieron en 1,5 ml de medio de congelación, DMEM o RPMI 1640, según el tipo celular, suplementado con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, *dimethyl sulfoxide*) como agente crioprotector. Los crioviales se mantuvieron a -80°C durante 24 horas y, a continuación, se transfirieron a tanques de nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

Cuando las líneas celulares se quisieron descongelar para su uso, los criovales se depositaron en un baño termostático a 37°C durante 3-5 minutos. Posteriormente las células se recolectaron con medio y se centrifugaron a 219 x g durante 3 minutos. Finalmente, se plaquearon en placas estériles.

3.4. Generación de líneas resistentes a terapias anti-HER2

Las células resistentes a trastuzumab, lapatinib, neratinib y T-DM1 fueron generadas de manera previa a mi incorporación al laboratorio mediante exposición continua a los fármacos. Brevemente, para la generación de un conjunto (“pool”) de células BT474 resistentes a trastuzumab, denominado BTRH (BT474 Resistente a Herceptina), 5.000 células se sembraron en placas de 150 mm que luego se trataron con trastuzumab 50 nM durante 12 meses, reemplazando semanalmente el medio suplementado con el fármaco. Luego, las células resistentes se mantuvieron en ausencia o presencia de trastuzumab durante un período adicional de 6 meses. La razón para mantener cultivos con o sin trastuzumab fue explorar la estabilidad del fenotipo resistente. De hecho, se encontró innecesario mantener trastuzumab una vez que se estableció la resistencia al medicamento. En el caso de los clones resistentes a trastuzumab, las células BT474 fueron sembradas a baja densidad en placas de 150 mm y se trataron con trastuzumab 50 nM durante 2 meses. Luego, se aislaron clones individuales y se transfirieron de forma individual a placas de 24 pocillos.

La generación de clones resistentes a T-DM1 se logró cultivando células BT474 (5.000 células en placas de 150 mm) durante tres meses en presencia de T-DM1 5 nM.

Para la generación de células resistentes a lapatinib o neratinib, 5.000-20.000 células BT474 se plaquearon en placas de 150 mm y se trataron a diferentes concentraciones (1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 o 5000 nM) dependiendo del TKI. Después de tres meses en cultivo bajo la presencia continua de los fármacos (los medios se reemplazaron semanalmente) se obtuvieron clones de células resistentes. La mejor selección se logró con dosis de 1 y 5 µM de lapatinib y 10 y 25 nM de neratinib.

Los clones estables generados resistentes a fármacos anti-HER2 se analizaron de manera rutinaria mediante conteo celular para comprobar que mantenían la resistencia al fármaco.

4. INFECCIONES VIRALES

Los experimentos de silenciamiento génico se realizaron mediante lentivirus generados por las células HEK293T. Para la producción de los lentivirus, se sembraron las células HEK293T en placas de 100 mm, y a las 24 horas, fueron transfectadas con un sistema que requiere el empleo de cuatro plásmidos (Addgene, Cambridge, Estados Unidos):

- 1) Vector lentiviral (8 µg): pLKO.1-puro o shRNA (*short hairpin* RNA, ARN en horquilla corto) no codificante que contenía un shRNA que no estaba dirigido contra ningún gen humano (control negativo, shControl) o pLKO.1-shRNA dirigido al gen específico que queremos silenciar (Tabla 6).
- 2) pMD2.G (4 µg). Contiene la secuencia codificante de VSV G, la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular que constituye la envuelta del virus.
- 3) pRSV-Rev (4 µg). Contiene el ADNc de *rev* (codifica la proteína Rev que permite la exportación del núcleo al citoplasma del ARNm que contiene el elemento RRE, permitiendo los eventos posteriores de traducción y empaquetado de viriones).
- 4) pMDLg/pRRE (4 µg). Contiene las secuencias codificantes de *gag* (codifica las proteínas estructurales principales de la partícula viral), *pol* (codifica enzimas específicas del retrovirus) y una secuencia que contiene RRE (sitio de unión para la proteína Rev).

La co-transfección se realizó en células HEK293T usando el reactivo jetPEI® (Polyplus-transfection, Illkirch, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron los 20 µg de los plásmidos anteriores y se llevaron hasta un volumen final de 250 µl con NaCl 150 mM. Por otra parte, se mezclaron 40 µl de jetPEI® con 210 µl de NaCl para cada vector viral usado. A continuación, se transfirió la solución de jetPEI® a cada tubo, se mezclaron las soluciones y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Pasado este tiempo, la mezcla se adicionó, gota a gota, sobre el medio de cultivo de las HEK293T. A las 24 horas se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco. Al día siguiente (48 horas después de la co-transfección), se recogió el medio que contenía las partículas lentivirales y se filtró con un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro (Merck Millipore). A este medio filtrado se le adicionó 6 µg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich) para aumentar la eficiencia de la transducción celular y se usó para infectar las células diana.

Transcurridas 8-12 horas, se repitieron los pasos de recogida de medio, filtración e infección. A las 24 horas de la primera infección, se retiró el medio con los lentivirus y se reemplazó por medio de cultivo fresco. En total, las células infectadas se cultivaron durante 48-72 horas y posteriormente se seleccionaron con 3 µg/ml de puromicina (Sigma-Aldrich) durante otras 48-72 horas.

Se probaron cinco secuencias diferentes de shRNA para cada gen y las dos que produjeron los mayores niveles de silenciamiento de las proteínas se utilizaron para los experimentos de proliferación (Tabla 6).

Tabla 6. Secuencias de shRNA

Gen	Referencia del clon (Referencia en la tesis)	Secuencia madura antisentido
ERBB3	TRCN0000000623 (shHER3 #1)	AAT CAG GGT TAT CAA AGG CAG
	TRCN0000009835 (shHER3 #2)	TCA ATA TCT ACT CCT AAC CT

5. CONTAJE CELULAR. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Para llevar a cabo los experimentos a una densidad celular determinada, se realizó previamente el recuento de las células a plaquear. Las células se lavaron con PBS y se tripsinizaron. Posteriormente la tripsina se inactivó con medio. A continuación, se recogieron 500 µl de la suspensión celular en un vaso de poliestireno (Beckman Coulter Life Sciences, Indianápolis, Estados Unidos) que contenía 9,5 ml de ISOTON® (Beckman Coulter Life Sciences). El conteo de las células se realizó en un contador de partículas Z1 Coulter (Beckman Coulter, Pasadena, CA, Estados Unidos), que cuantifica partículas con un tamaño comprendido entre 8 y 24 µm. El número de partículas por ml estimado por el contador se multiplicó por el factor de dilución empleado (20) para estimar el número de células en la suspensión celular. El número de células plaqueadas para cada experimento varía según el tipo de ensayo, la línea celular y el tiempo de duración del experimento.

Por otra parte, la proliferación celular se analizó mediante ensayos de conteo celular. Para ello las células se sembraron en placas de 6 pocillos a la densidad estimada (según la línea celular y el día de recuento). Si era necesario, a las 24 horas el medio se reemplazó con medio de cultivo completo que contenía los fármacos de estudio. Para realizar el conteo, se retiró el medio, las células se

lavaron con PBS, se añadieron 200 µl de tripsina y las células se recogieron con 2 ml de medio que se diluyeron en ISOTON® (1 ml de la suspensión celular en 9 ml de ISOTON®) para ser contadas en el contador de partículas Z1 Coulter. Para calcular el número de células por pocillo, el valor de partículas por ml estimado por el contador se multiplicó por 10 (factor de dilución) y 2,2 ml (volumen final de la suspensión celular).

Los resultados están representados como la media y la desviación estándar (SD, *standard deviation*) de los triplicados de un experimento representativo que fue repetido al menos dos veces. Para determinar los valores de IC₅₀ estimados de los ensayos de contaje se utilizó Graphpad Prism 6.0 (software GraphPad, La Jolla, CA, Estados Unidos).

6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

6.1. Preparación de lisados celulares

Para preparar los lisados celulares, las células se lavaron dos veces con PBS frío y se añadió tampón de lisis frío (20 mM Tris-HCl pH 7,0, 140 mM NaCl, 50 mM EDTA, 10% glicerol, 1% Nonidet P-40) suplementado con inhibidores de proteasas (1 µM pepstatina, 1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina) y fosfatasas (25 mM β-glicerol fosfato, 50 mM fluoruro sódico, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1 mM ortovanadato sódico) en las placas sobre hielo durante 10 minutos. Pasado este tiempo, las células se lisaron mecánicamente con ayuda de un raspador, los lisados fueron transferidos a tubos de microcentrífuga y se centrifugaron a 17.000 x g a 4°C durante 10 minutos. Finalmente, los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos. La concentración de proteína en los lisados se midió por el ensayo del ácido bicinconínico (BCA, *bicinchoninic acid*) mediante el *kit Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.2. Preparación de extractos a partir de muestras humanas y animales

Las muestras de tumores y órganos procedentes de los ratones se obtuvieron tras sacrificar a los animales y fueron lavadas con PBS e inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C.

Se analizaron un total de 16 tumores de cáncer de mama HER2⁺ obtenidos del departamento de Patología del Hospital Universitario de Salamanca. Todas las pacientes proporcionaron un informe de consentimiento por escrito para la recogida de las muestras y su subsiguiente análisis. El procedimiento fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital de Salamanca.

En el momento de la preparación de los extractos, las muestras fueron descongeladas en hielo, cortadas con un bisturí y homogeneizadas en un homogenizador (*Dispomix drive tissue homogenizer*, Medic tools) en el mismo tampón de lisis que para las células, pero con una concentración 10 veces mayor de inhibidores de proteasas (10 μ M pepstatina, 10 μ g/ml aprotinina, 10 μ g/ml leupeptina). Se empleó 1,5-2 ml de lisis por cada 100 mg de muestra. Tras el procesamiento de las muestras, se centrifugaron a 17.000 x g durante 20 minutos a 4°C y los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos para su posterior cuantificación mediante BCA.

6.3. Inmunoprecipitación

En el caso de que fuese necesario enriquecer la cantidad de la proteína de interés en la muestra, se llevó a cabo la técnica de inmunoprecipitación. Para ello, se incubaron cantidades iguales de extracto proteico de las diferentes muestras a analizar con el anticuerpo correspondiente contra la proteína de interés (Tabla 3) y 60 μ l de proteína A-Sefarosa® (1:2) durante al menos 2 horas a 4°C. Los complejos inmunes se recuperaron mediante una centrifugación corta a 17.000 x g durante al menos 30 segundos, seguido de tres lavados con 1 ml de tampón de lisis frío. El volumen final (30 μ l) se mezcló con 30 μ l de tampón de carga 2X para que quedase a concentración final 1X (2% SDS, 0,0125% azul de bromofenol, 10% glicerol, 1% β -mercaptoetanol, 50 nM Tris-HCl pH 6,8).

6.4. Inmunoprecipitación de superficie

Para la inmunoprecipitación de superficie, las células en monocapa se lavaron dos veces con tampón Krebs-Ringer-HEPES (KRH, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 6 mM glucosa, 50 mM HEPES pH 7,4) y se incubaron en el mismo tampón con 10 nM EV20/MMAF o 10 ó 50 nM trastuzumab durante 2 horas a 4°C en agitación suave de tipo mecedora. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS frío, se lisaron y cuantificaron, y cantidades proporcionales de cada extracto celular se precipitaron con proteína A-Sefarosa®

usando los anticuerpos unidos a las células durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se lavaron y procesaron los inmunocomplejos como se explica en el apartado anterior y se detectaron mediante western blot (WB) las proteínas de interés.

6.5. Electroforesis y detección de proteínas. Western blot

La detección de las proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Las proteínas se analizaron en muestras de extracto o muestras inmunoprecipitadas. El volumen final de estas se mezcló con la cantidad necesaria de tampón de carga 2X ó 4X hasta quedar a la concentración 1X deseada. Una vez preparadas las muestras, se hirvieron a 100°C durante 8 minutos para resolverlas en los geles de poliacrilamida. El porcentaje del gel se eligió en función del peso molecular de la proteína a analizar, a mayor porcentaje, mayor separación de proteínas de bajo peso molecular. Los geles fueron montados en cubetas Mini-PROTEAN® 3 (Bio-Rad) o en cubetas grandes de tipo *Sturdier*. Las proteínas se separaron sometiendo los geles a un voltaje constante de 150 V en el caso de geles pequeños o 200 V para geles grandes en tampón de electroforesis (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS), hasta que el frente de colorante del tampón de carga salió del gel.

Para la inmunotransferencia, las proteínas separadas en geles se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, *polyvinylidene difluoride*) utilizando un aparato de transferencia húmeda (Trans-Blot Cell, Bio-Rad) en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina). La transferencia se realizó a un amperaje constante de 500 mA durante un tiempo fijado según el porcentaje de acrilamida del gel y su tamaño (Tabla 8), o a un voltaje constante de 20 V durante 14 horas.

Tabla 8. Tiempo de transferencia a 500 mA

Porcentaje gel	Tiempo (horas:minutos)	
	Gel pequeño	Gel grande
6%	1:10	2:20
8%	1:20	2:40
10%	1:30	3:00
12%	1:45	3:30
15%	2:05	4:10

Luego, las membranas se bloquearon en solución salina tamponada que contenía Tris y Tween-20 (TBST, *Tris-buffer saline with Tween*, 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) suplementada con 1% de albúmina de suero bovino (BSA, *bovine serum albumin*) durante al menos 1 hora. A continuación, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario (Tabla 3) diluido en TBST durante al menos 2 horas a temperatura ambiente o 16 horas a 4°C.

Después de 3 lavados de 7 minutos con TBST, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios (Tabla 4) conjugados a peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) requeridos según la especie del anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios fueron diluidos en TBST o 5% de leche desnatada en polvo en TBST e incubados durante 30 minutos. Pasado este tiempo, las membranas se lavaron con TBST tres veces, 7 minutos cada vez, y se visualizaron las bandas por quimioluminiscencia basada en la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno. Para ello se incubaron durante 1 minuto en tampón de revelado (2,20 mM luminol, 2,16 mM *p*-iodofenol, 0,1 M Tris, pH 9,35) al que previamente se le añadió 1 µl de H₂O₂ por cada 20 ml de la solución. Cuando la señal obtenida fue muy tenue, se procedió a la incubación con un líquido de revelado más potente durante 5 minutos mezclando 1:1 la solución A (10 mM luminol, 6 mM PTZ-343, 1 mM imidazol, 0,3 M Tris pH 8.9) y la solución B (50 mM acetato sódico pH 5, 8 mM de perborato sódico).

De forma alternativa, se incubaron las membranas con anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos durante media hora (Tabla 4) y, tras realizar tres lavados con TBST y un último lavado en PBS, se visualizaron las bandas con el aparato *ChemiDoc™ Touch Imaging System* de Bio-Rad.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en un balancín, y los lavados en una plataforma con agitación orbital. Las mediciones densitométricas de las bandas se realizaron con el software *ImageJ* 1.44 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos) o *Image Lab Software* 6.0.1 (Bio-Rad).

6.6. Etiquetado con biotina e internalización de EV20/MMAF

EV20/MMAF se biotiniló con *EZ-Link NHS-SS-Biotin* (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron 500 µg del ADC con un exceso 20 veces molar de una solución de NHS-

SS-biotina 10 mM en DMSO durante 40 minutos a temperatura ambiente. La NHS-SS-biotina no unida se inactivó con 50 mM de NH_4Cl .

Para llevar a cabo el experimento, las células se trataron con 10 nM de EV20/MMAF-S-S-biotina durante 1 hora a 4°C en su medio de cultivo y luego se lavaron dos veces con PBS para eliminar cualquier exceso del ADC biotinilado no unido. Finalmente, las células se dejaron en el incubador a 37°C en su medio de cultivo para permitir la internalización del ADC unido a HER3 durante los tiempos estimados. Transcurridos los tiempos de internalización, se colocaron las placas en hielo, se lavaron dos veces con PBS y el ADC biotinilado no internalizado se eliminó lavando tres veces durante 10 minutos cada lavado con tampón de escisión (75 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 0,1 mM CaCl_2 , 10% FBS, 50 mM glutatión, 80 mM NaOH. El glutatión y el NaOH se añadieron inmediatamente antes de realizar los lavados y se ajustó el pH de la solución a pH 8,6). Luego, las células se lavaron dos veces con PBS y se lisaron en tampón de lisis frío (150 mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glicerol, 40 mM HEPES pH 7,4, 1% Nonidet P-40) con inhibidores de fosfatasa y proteasas. Los extractos se cuantificaron con el kit BCA y 2 mg de cada condición fueron inmunoprecipitados con 50 μl de estreptavidina-sefarosa *High Performance* (GE Healthcare), durante al menos 2 horas a 4°C. Los inmunocomplejos se recuperaron, se lavaron y se resolvieron mediante electroforesis. Se usó el anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina G (IgG) humana acoplado a HRP para el revelado.

7. INMUNOFLUORESCENCIA

7.1. Internalización de EV20/MMAF

Para la detección de EV20/MMAF, se cultivaron entre 100.000-150.000 células en cubreobjetos de vidrio insertados en placas de 35 mm o en placas de 6 pocillos y se trataron con EV20/MMAF 10 nM durante los tiempos indicados a 37°C. El tiempo 0h se realizó incubando el cubre 30 minutos a 4°C. Luego, las células en cubreobjetos se lavaron una o dos veces con PBS/CM durante 5 minutos, se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 30 minutos y se volvieron a lavar con PBS/CM durante 5 minutos. Después, se minimizó la autofluorescencia mediante una incubación con NH_4Cl 50 mM durante 10 minutos. A continuación, las células se permeabilizaron (0,1% de tritón, 0,2% de BSA) durante 20 minutos y luego se bloquearon durante 1 hora en solución de bloqueo, que contenía 0,2% de BSA en PBS/CM. A continuación, las células se lavaron con solución de bloqueo (3 veces, 7-10 minutos cada vez) y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario

anti-IgG humana conjugado con Cy3 diluido en el mismo tampón (1:800) durante 30 minutos en oscuridad. Pasados los 30 minutos, las muestras se volvieron a lavar como se indicó anteriormente, se tiñeron los núcleos con DAPI a 1 µg/ml en agua milliQ durante 10 segundos y se montaron en portaobjetos con gelvatol (12% mowiol, 30% glicerol, 0,13 M Tris pH 8,5). Finalmente, las muestras se analizaron en el microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems CMS, Wetzlar, Alemania).

7.2. Análisis de colocalización entre EV20/MMAF y LAMP1

Las células se cultivaron y procesaron como se indicó anteriormente, incluyendo tras el bloqueo de las muestras una etapa de incubación con el anticuerpo primario contra la proteína 1 de membrana asociada a lisosoma (LAMP1, *lysosomal-associated membrane protein 1*) durante 1 hora diluido en solución de bloqueo. Se usó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con Cy2 para detectar LAMP1.

La colocalización entre EV20/MMAF y LAMP1 se analizó con el programa *Leica Application Suite Advanced Fluorescence* (LAS AF versión 2.7.3.9723) usando el sistema Leica TCS SP5. En este caso, el programa analiza la dispersión de las señales de fluorescencia de la imagen y devuelve un porcentaje medio de la tasa de colocalización entre la señal correspondiente al ADC y la señal correspondiente a LAMP1. Este valor se calcula como el cociente entre el área de señales de colocalización con respecto al área de fluorescencia total, expresado en porcentaje.

7.3. Análisis del número de células mitóticas

El análisis del número de células mitóticas se realizó mediante inmunofluorescencia. Las células se cultivaron, se trataron durante 48 horas con EV20/MMAF 10 nM y se procesaron como se ha indicado anteriormente. En este caso, tras el bloqueo de las muestras se incubaron con el anticuerpo primario β-tubulina durante 1 hora diluido en solución de bloqueo. Se usó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Cy2 para detectar el anticuerpo β-tubulina.

Luego, las muestras se observaron en un microscopio Zeiss Axiophot 2 con objetivo de inmersión en aceite 63x. En el caso del experimento EV20/MMAF, para cada condición se contaron al menos 2.000 células. De entre estas células, se diferenció como células mitóticas aquellas que tenían los cromosomas condensados

y huso mitótico formado y como células mitóticas aberrantes aquellas que tenían los cromosomas condensados pero una disposición del huso mitótico anormal.

Finalmente, se calculó el porcentaje de células mitóticas con husos mitóticos aberrantes o con husos mitóticos normales como se indica a continuación:

$$\text{Células mitóticas aberrantes (\%)} = \frac{\text{células con huso mitótico aberrante}}{\text{células mitóticas totales}} \times 100$$

7.4. Internalización de pHrodo-EV20/MMAF en células vivas

Para la evaluación de la internalización de EV20/MMAF en células vivas por microscopía y su llegada a compartimentos intracelulares ácidos, el anticuerpo se marcó con el kit *pHrodo™ iFL Red Microscale Protein Labeling* (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. pHrodo™ es un colorante fluorogénico (en este caso rojo) que no es fluorescente a pH neutro y presenta una fluorescencia roja creciente a medida que el pH se vuelve más ácido.

Para la realización de los experimentos, se plaqueron 200.000 células BT474 y BTRH y pasadas 24 horas se trataron con 10 nM de pHrodo-EV20/MMAF. Las imágenes se adquirieron cada 15 minutos durante 24 horas usando un microscopio Nikon Eclipse TE2000-E. Los videos se montaron usando el programa *ImageJ*.

8. CITOMETRÍA

Para los ensayos de ciclo celular y apoptosis, las células se cultivaron en placas de 6 pocillos y pasadas 24 horas se trataron con los fármacos deseados durante el tiempo indicado. El día del análisis, el medio de cultivo se recogió en un tubo de citometría, las células se lavaron con 1 ml de PBS que se recolectó, al igual que las células tripsinizadas, en el mismo tubo. Posteriormente las células se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos a 10°C, fueron lavadas con PBS, y se volvieron a centrifugar para proceder al protocolo específico de análisis (ciclo celular o apoptosis).

Los experimentos de citometría son representativos de un experimento que se repitió como mínimo dos veces.

8.1. Ciclo celular

El análisis del ciclo celular se llevó a cabo mediante el marcaje de las células con yoduro de propidio (PI, *propidium iodide*). Este compuesto es un agente

intercalante que se une a la doble cadena de ADN y permite cuantificar su contenido en una célula fijada y por tanto determinar el porcentaje de la población que se encuentra en cada una de las fases del ciclo celular.

Para el análisis del ciclo celular, las células procesadas como se indicó en el apartado anterior se fijaron y permeabilizaron en etanol frío al 70% como mínimo durante toda la noche a -20°C . El día de análisis, las células se centrifugaron a $300 \times g$ durante 10 minutos a 10°C y se resuspendieron en $500 \mu\text{l}$ de PBS que contenía $500 \mu\text{g/ml}$ de ARNasa libre de ADNasa (Sigma-Aldrich) durante 2 horas a 37°C . Después, se añadió PI ($5\text{-}15 \mu\text{g/ml}$, dependiendo de la densidad celular), se incubó durante 15 minutos en oscuridad y se analizó el contenido de ADN en un citómetro de flujo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) pasando un total de 50.000 eventos por muestra a una velocidad de 600-800 eventos por segundo. El análisis de dato se realizó con el propio programa del citómetro (BD Accuri™ C6 Software, BD Biosciences).

8.2. Apoptosis

La muerte celular programada se analizó mediante citometría de flujo marcando las células con PI y con anexina V conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC, *fluorescein isothiocyanate*). Durante la apoptosis se da la pérdida de la asimetría en la distribución de los fosfolípidos de la membrana entre otros procesos celulares. La Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos que se une con gran afinidad a los residuos de fosfatidilserina (PS, *phosphatidylserine*) de la membrana celular. En la fase inicial de la apoptosis los residuos de PS quedan irreversiblemente expuestos en la cara externa de la membrana permitiendo la unión de la anexina V (acoplada en este protocolo a FITC) y por tanto marcará las células que estén en apoptosis temprana (Anexina⁺, PI⁻). Cuando la célula se encuentra en una fase más avanzada de apoptosis, la membrana celular se permeabiliza, y el PI es capaz de intercalarse en el ADN. Este marcaje adicional nos permite diferenciar entre las células en apoptosis tardía (Anexina⁺, PI⁺) y las células necróticas (Anexina⁻, PI⁺) de las células vivas (Anexina⁻, PI⁻).

Para los ensayos de apoptosis, se siguió el protocolo del *FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit 1* (BD Biosciences). Las células procesadas como se indicó anteriormente se resuspendieron en $100 \mu\text{l}$ de tampón de unión frío ($10 \text{ mM HEPES pH } 7,4$, 140 mM NaCl , $2,5 \text{ mM CaCl}_2$) al que se añadieron $5 \mu\text{l}$ de anexina V-FITC y $5 \mu\text{l}$ de una solución a $50 \mu\text{g/ml}$ de PI y se incubaron en oscuridad durante 15

minutos a temperatura ambiente. Se incluyeron controles de células sin marcar y células marcadas solo con PI o anexina V-FITC, con el fin de realizar compensaciones entre canales. Después de este tiempo, se añadieron 400 µl del mismo tampón a cada tubo de citómetro y 50.000 eventos fueron adquiridos en un citómetro de flujo BD Accuri™ C6 a una velocidad de 600-800 eventos por segundo. Los datos se analizaron mediante el programa C6.

8.3. Marcaje de superficie celular

Los niveles de HER3 en la superficie celular de las diferentes líneas celulares se determinaron mediante citometría de flujo siguiendo el protocolo de marcaje de superficie celular. Para ello, las células en monocapa en placas de 100 mm se lavaron con PBS y se recogieron en medio completo tras ser tripsinizadas con 0,05% tripsina-EDTA para evitar dañar la superficie de las células. A continuación, se centrifugaron a 300 x g durante 3 minutos y se lavaron con PBS suplementado con un 1% FBS (PBS/FBS). El precipitado se resuspendió en 3 ml de PBS/FBS y se repartió en 3 tubos de 1,5 ml: (1) sin marcar, (2) solo el anticuerpo secundario y (3) EV20/MMAF 10 nM. Los tubos se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en un balancín. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS/FBS. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario a los tubos correspondientes (anti-IgG humana conjugada a Cy3, 1:80) y se realizó una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en balancín y en condiciones de oscuridad. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS/FBS y las células se resuspendieron en PBS para ser adquiridas con un citómetro de flujo BD Accuri™ C6 (50.000 eventos a 600-800 eventos/segundo) y analizadas con el programa C6.

9. ESTUDIOS IN VITRO

9.1. Medición de la actividad de caspasa 3

Para medir la actividad de la caspasa 3 se utilizó su sustrato peptídico fluorogénico Ac-DEVD-AFC (BD Biosciences). Las células se trataron durante el tiempo deseado con EV20/MMAF 10 nM, se lisaron en tampón de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasa y la proteína se cuantificó con el kit BCA como se indica en el apartado 8.1. A continuación, se preparó por triplicado una solución de reacción que contenía 50 µg de lisado celular llevado hasta un volumen final de 100 µl con el tampón de reacción de caspasa 1X (25 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% CHAPS, 10% sacarosa). Posteriormente, se añadió 100 µl

del tampón de reacción de caspasa 2X (50 mM HEPES pH 7,4, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,2% CHAPS, 20% sacarosa) suplementado con 20 mM DTT y 10 μ M del sustrato fluorescente Ac-DEVD-AFC. En una placa de 96 pocillos blanca con fondo plano, se añadieron 200 μ l de la solución de reacción en cada pocillo. Además, se incluyó un control negativo por triplicado sin extracto proteico, que contenía 200 μ l de tampón de caspasa 1X. La placa se incubó a 37°C durante 1 hora en oscuridad. La señal de fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 400 nm y de emisión de 505 nm en un lector de placa *Synergy™ 4* (BioTek Instruments, Winooski, Estados Unidos) equipado con el programa *Gene5 Data Analysis Software* (BioTek Instruments).

10. ESTUDIOS EN MODELOS ANIMALES

10.1. Cepas de ratón y mantenimiento de los animales

Para los estudios in vivo se adquirieron ratones BALB/c nu/nu hembras de siete semanas de edad y peso en torno a 20 gramos (Charles River Laboratories). Los animales se mantuvieron y manipularon en las instalaciones del Animalario Departamental de la Universidad de Salamanca siguiendo las pautas legales e institucionales de acuerdo con la legislación europea (Directiva 2010/63/UE) y española (Ley 6/2013) relativa a la protección y cuidado de los animales, tras la aprobación del comité ético.

10.2. Producción de xenoinjertos

Un total de 5 millones de células de las diferentes líneas celulares (BTRH, BTRH#10, BT-TDM1R#6 y HCC1954) resuspendidas en 50 μ l de DMEM y 50 μ l de matrigel (Corning) se inyectaron a nivel subcutáneo en la línea mamaria de cada ratón (en ambos lados, izquierdo y derecho) cuando tenían 8-9 semanas de edad. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 500 mm³, los animales fueron asignados aleatoriamente a cuatro grupos (entre 4 y 5 ratones por grupo, tamaño muestral (n) especificado en cada leyenda de figura) con volúmenes tumorales medios similares, que fueron tratados intraperitonealmente con vehículo solo (PBS), EV20 (10 mg/kg), T-DM1 (15 mg/kg), trastuzumab (30 mg/kg) o EV20/MMAF (3,3 mg/kg o 10 mg/kg). Los diámetros tumorales se midieron con un pie de rey y los volúmenes tumorales se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$Volumen = \frac{\text{ancho}^2 \times \text{largo del tumor}}{2}$$

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En los experimentos de proliferación, cada condición se analizó por triplicado y los datos se presentaron como media + SD de un experimento representativo. En los estudios in vivo, los datos se presentaron como la media + error estándar de la media (SEM, *standard error of the mean*). Salvo en los datos referentes a muestras de pacientes y modelos in vivo, todos los experimentos se llevaron a cabo al menos dos veces.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software SPSS 25 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos). Se utilizaron análisis de correlación de Pearson y análisis de regresión para los estudios de correlación entre IC₅₀ y los niveles de expresión de HER3 y pHER3. Se usó ANOVA bifactorial con corrección de Bonferroni cuando estaba presente más de un factor entre las comparaciones estadísticas. Se utilizó ANOVA de una vía para comparar la media de más dos grupos. La prueba post-hoc de Bonferroni o la prueba post-hoc de Games-Howell se usaron en caso de homogeneidad o heterogeneidad de varianza, respectivamente. La normalidad de las distribuciones de los datos se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

**EV20/MMAF, UN ANTICUERPO
CONJUGADO A FÁRMACO, EN
RESISTENCIA A TERAPIAS ANTI-HER2**

1. DETERMINACIÓN DE HER3 COMO POSIBLE DIANA EN CÁNCER DE MAMA HER2⁺

1.1. Estado de los receptores ErbB/HER en líneas de cáncer de mama HER2⁺ resistentes a trastuzumab

La resistencia intrínseca y adquirida a terapias anti-HER2 son un problema actual de la clínica. Por tanto, uno de los mayores retos que en la actualidad tiene la investigación en cáncer de mama HER2⁺ es diseñar estrategias terapéuticas para atacar dichas resistencias. Por ello, el principal objetivo de este capítulo de la Tesis Doctoral fue identificar una nueva diana terapéutica para este tipo de cáncer. Como trastuzumab es el tratamiento estándar en cáncer de mama HER2⁺, el trabajo inicial se centró en resistencias generadas a este anticuerpo.

Estudios previos realizados en el laboratorio con *arrays* de proteína mostraron activación de EGFR, HER2 y HER3 en la línea BT474 y la línea BTRH resistente a trastuzumab derivada de la misma (Ríos-Luci *et al.*, 2020) (Figura 8).

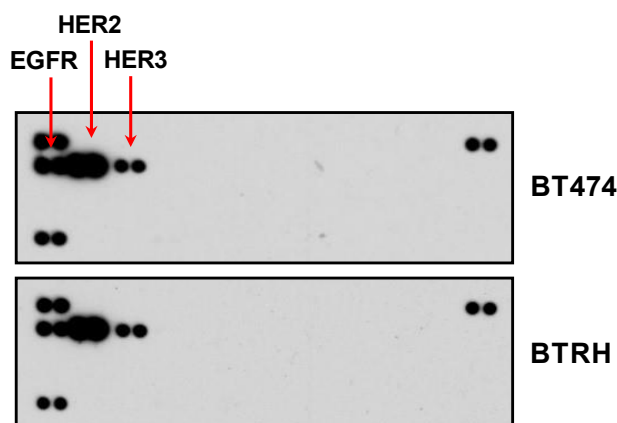


Figura 8. Evaluación de los niveles basales de activación de diferentes receptores TK mediante el *array* de fosfo-RTK en células BT474 y BTRH.

Tras estos resultados, se decidió estudiar los niveles de los receptores de la familia ErbB/HER en líneas sensibles y resistentes a trastuzumab (Figura 9). En la figura 9A se presentan los diferentes modelos celulares utilizados en este trabajo: dos líneas sensibles a trastuzumab (BT474 y SKBR3), una línea con resistencia secundaria a trastuzumab generada en el laboratorio (BTRH) y cuatro líneas con resistencia primaria a trastuzumab (MDA-MB-361, HCC1419, HCC1569 y HCC1954). EGFR está expresado en algunas de ellas, HER4 principalmente en la línea BTRH, sin embargo, HER3 es el receptor más ampliamente expresado junto con HER2 (Figura 9B).

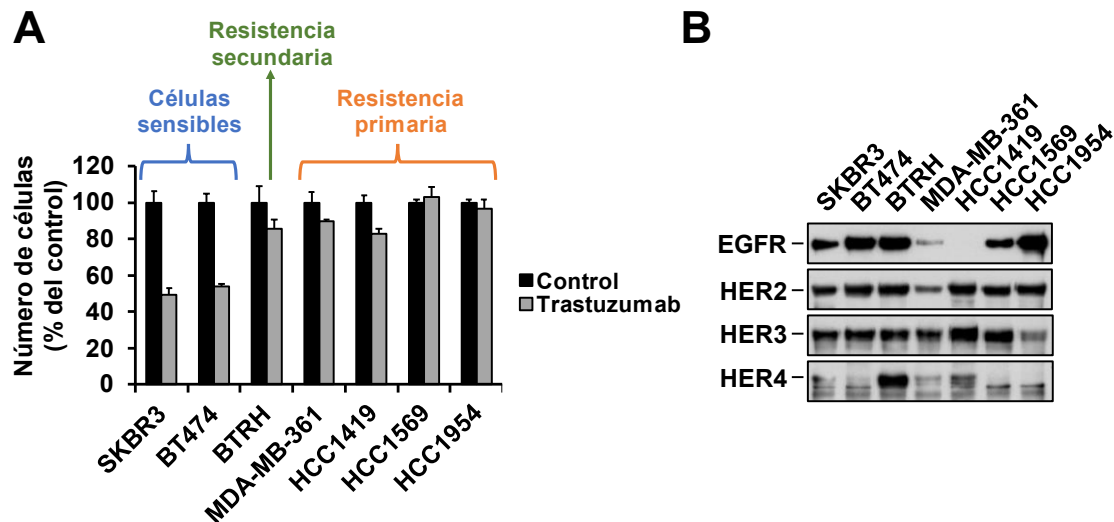


Figura 9. Modelos de resistencia a trastuzumab y sus niveles de receptores ErbB/HER. (A) Efecto de trastuzumab (50 nM, 5 días) en las líneas celulares SKBR3, BT474, BTRH, MDA-MB-361, HCC1419, HCC1569 y HCC1954. Los resultados se representan como el porcentaje de la media de los triplicados + SD, relativo a la condición control (sin fármaco). Se muestra un experimento representativo que se repitió dos veces. **(B)** Niveles de EGFR, HER2, HER3 y HER4 analizados por inmunoprecipitación y western blot en líneas celulares de cáncer de mama HER2⁺.

1.2. Niveles de HER3 en tumores de pacientes con cáncer de mama HER2⁺

A continuación, se decidió analizar la presencia de HER3 en muestras de tumores de pacientes con cáncer de mama HER2⁺. Como puede observarse en la figura 10, la mayoría de los pacientes tienen presencia de HER3 e incluso un 50% de los casos (8/16 pacientes) tienen altos niveles de este receptor.

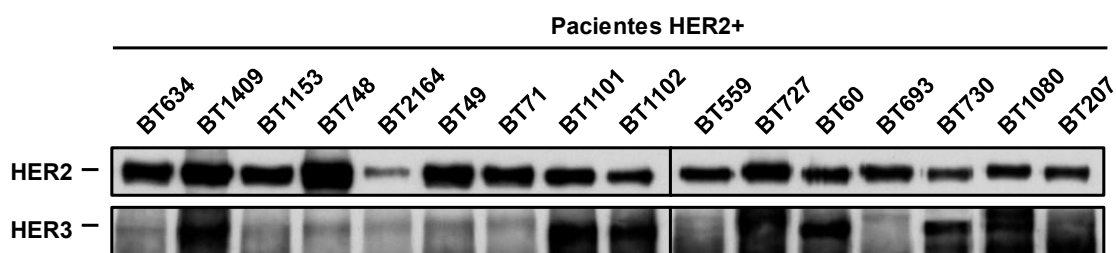


Figura 10. Expresión de HER2 y HER3 en muestras tumorales de cáncer de mama HER2⁺. Para analizar los niveles de HER2 y HER3, primero se inmunoprecipitó 1 mg de proteína con un anticuerpo anti-HER3, se recogió el sobrenadante y se inmunoprecipitó HER2.

2. EV20/MMAF, UN ANTICUERPO CONJUGADO A FÁRMACO ANTI-HER3

Después de los resultados obtenidos, se determinó que HER3 podría ser una posible diana para el tratamiento del cáncer de mama HER2⁺. MediaPharma S.r.l es una empresa biotecnológica italiana centrada en la investigación y en el desarrollo de anticuerpos monoclonales humanizados, ADCs y proteínas terapéuticas para el

tratamiento del cáncer y otras enfermedades graves. MediaPharma S.r.l facilitó el ADC dirigido a HER3, EV20/MMAF, utilizado en este proyecto (Figura 11).

EV20/MMAF está compuesto por EV20, un mAb anti-HER3 humanizado, acoplado al agente citotóxico MMAF. EV20/MMAF tiene un DAR de 4,7 a 5 moléculas de MMAF por anticuerpo (Capone *et al.*, 2018). Teóricamente, tras su internalización, el ADC es procesado en los lisosomas liberando MMAF para su exportación al citoplasma por transportadores lisosomales. En el citoplasma, MMAF se une a la tubulina inhibiendo su polimerización y, por tanto, la generación del huso mitótico. Este fenómeno conduce a parada en el ciclo celular y catástrofe mitótica. Todos estos pasos serán confirmados y estudiados a lo largo de este capítulo.

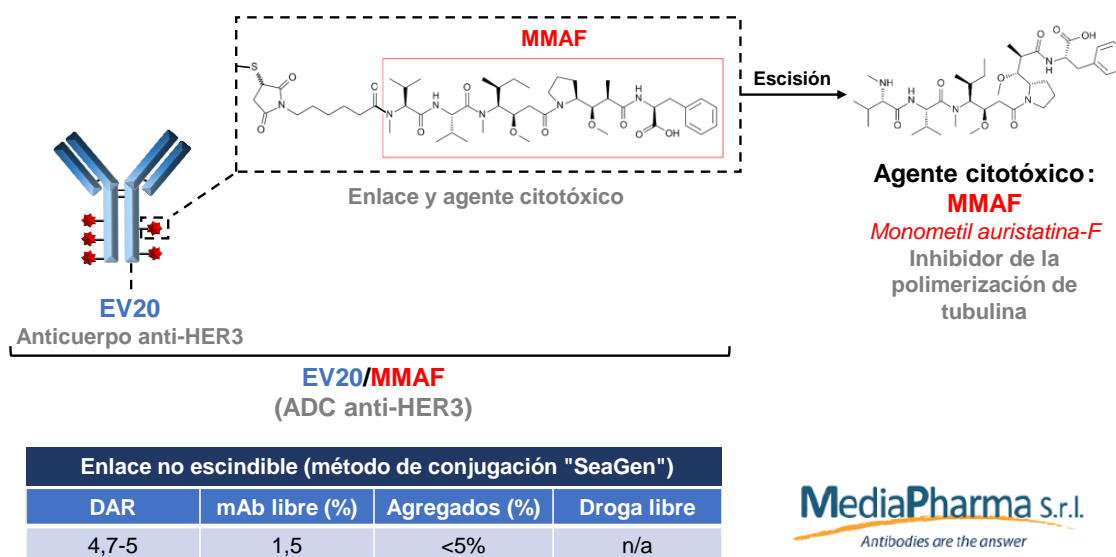


Figura 11. Esquema representativo de EV20/MMAF. Representación esquemática de los componentes de EV20/MMAF y tabla con la información relativa al ADC. DAR: relación fármaco-anticuerpo.

3. ACCIÓN DE EV20/MMAF EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HER2+ CON SENSIBILIDAD, RESISTENCIA PRIMARIA Y SECUNDARIA A TRASTUZUMAB

3.1. Efecto de EV20/MMAF y sus componentes en las líneas BT474 y BTRH

A continuación, se analizó la sensibilidad de las líneas BT474 y BTRH a los componentes utilizados para generar EV20/MMAF, es decir, al anticuerpo anti-HER3 EV20 y al agente citotóxico MMAF. El anticuerpo desnudo EV20 no afectó a la proliferación celular de las líneas celulares BT474 y BTRH (Figura 12A). En el caso de MMAF libre, el fármaco inhibió la proliferación de ambas líneas celulares

(Figura 12B). Sin embargo, la potencia de MMAF fue alrededor de tres órdenes de magnitud inferior a la de EV20/MMAF.

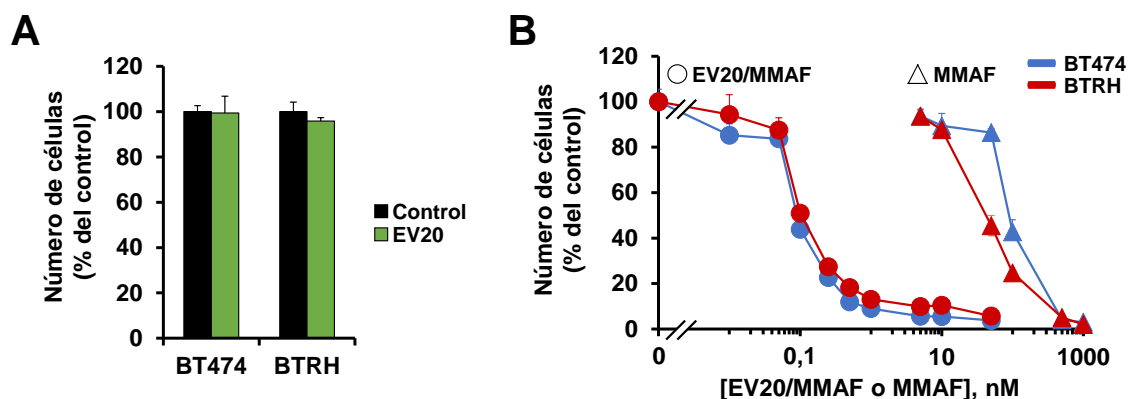


Figura 12. Efecto de EV20, MMAF libre y EV20/MMAF en BT474 y BTRH. (A) Acción del anticuerpo EV20 desnudo (10 nM, 5 días) sobre BT474 y BTRH. **(B)** Comparación del efecto de EV20/MMAF y MMAF sobre la proliferación de las células BT474 y BTRH después de 5 días de tratamiento con los fármacos. Los resultados se representan como el porcentaje de la media de los triplicados + SD, relativo a la condición control no tratada. Se muestra un experimento representativo, que se repitió dos veces.

3.1.1. Niveles de HER3 en superficie en las líneas BT474 y BTRH

Como la diana de EV20/MMAF es HER3, se procedió a analizar los niveles de HER3 en superficie en las líneas BT474 y BTRH. En la figura 13 se muestra como ambas líneas celulares presentan niveles similares de HER3 en superficie.

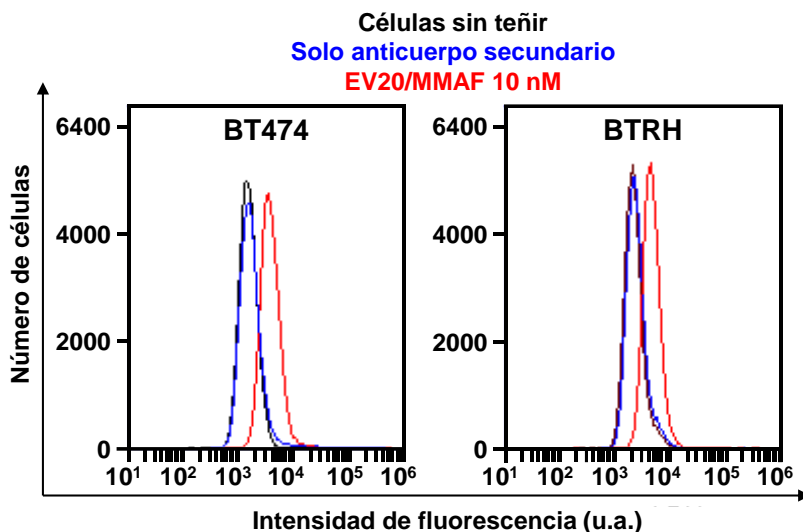


Figura 13. Niveles de HER3 en superficie en BT474 y BTRH. El nivel de HER3 se analizó cuantitativamente en células BT474 y BTRH mediante citometría de flujo usando EV20/MMAF como anticuerpo primario y un anticuerpo secundario anti-IgG humana acoplado a Cy3. Se muestra un experimento representativo que se repitió dos veces.

3.2. Efecto de EV20/MMAF en un clon con resistencia secundaria a trastuzumab

Como la línea celular BTRH es un modelo representativo de un conjunto de células (“pool”), se decidió analizar el efecto de EV20 y EV20/MMAF en un clon representativo resistente a trastuzumab generado en el laboratorio (BTRH#10). Primero se comprobó dicha resistencia a trastuzumab. En la figura 14A se observa que las células BT474 son sensibles a trastuzumab pero que dicho anticuerpo tiene poco efecto en las líneas BTRH y BTRH#10. A continuación se comprobó que los niveles de HER2 y HER3 totales y en superficie son similares en todas las líneas celulares (Figura 14B y 14C). Además, la activación de ambos receptores está presente en todas ellas (Figura 14B).

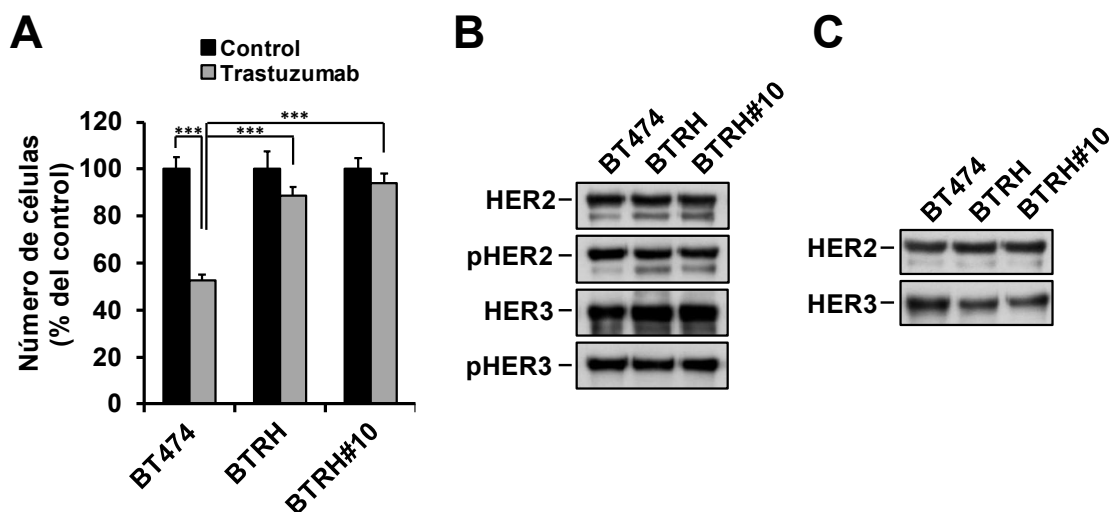


Figura 14. Análisis de los modelos de resistencia secundaria a trastuzumab BTRH y BTRH#10. (A) Efecto de trastuzumab (50 nM, 5 días). Los resultados se representan como el porcentaje de la media + SD, relativo a la condición control (sin fármaco); n=3. Se muestra un experimento representativo que se repitió tres veces. *** $p < 0,001$. Los p -valores exactos de todas las comparaciones y la prueba estadística utilizada se indican en el anexo 1. **(B)** Análisis de la expresión de HER2, pHER2, HER3 y pHER3 por inmunoprecipitación en células BT474, BTRH y BTRH#10. **(C)** Niveles en la superficie celular de HER2 y HER3 en células BT474, BTRH y BTRH#10 analizados por inmunoprecipitación de superficie.

A continuación, se evaluó el efecto de EV20/MMAF sobre las células BT474, BTRH y BTRH#10, que presentan niveles similares de HER3 total y fosforilado y de superficie celular. EV20/MMAF demostró ser equipotente en las tres líneas celulares analizadas (Figura 15A). Además, se volvió a comprobar que EV20 desnudo no tiene efecto sobre la proliferación celular (Figura 15B).

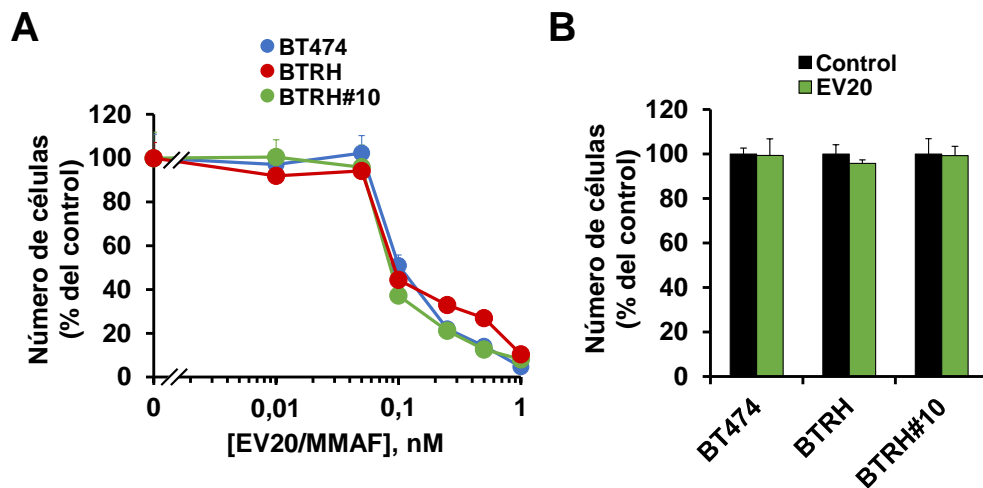


Figura 15. Efecto de EV20/MMAF y EV20 en BT474, BTRH y BTRH#10. (A) Respuesta de BT474, BTRH y BTRH#10 a EV20/MMAF. Pasados 5 días, se contaron las células tratadas con las dosis indicadas de EV20/MMAF. (B) Acción del anticuerpo EV20 desnudo (10 nM, 5 días) sobre células BT474, BTRH y BTRH#10. Los datos representan el porcentaje de la media + SD de los triplicados de un experimento que se repitió al menos dos veces y se normalizó a los controles no tratados.

3.3. Efecto de EV20/MMAF en un modelo PDX con resistencia secundaria a trastuzumab

A continuación, se completaron los estudios anteriores utilizando otro modelo de resistencia secundaria a trastuzumab procedente de un xenoinjerto derivado de paciente (PDX, *patient-derived xenograft*) inicialmente sensible a trastuzumab. Con ese fin, en el laboratorio del Dr. Joaquín Arribas se diseccionó un tumor desarrollado en un ratón procedente de una paciente con cáncer de mama HER2⁺ (PDX118) y las células se disgregaron y se mantuvieron en cultivo. Estos cultivos se propagaron en ausencia o presencia de trastuzumab. Finalmente, se aislaron dos clones que crecían en presencia de trastuzumab (llamados TR1 y TR2, Figura 16A).

Primero se evaluó la respuesta a trastuzumab de todas las líneas celulares. Como se muestra en la figura 16B, las células PDX118 parentales eran muy sensibles al trastuzumab. Por el contrario, los clones TR1 y TR2 presentaron una resistencia sustancial a la acción del anticuerpo. Los clones TR1 y TR2 expresaron niveles similares de HER2 a los de las células parentales PDX118 (Figura 16C), excluyendo los cambios en HER2 como la causa de su resistencia a trastuzumab. Los análisis adicionales indicaron que todas las líneas celulares expresaban niveles similares de HER2 y HER3 total y en superficie celular, independientemente de su sensibilidad al trastuzumab (Figura 16C y 16D). Además, sus niveles de HER3 eran similares a los de las células BT474 y BTRH. Sin embargo, los niveles de pHER3 fueron más altos en las células PDX118 en comparación con TR1 y TR2.

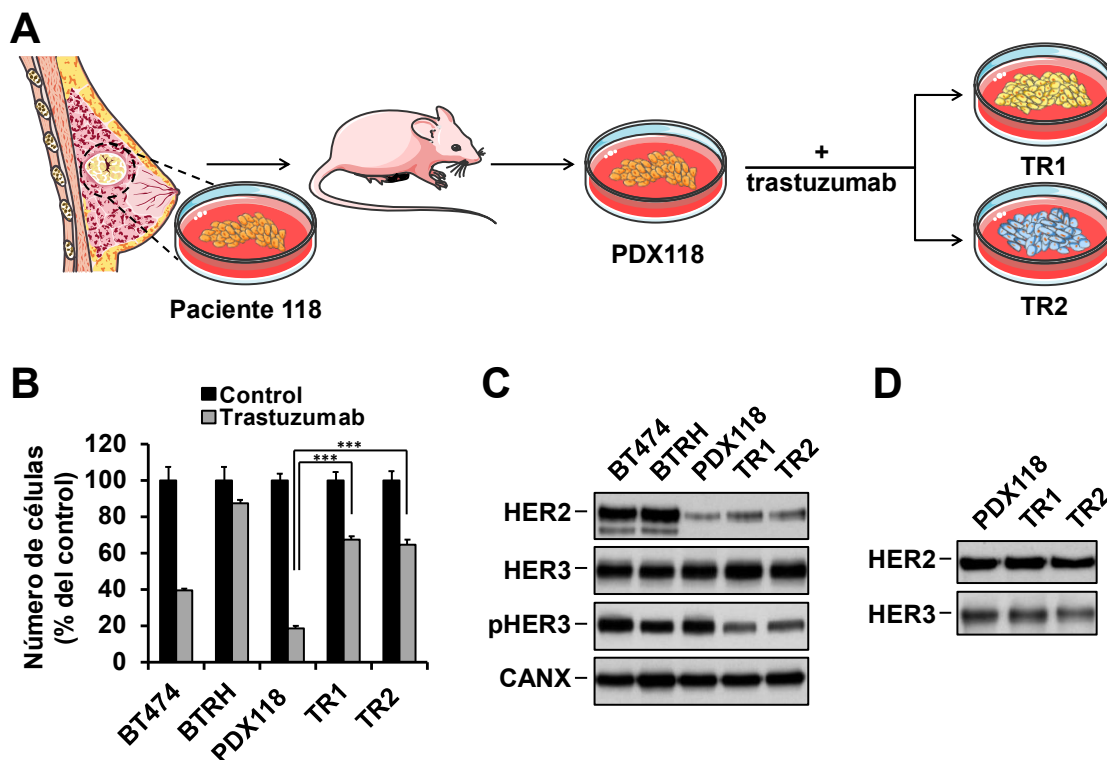


Figura 16. Caracterización del modelo PDX resistente a trastuzumab. (A) Representación esquemática de la generación de las líneas celulares resistentes a trastuzumab TR1 y TR2. Las células parentales se obtuvieron de un xenoinjerto (PDX118) derivado de una paciente con cáncer de mama HER2⁺ y que posteriormente se cultivaron en presencia o ausencia de trastuzumab. (B) Respuesta a trastuzumab (50 nM, 5 días) de BT474, BTRH, PDX118 y sus derivados TR1 y TR2 resistentes a trastuzumab. *** $p < 0,001$. Los p -valores exactos de todas las comparaciones y la prueba estadística utilizada se indican en el anexo 2. (C) Niveles de HER2, HER3 y pHER3 en BT474, BTRH, PDX118, TR1 y TR2. Se usó la calnexina (CANX) como control de carga. (D) Niveles de superficie celular de HER2 y HER3 en células PDX118, TR1 y TR2 analizados por inmunoprecipitación de superficie.

A continuación, se analizó el efecto de EV20/MMAF en el modelo PDX. EV20/MMAF ejerció un fuerte efecto antiproliferativo, siendo equipotente, en PDX118, TR1 y TR2, así como en células BT474 y BTRH (Figura 17).

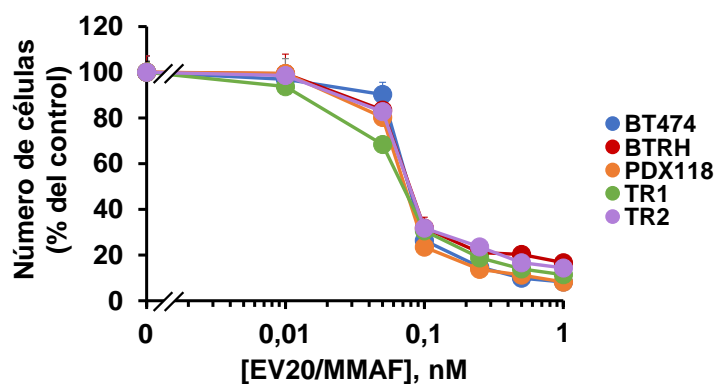


Figura 17. Acción de EV20/MMAF en un modelo PDX resistente a trastuzumab. Efecto de EV20/MMAF en BT474, BTRH, PDX118, TR1 y TR2. Las células se contaron después de 5 días de tratamiento con las dosis indicadas de EV20/MMAF. Los datos representan el porcentaje de la media + SD de los triplicados de un experimento que se repitió dos veces y se normalizó a los controles no tratados.

3.4. Efecto de EV20 y EV20/MMAF en un panel de células de cáncer de mama HER2⁺

Después de analizar la eficacia de EV20/MMAF en modelos de resistencia secundaria, se decidió ampliar el estudio de su actividad en un panel de células HER2⁺ (Figura 18A). Los análisis de dosis-respuesta mostraron que todas las líneas celulares respondían a EV20/MMAF (Figura 18A), pero no al anticuerpo EV20 desnudo (Figura 18B). En la figura 18C se corroboró que todas las líneas presentan niveles elevados de HER2, HER3 y pHER3.

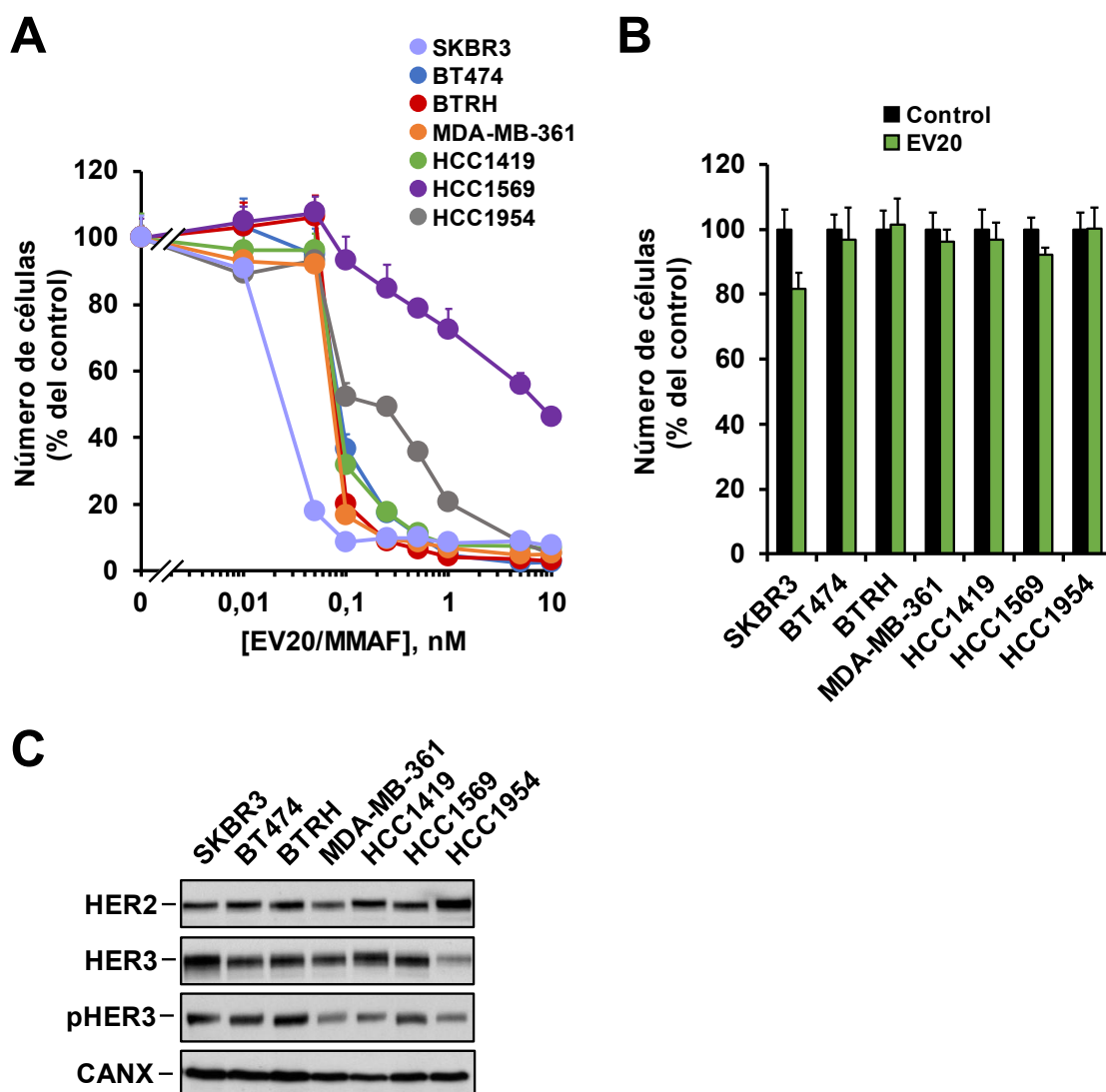


Figura 18. Acción de EV20/MMAF sobre varios modelos de resistencia primaria y secundaria a trastuzumab. (A) Efecto de EV20/MMAF en líneas de cáncer de mama HER2⁺. Las células se contaron después de 5 días de tratamiento con las dosis indicadas de EV20/MMAF. **(B)** Acción del anticuerpo desnudo EV20 (10 nM, 5 días) en las células utilizadas en (A). Los datos representan la media + SD de los triplicados de un experimento que se repitió dos veces y se normalizó a los controles no tratados. **(C)** Análisis de HER2, HER3 y pHER3 de líneas celulares HER2⁺

A pesar de que el anticuerpo desnudo EV20 no afectó a la proliferación de las líneas celulares HER2⁺, redujo los niveles de HER3 y pHER3 en varias de las líneas tratadas (Figura 19).

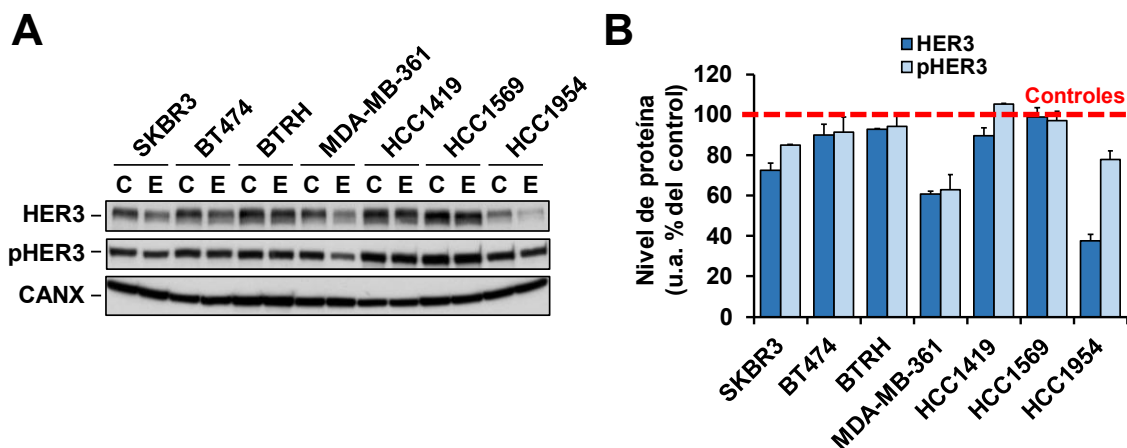


Figura 19. Acción de EV20 en líneas de cáncer de mama HER2⁺. (A) Las líneas celulares se mantuvieron en su medio de cultivo sin (C) o con EV20 (E, 10 nM) durante 5 días y se lisaron. HER3 y pHER3 fueron analizados por western blot. (B) Análisis cuantitativo del efecto de EV20 sobre los niveles de HER3 y pHER3 en cada línea celular, utilizando los datos presentados en (A) y los obtenidos en otro experimento. Los valores de intensidad de las muestras sin tratar se tomaron como 100% (línea discontinua roja). u.a.: unidades arbitrarias.

4. EFECTO DE LA NRG EN LA ACTIVIDAD DE EV20/MMAF

Dado que se ha demostrado que la presencia de NRG, ligando de HER3 y HER4, perjudica la acción de otros ADC como T-DM1, se analizó el efecto de NRG en la respuesta a EV20/MMAF. Como se muestra en la figura 20, la presencia de NRG afectó ligeramente a la acción antiproliferativa de EV20/MMAF, aunque se conservó la mayor parte de la actividad del ADC.

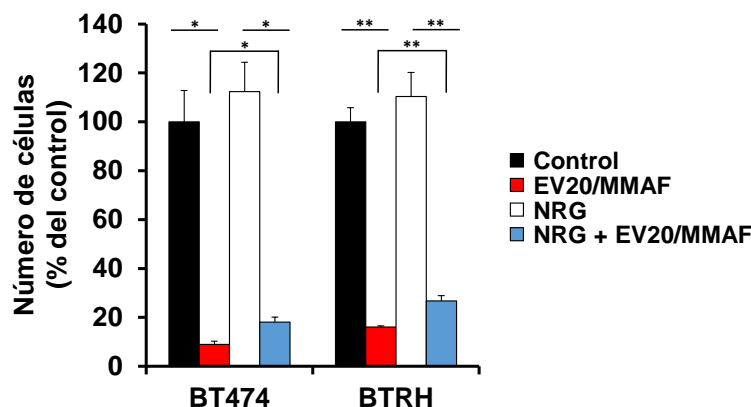


Figura 20. Efecto de la NRG sobre la acción de EV20/MMAF. Las líneas celulares BT474 y BTRH se trataron con EV20/MMAF (1 nM) y/o neuregulina (10 nM) durante 5 días y se analizó la proliferación mediante recuento celular. Los datos representan la media + SD de los triplicados (normalizados a los controles no tratados) de un experimento representativo de tres. ** $p < 0,01$. * $p < 0,05$. Los p -valores exactos de todas las comparaciones y la prueba estadística utilizada se indican en el anexo 3.

5. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE HER3 O pHER3 Y LA ACCIÓN DE EV20/MMAF

5.1. Análisis de correlación entre el nivel de HER3 y la IC₅₀ de EV20/MMAF en líneas de cáncer de mama HER2⁺

A continuación, se decidió evaluar si existía correlación entre la expresión de HER3 y la acción de EV20/MMAF definida por su IC₅₀. La IC₅₀ de EV20/MMAF para cada línea celular se determinó con los análisis de dosis/respuesta a este ADC representados en la figura 18A. Además, se evaluaron los niveles de HER3 en las mismas líneas de cáncer de mama HER2⁺ (Figura 21A). Los estudios de regresión lineal mostraron correlación entre los niveles de HER3 y la respuesta a EV20/MMAF representada por la IC₅₀ ($R^2=0,677$, p -valor=0,044, Figura 21B), lo que sugiere que la cantidad del receptor es un factor que dicta la sensibilidad al ADC.

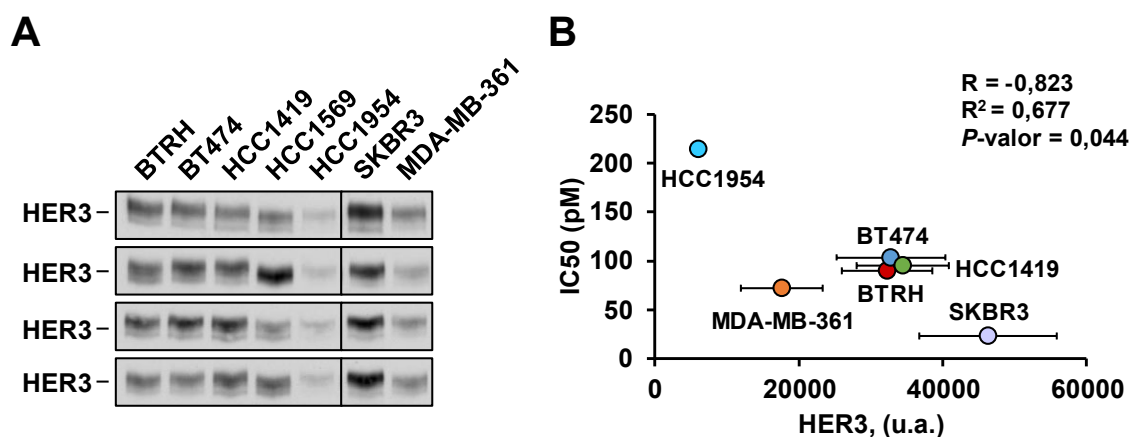


Figura 21. Análisis de correlación entre HER3 y sensibilidad a EV20/MMAF. (A) Niveles de HER3 en las líneas celulares BTRH, BT474, HCC1419, HCC1569, HCC1954, SKBR3 y MD-MB-361. Se cargaron 25 μ g de proteína de las líneas celulares indicadas en los gels y se analizó HER3 por western blot. (B) Análisis de correlación entre la IC₅₀ de EV20/MMAF y los niveles de HER3 en las líneas celulares HER2⁺. Se cuantificaron las bandas correspondientes a HER3 mostradas en (A), con tiempos de exposición y señales similares. Los datos se representan como la media de las medidas \pm SD y la IC₅₀ de EV20/MMAF. Los datos de correlación de Pearson se muestran en la zona superior derecha. u.a.: unidades arbitrarias.

5.2. Análisis de correlación entre el nivel de pHER3 y la IC₅₀ de EV20/MMAF en líneas de cáncer de mama HER2⁺

Se realizó el mismo análisis de regresión, pero analizando los niveles de activación del receptor representados por pHER3 y la IC₅₀ de EV20/MMAF de cada línea celular. Sin embargo, no se encontró correlación entre los niveles de pHER3 y la eficacia de EV20/MMAF ($R^2=0,135$, p -valor =0,474, Figura 22).

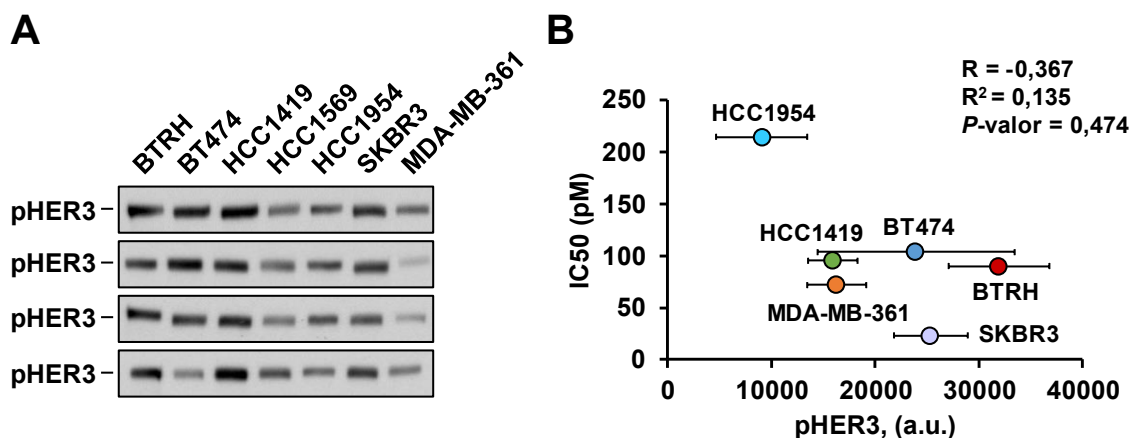


Figura 22. Análisis de correlación entre pHER3 y sensibilidad a EV20/MMAF. (A) Los niveles de pHER3 se evaluaron mediante western blot de lisados celulares (60 μ g) utilizando un anticuerpo pHER3 específico. (B) Análisis de correlación entre los niveles de pHER3 e IC₅₀ de las líneas celulares HER2⁺, realizado como en la figura 21. Los datos se representan como la IC₅₀ de EV20/MMAF y la media \pm SD de la cuantificación de los cuatro western blots (la primera imagen se usa también en la figura 18C). Los datos de correlación de Pearson se muestran en la zona superior derecha. u.a.: unidades arbitrarias.

5.3. Efecto de EV20/MMAF en células con bajo nivel de expresión de HER3

Así mismo se analizó la potencia y la especificidad de EV20/MMAF en células con niveles muy bajos de expresión de HER3. El ADC tuvo un efecto prácticamente nulo en la línea celular estromal humana HS-5, una línea no tumoral que expresa niveles muy bajos de HER3 y pHER3. De manera similar, el ADC no afectó la proliferación de MDA-MB-231 y BT549, dos líneas celulares de TNBC con niveles de HER3 y pHER3 muy bajos (Figura 23).

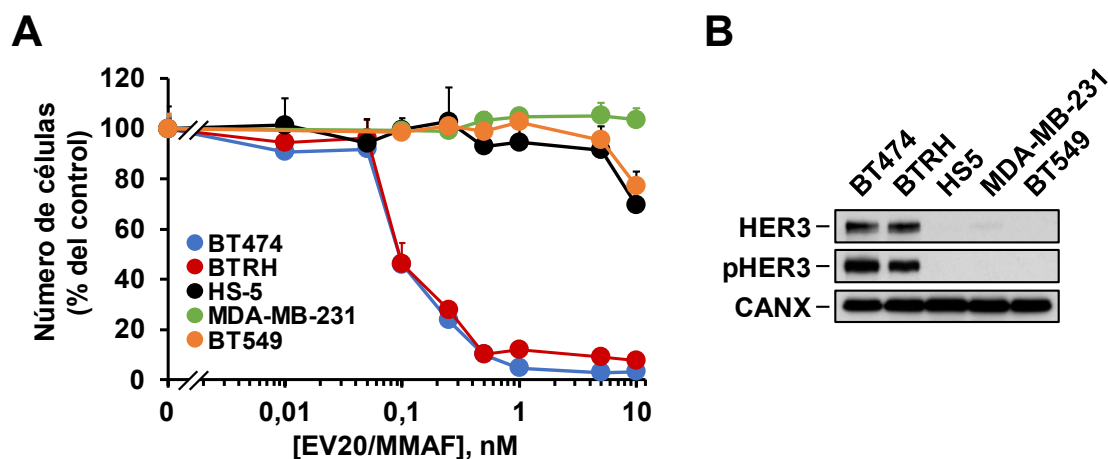


Figura 23. Análisis de la acción de EV20/MMAF en líneas con poca expresión de HER3. (A) Efecto de EV20/MMAF durante 5 días en la proliferación de líneas celulares que expresan diferentes niveles de HER3 (BT474, BTRH, HS-5, MDA-MB-231 y BT549). Los datos representan la media + SD de los triplicados (normalizados a los controles no tratados) de un experimento que se repitió al menos dos veces. (B) Niveles de HER3 y pHER3 de las líneas celulares que se muestran en (A).

5.4. Análisis del silenciamiento de HER3 y su efecto sobre la acción de EV20/MMAF en BT474

Para explorar más en profundidad la relación entre la acción de EV20/MMAF y los niveles de expresión de HER3, se llevaron a cabo experimentos de silenciamiento de HER3 en la línea celular BT474. Para estos experimentos, se seleccionaron dos secuencias que interferían con la expresión de HER3, que también disminuían los niveles de pHER3 y pAKT (Figura 24A). El silenciamiento de HER3 causado por ambas secuencias tuvo un efecto inhibitor sobre la acción antiproliferativa de EV20/MMAF (Figura 24B).

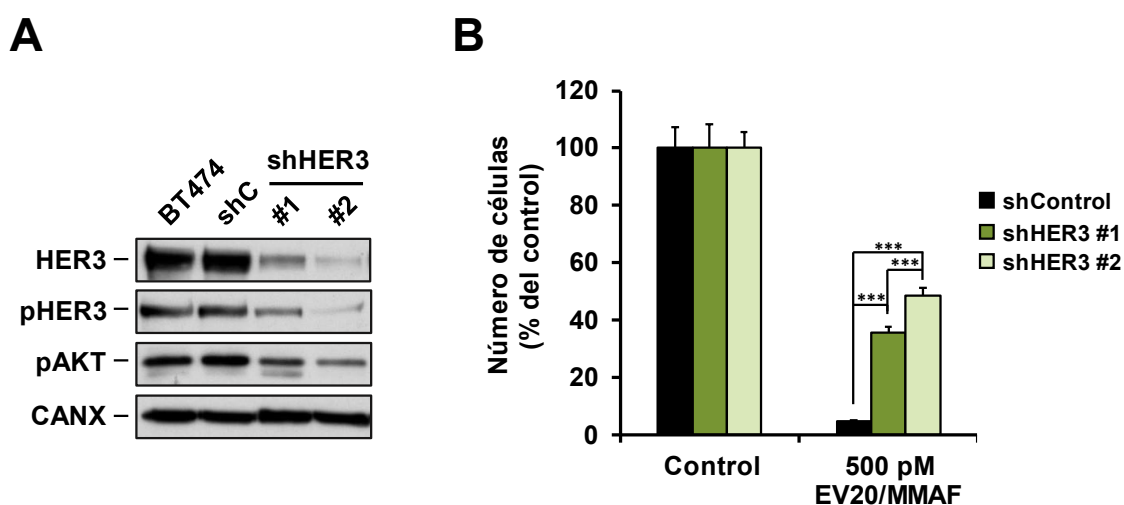


Figura 24. Análisis del efecto del silenciamiento de HER3 sobre la acción de EV20/MMAF en BT474. (A) Silenciamiento de HER3 en las células BT474. Se utilizaron una secuencia de shRNA dirigida contra ningún gen humano (shC, shControl) y dos secuencias dirigidas a HER3 (shHER3 #1 y shHER3 #2) en células BT474 y se analizaron los niveles de HER3, pHER3 y pAKT por western blot. (B) Efecto del silenciamiento de HER3 sobre la acción de EV20/MMAF analizado por recuento celular después de 5 días de tratamiento con el ADC. *** $p < 0,001$. Los p -valores exactos y la prueba estadística utilizada se indican en el anexo 4. Los datos representan la media + SD de los triplicados de un experimento que se repitió al menos dos veces y se normalizó a los controles no tratados.

6. ESTUDIO DE LA INTERNALIZACIÓN DE EV20/MMAF EN LAS LÍNEAS CELULARES BT474 Y BTRH

A continuación, se decidió analizar si la internalización de EV20/MMAF era similar en las líneas celulares BT474 y BTRH. Para ello se llevaron a cabo estudios de inmunofluorescencia. Los experimentos de inmunofluorescencia mostraron que EV20/MMAF estaba presente en la superficie celular en los primeros tiempos de incubación y que la tinción evolucionó a un patrón de puntos con el tiempo (Figura 25). Estos puntos ya se observaron en los primeros momentos (30 minutos) pero se

evidenció más claramente a partir de las tres horas. La presencia de tal patrón de puntos sugería internalización del ADC.

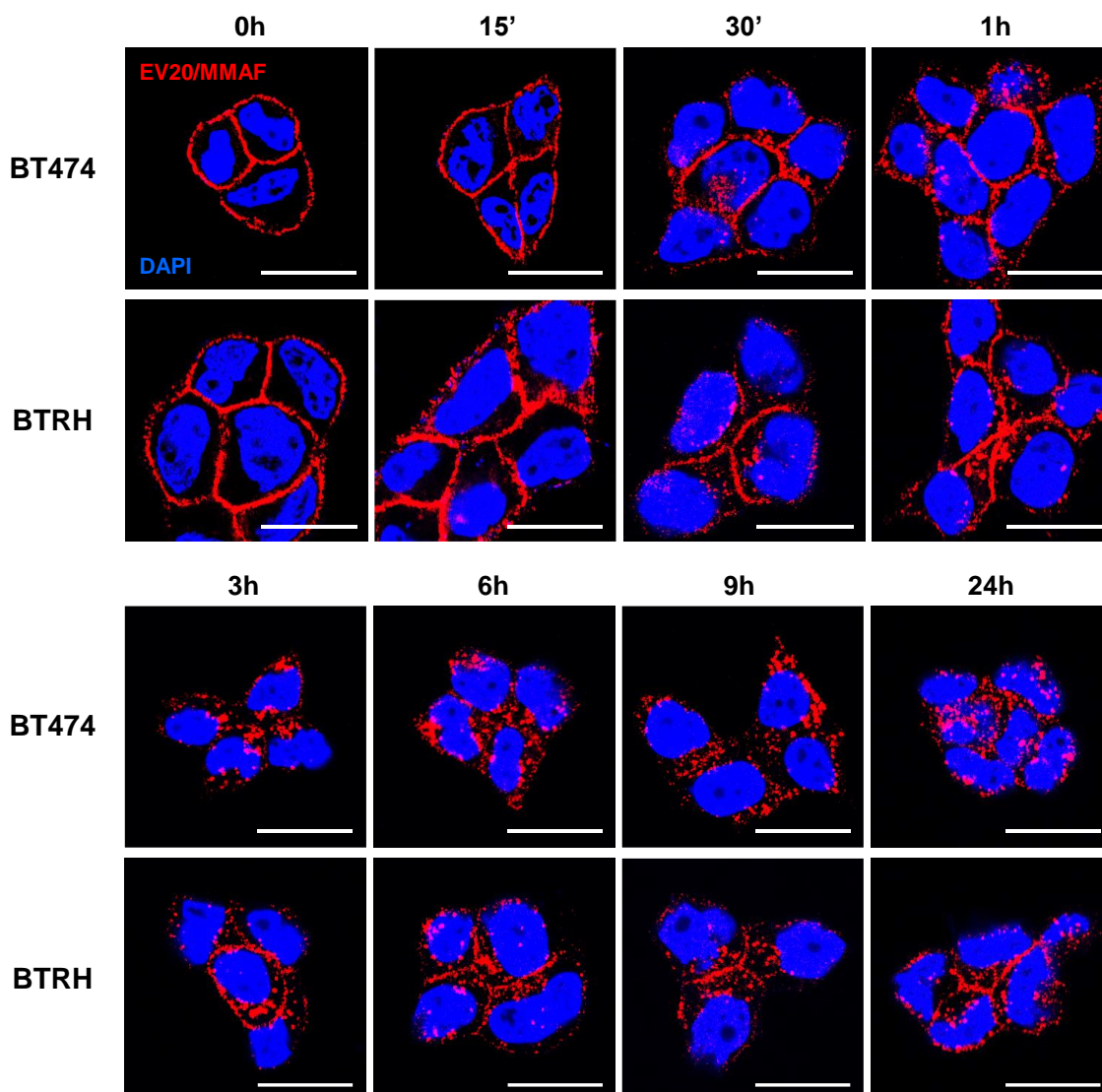


Figura 25. Internalización de EV20/MMAF en BT474 y BTRH. Internalización de EV20/MMAF (10 nM) a los tiempos indicados en células BT474 y BTRH analizado por inmunofluorescencia. Escala: 20 μ m. EV20/MMAF: rojo; DAPI: azul.

6.1. Análisis de la llegada de EV20/MMAF a los lisosomas

Si EV20/MMAF es internalizado, es de esperar que el complejo ADC-HER3 alcance los lisosomas para su posterior procesamiento. Por ello se decidió realizar estudios de inmunofluorescencia con el marcador lisosómico LAMP1. En la figura 26 puede observarse colocalización entre EV20/MMAF y LAMP1, confirmando la llegada del ADC a los lisosomas.

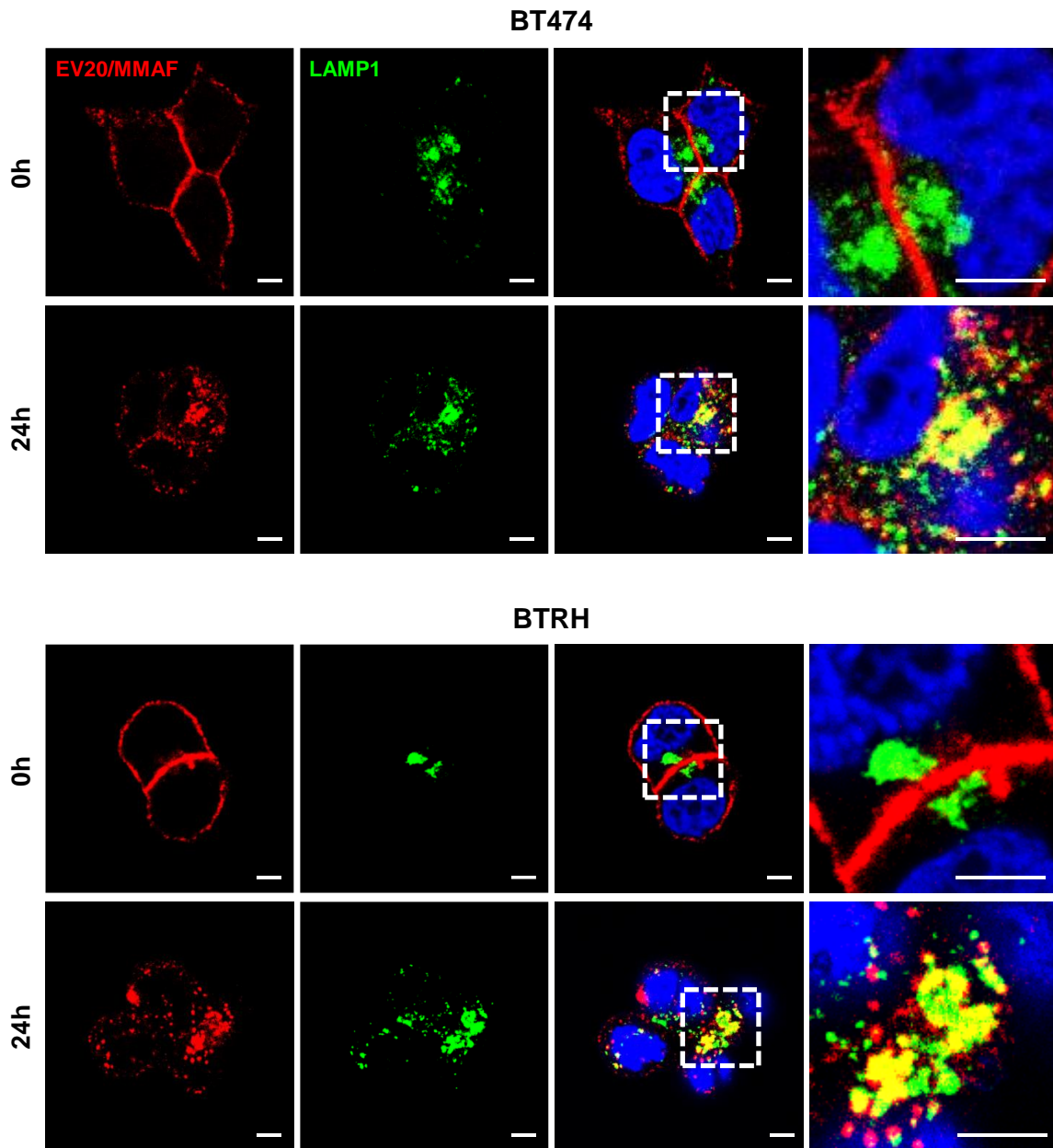


Figura 26. Colocalización entre EV20/MMAF y LAMP1 en BT474 y BTRH. Colocalización (amarillo) entre EV20/MMAF y LAMP1 en los tiempos de incubación indicados con EV20/MMAF (10 nM) en células BT474 y BTRH. Escala: 5 μ m. EV20/MMAF: rojo; LAMP1: verde, DAPI: azul.

Para analizar si la cantidad de EV20/MMAF que llega a los lisosomas de BT474 y BTRH es parecida se llevó a cabo la cuantificación de la colocalización entre EV20/MMAF y LAMP1 (Figura 27). El porcentaje de colocalización entre el ADC y LAMP1 es similar en ambas líneas celulares (Figura 27B).

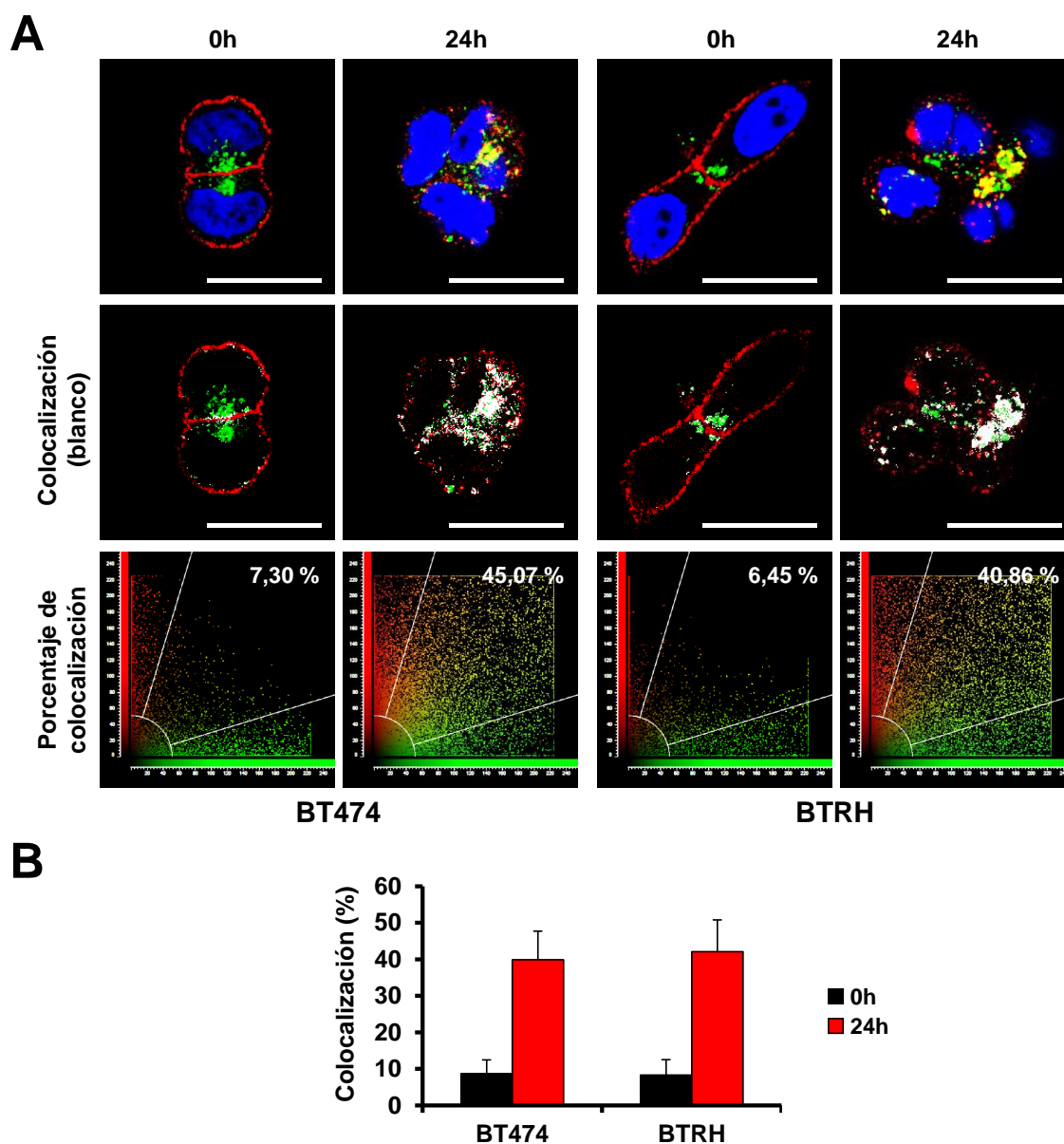


Figura 27. Cuantificación de la colocalización entre EV20/MMAF y LAMP1 en BT474 y BTRH. (A) La colocalización de EV20/MMAF (10 nM, rojo) con LAMP1 (verde) se muestra en blanco (segunda fila) en las células BT474 y BTRH. El análisis de colocalización se realizó con el programa *Leica Application Suite Advanced Fluorescence*, que generó los diagramas de dispersión de las imágenes adquiridas (última fila). Los píxeles rojos y verdes puros se encuentran entre los ejes de abscisas y ordenadas y las líneas blancas. Los píxeles de colocalización se encuentran dentro de las líneas blancas. Escala: 20 μ m. **(B)** Cuantificación de la colocalización entre EV20/MMAF y LAMP1 en 20 fotografías representativas del tratamiento con EV20/MMAF para 0h (barras negras) ó 24h (barras rojas) en células BT474 y BTRH. Los datos se representan como media + SD.

6.1.1. Internalización de pHrodo-EV20/MMAF

Se espera que la internalización de EV20/MMAF lleve a los complejos ADC-HER3 a los lisosomas, donde las proteasas ácidas pueden procesar el ADC y liberar al agente citotóxico MMAF. Para verificar que EV20/MMAF alcanzaba un ambiente ácido como el presente en los lisosomas, se marcó el ADC con pHrodo. pHrodo es

un fluorocromo rojo que es casi no fluorescente a pH neutro, pero que presenta fluorescencia en ambientes ácidos. Por tanto, si el ADC alcanza un ambiente ácido la versión conjugada a pHrodo del mismo emite fluorescencia (Figura 28).

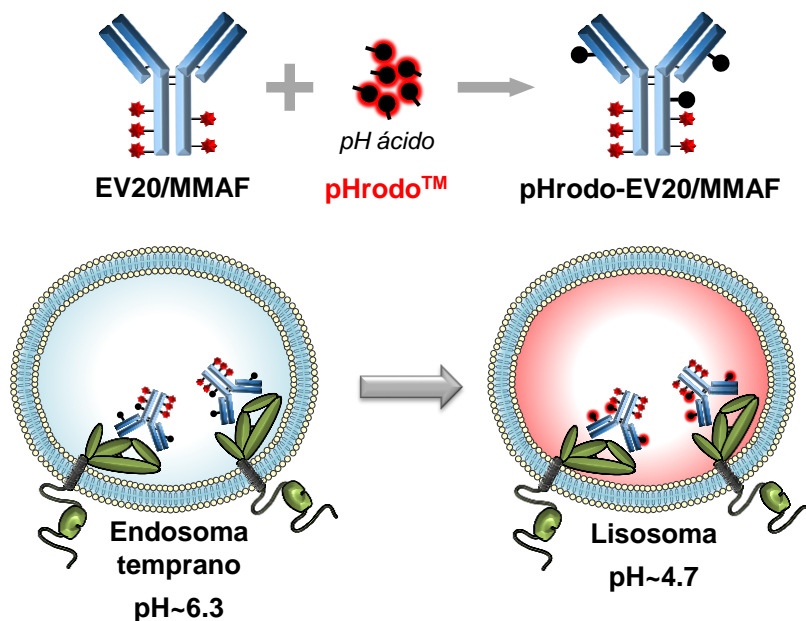


Figura 28. Esquema de la conjugación de pHrodo-EV20/MMAF. (A) Marcaje de EV20/MMAF con pHrodo. **(B)** Representación del cambio de fluorescencia dependiente del pH del orgánulo.

Las células BT474 y BTRH se incubaron con pHrodo-EV20/MMAF 10 nM durante 24 horas y las señales fluorescentes se analizaron mediante microscopía in vivo adquiriendo fotos cada 15 minutos. En las células BT474 y BTRH, la fluorescencia se acumuló progresivamente intracelularmente, lo que demuestra que pHrodo-EV20/MMAF alcanzó compartimentos ácidos (Figura 29).

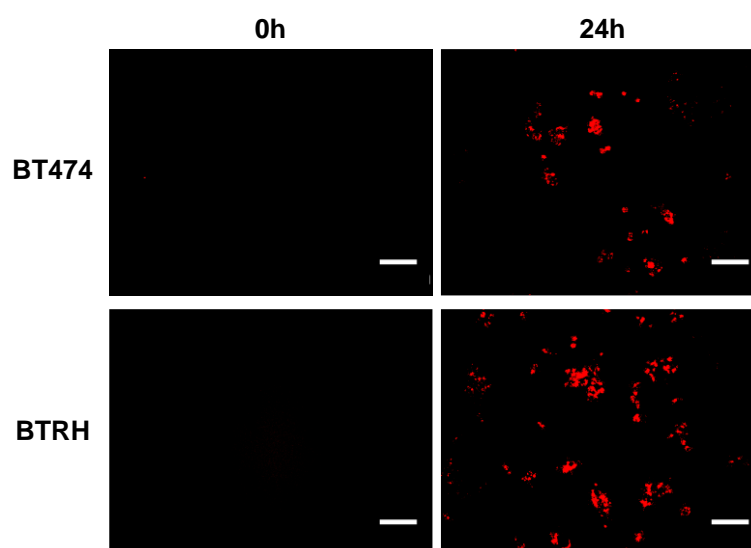


Figura 29. Internalización de pHrodo-EV20/MMAF en BT474 y BTRH. (A) Las células BT474 y BTRH se trataron con pHrodo-EV20/MMAF (10 nM) y se adquirieron fotos desde tiempo 0 a 24 horas cada 15 minutos. Escala: 100 μ m.

6.2. Internalización de EV20/MMAF marcado con biotina

Para verificar si la cinética de internalización de EV20/MMAF era similar en la línea BTRH y en la línea parental BT474, se marcó el ADC con una forma de biotina escindible que es sensible al agente reductor glutatión (GSH). Si el anticuerpo está expuesto en el medio extracelular, la biotina es liberada por GSH. Sin embargo, el EV20/MMAF biotinilado internalizado está protegido de la acción reductora de GSH, lo que hace que sea detectable por western blot (Figura 30A). La internalización de EV20/MMAF biotinilado en las células BT474 y BTRH se detectó a partir de los 15 minutos y alcanzó un máximo a los 60 minutos (Figura 30B). La señal del ADC biotinilado disminuyó a partir de entonces. En la figura 30C puede observarse como en ambas líneas celulares la cinética de internalización fue similar.

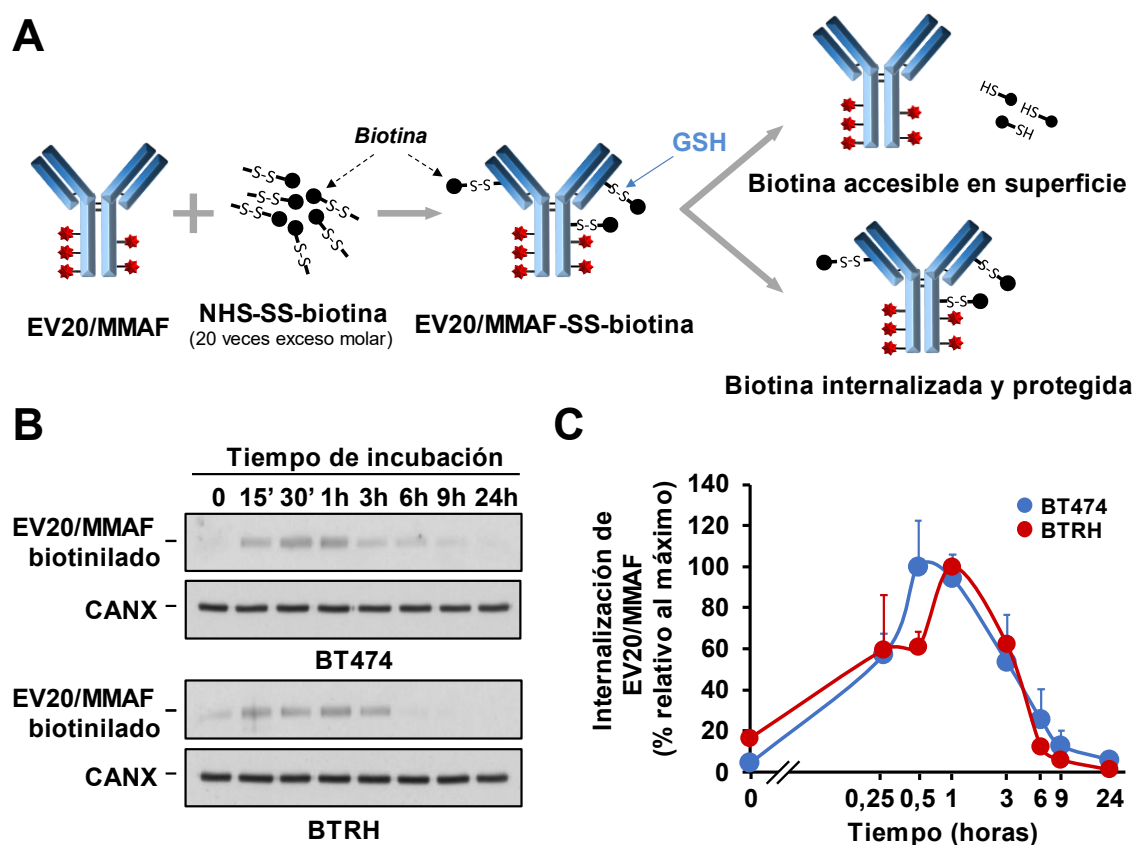


Figura 30. Internalización de EV20/MMAF-SS-biotina. (A) Marcaje de EV20/MMAF con biotina reducible y acción del glutatión reducido (GSH). **(B)** Las líneas celulares BT474 y BTRH se trataron con 10 nM de EV20/MMAF-S-S-biotina durante 1 hora a 4°C y tras ser lavadas con PBS se incubaron a 37°C durante los tiempos indicados. Posteriormente, la biotina accesible en la superficie se escindió, las células se lisaron y los extractos se precipitaron con estreptavidina-sefariosa. Se analizó EV20/MMAF mediante western blot, usando un anticuerpo anti-IgG humana-HRP. **(C)** Análisis cuantitativo de los estudios que se muestran en (B). Los datos se presentan como la media + SD de dos experimentos independientes. La internalización se representó como el porcentaje de internalización del ADC relativo al máximo nivel internalizado para cada línea celular.

7. EFECTO DE EV20/MMAF Y TRASTUZUMAB SOBRE LOS NIVELES DE HER2 Y HER3 DE BT474 Y BTRH

El tratamiento con EV20/MMAF en las células BT474 y BTRH provocó una disminución de los niveles de HER3 total, que fue detectable entre 1 y 3 horas (Figura 31). Sin embargo, el ADC no afectó a la cantidad total de HER2.

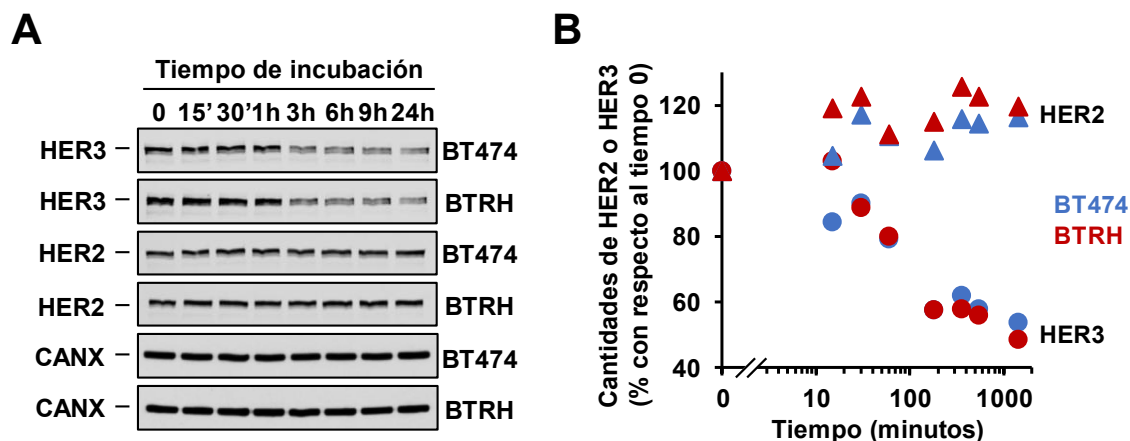


Figura 31. Efecto de EV20/MMAF en los niveles de HER2 y HER3 en BT474 y BTRH. (A) Análisis por western blot del efecto de EV20/MMAF (10 nM) sobre los niveles de HER2 y HER3 en células BT474 y BTRH en los tiempos de incubación indicados con el ADC. Se analizó la expresión de HER2 o HER3 en el mismo western blot usando dos anticuerpos fluorescentes secundarios específicos de especie marcados con fluorocromos diferentes. (B) Representación cuantitativa de los datos representados en (A).

Los experimentos paralelos realizados con trastuzumab mostraron que este anticuerpo no afectó significativamente a los niveles de HER2 o HER3 a los tiempos analizados (Figura 32).

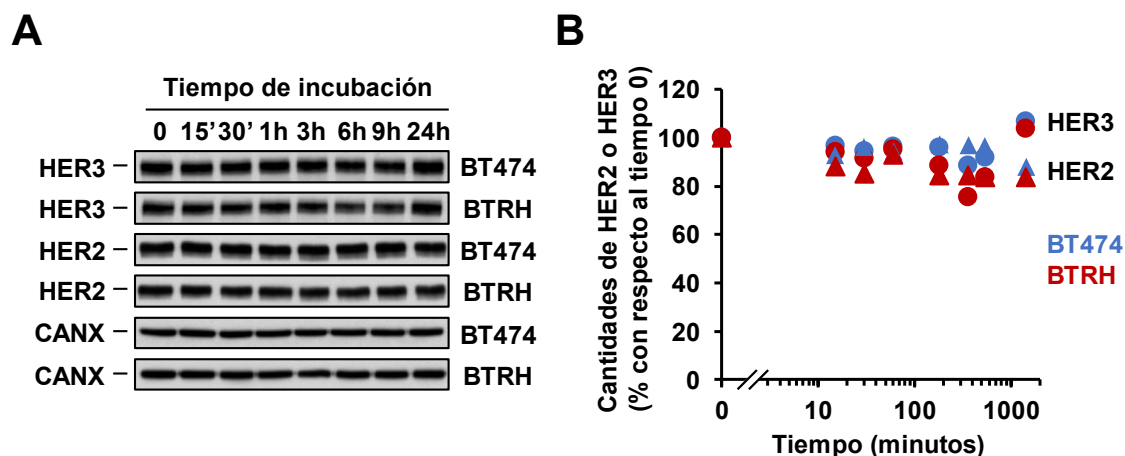


Figura 32. Efecto de trastuzumab sobre los niveles de HER2 y HER3 en BT474 y BTRH. (A) Análisis de los niveles de HER2 o HER3 en células BT474 y BTRH tratadas con trastuzumab (50 nM) durante los tiempos indicados. (B) Análisis cuantitativos de los experimentos mostrados en (A).

8. ANÁLISIS DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE EV20/MMAF EN LAS LÍNEAS CELULARES BT474 Y BTRH

8.1. Efecto de EV20/MMAF en el ciclo celular

La evaluación del ciclo celular mediante citometría de flujo usando tinción con PI reveló que EV20/MMAF aumentaba la proporción de células en la región G₂/M de los histogramas y tal aumento estaba acompañado de una disminución en la fase G₀/G₁ (Figura 33A). Estos cambios en el perfil del ciclo celular provocados por EV20/MMAF fueron similares en BT474 y BTRH.

Los análisis de western blot mostraron que EV20/MMAF provocaba una acumulación sustancial y persistente de pHistona H3, marcador de células en la mitosis (Figura 33B). Además, el ADC también aumentó los niveles de pBUBR1, otra proteína cuya fosforilación marca las células en mitosis. Estos estudios también confirmaron que el tratamiento con EV20/MMAF provoca una disminución en los niveles de HER3 y pHER3 en ambas líneas celulares.

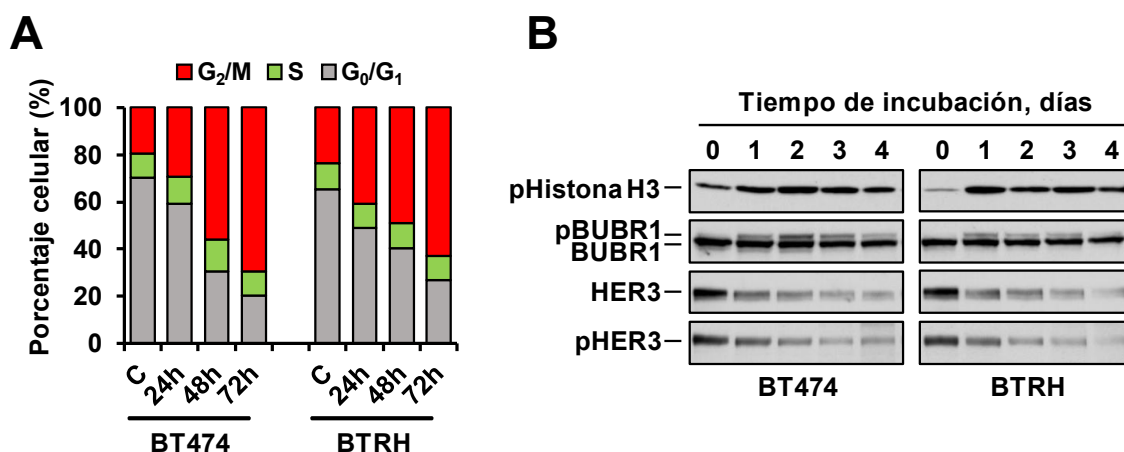


Figura 33. Efecto de EV20/MMAF en el ciclo celular de las líneas BT474 y BTRH. (A) Análisis del ciclo celular de BT474 y BTRH por citometría de flujo (50.000 eventos) tratadas con EV20/MMAF (10 nM) durante los tiempos indicados. Se muestra un experimento representativo de un ensayo que se repitió 3 veces. **(B)** Las células BT474 y BTRH se trataron durante los días indicados con EV20/MMAF (10 nM), se lisaron y se analizó la cantidad de pHistona H3, BUBR1, HER3 y pHER3.

8.2. Efecto de EV20/MMAF en la formación del huso mitótico

El estancamiento de las células en la fase M del ciclo celular por la acción de los agentes citotóxicos del ADC provoca la muerte celular a través de un fenómeno denominado catástrofe mitótica. Tal efecto es causado por la acción de los fármacos sobre el sistema microtubular necesario para la adecuada progresión del ciclo celular. Los análisis de inmunofluorescencia mostraron que los husos mitóticos de

las células BT474 y BTRH tratadas con EV20/MMAF ofrecían un aspecto aberrante (Figura 34A). De hecho, en ambas líneas celulares el porcentaje de células con huso mitótico aberrante es mucho mayor en las células tratadas que en las células sin tratar (Figura 34B).

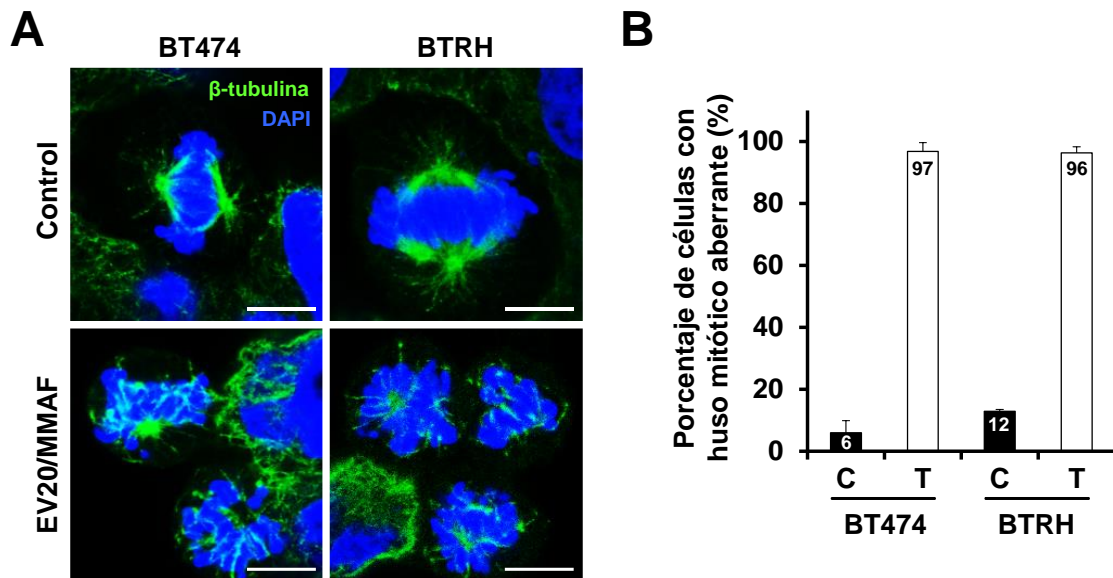


Figura 34. Efecto de EV20/MMAF en la formación del huso mitótico de las líneas celulares BT474 y BTRH. (A) Inmunofluorescencia del huso mitótico tras la acción de EV20/MMAF. Se trataron las células BT474 y BTRH con el ADC (10 nM, 48 horas), se fijaron y se tiñeron para β -tubulina (verde) y DAPI (azul). Escala: 7,5 μ m. (B) Análisis cuantitativo de las células con huso mitótico aberrante tratadas o no con EV20/MMAF (10 nM, 48 horas). Las barras representan la media + SD de dos experimentos independientes, calculados de la siguiente manera: (número de células mitóticas con huso aberrante / número total de células mitóticas) \times 100 (%).

8.3. Efecto de EV20/MMAF en la apoptosis

Los estudios de citometría de flujo para analizar muerte celular demostraron una acumulación de células muertas a lo largo del tiempo en los cultivos de células tratadas con el ADC (Figura 35A).

Los estudios bioquímicos confirmaron la inducción de la muerte celular apoptótica por EV20/MMAF mediante un aumento del procesamiento (Figura 35B) y la activación (Figura 35C) de la caspasa 3 en las líneas celulares BT474 y BTRH. Además, dichos fenómenos de muerte celular son similares en ambos modelos de estudio.

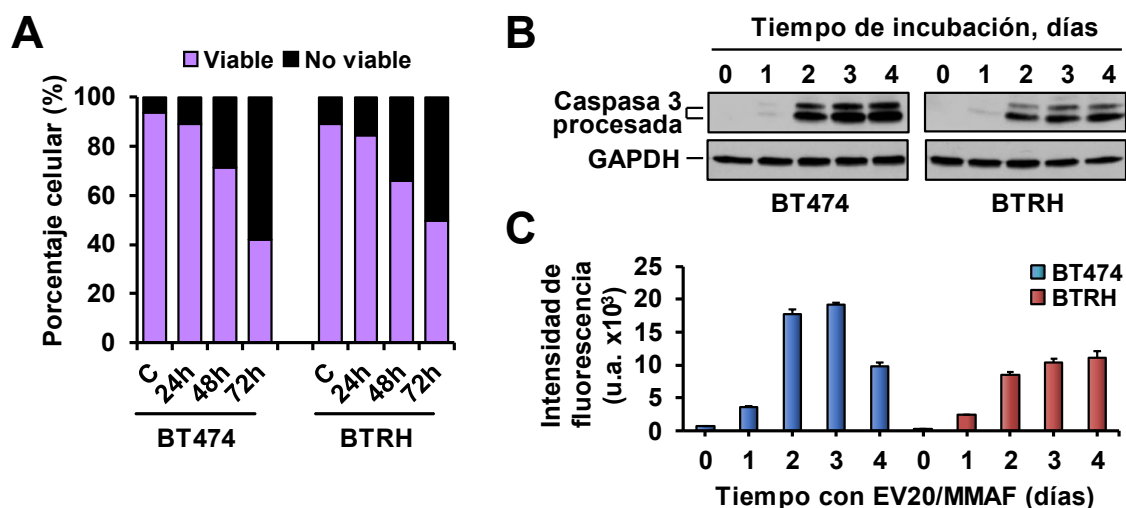


Figura 35. Efecto de EV20/MMAF en la muerte celular de las líneas BT474 y BTRH. (A) Análisis de la apoptosis de las células BT474 y BTRH tratadas con EV20/MMAF (10 nM). Este proceso celular fue analizado por citometría de flujo mediante doble tinción con Anexina V y PI (50.000 eventos). (B) Análisis mediante western blot del efecto de EV20/MMAF (10 nM) sobre el procesamiento de la caspasa 3 en células BT474 y BTRH. Se utilizó GAPDH como control de carga. (C) Análisis fluorimétricos de la actividad caspasa 3 en células BT474 y BTRH tratadas con EV20/MMAF (10 nM). Los datos muestran la media + SD de los triplicados de un experimento que se repitió dos veces.

9. EFECTO DE EV20/MMAF EN ESTUDIOS IN VIVO Y EN OTROS MODELOS DE RESISTENCIA A TERAPIAS ANTI-HER2

9.1. Efecto de EV20/MMAF in vivo en el modelo de resistencia secundaria a trastuzumab generado con las células BTRH

Para analizar el efecto antitumoral in vivo de EV20/MMAF sobre las células BTRH, estas células se implantaron ortotópicamente en las mamas de ratones hembra desnudos. Una vez que los tumores alcanzaron los 500 mm³, los ratones se categorizaron de manera aleatoria en cuatro grupos: (1) control, (2) EV20 (10 mg/kg), (3) EV20/MMAF (3,3 mg/kg) y (4) EV20/MMAF (10 mg/kg). Se realizó una única inyección intraperitoneal con cada tratamiento y se controló el tamaño del tumor dos veces por semana.

Como se muestra en la figura 36A, el tratamiento con el anticuerpo desnudo EV20 no pudo frenar el crecimiento tumoral. Por el contrario, el tratamiento con EV20/MMAF provocó la reducción del tumor, ya sea a 3,3 o a 10 mg/kg. Por otra parte, se comprobó que los tratamientos con EV20 y con EV20/MMAF a ambas dosis eran bien tolerados, sin afectar sustancialmente a los pesos de los ratones (Figura 36B).

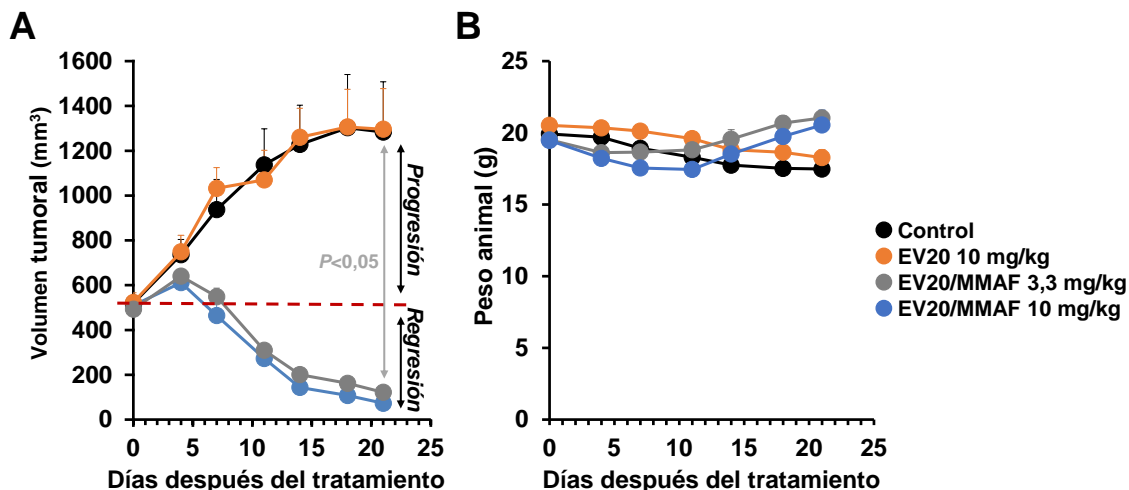


Figura 36. Efecto in vivo de EV20/MMAF en xenoinjertos de células BTRH. (A) Efecto in vivo de PBS (control, n=4), EV20 (10 mg/kg, n=4) y EV20/MMAF (3.3 mg/kg, n=5; 10 mg/kg, n=4) en el crecimiento de tumores generados a partir de células BTRH. Los ratones se trataron cuando los tumores alcanzaron un volumen de 500 mm³. Los datos se representan como media + SEM. Los *p*-valores exactos de todas las comparaciones de las últimas mediciones y la prueba estadística utilizada se indican en anexo 5. (B) Peso medio de los animales de los diferentes grupos representados en (A).

9.1.1. Distribución tisular de EV20/MMAF

Algunos ratones fueron sacrificados para evaluar la distribución tisular de EV20/MMAF. Con ese fin, ratones portadores de tumores BTRH se dividieron en grupo control sin tratar o tratamiento con EV20/MMAF y se sacrificaron después de dos semanas.

Tras este periodo, EV20/MMAF se acumuló principalmente en el tejido tumoral y su presencia en los demás tejidos analizados fue menor o indetectable (Figura 37). Cabe señalar que ni EV20 ni EV20/MMAF reconocen a HER3 murino, dejando abierta la posibilidad de efectos secundarios de EV20/MMAF debidos a la interacción del ADC con HER3 autóctono.

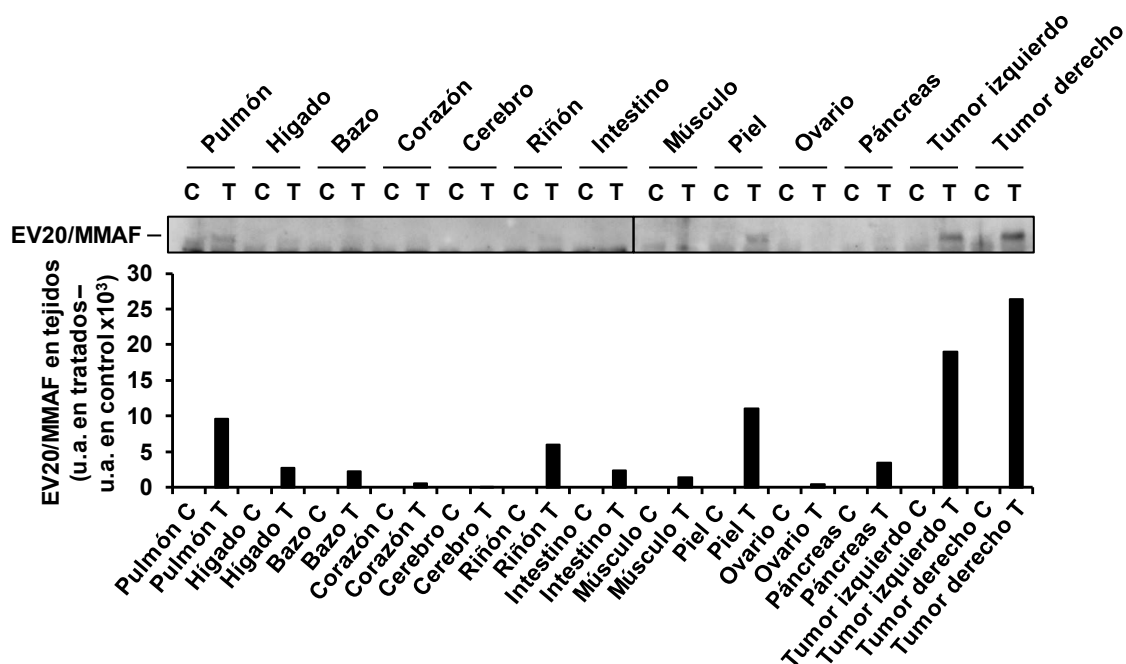


Figura 37. Distribución tisular de EV20/MMAF en ratones inyectados con células BTRH. Dos semanas después del tratamiento con EV20/MMAF (3,3 mg/kg), los tumores y los órganos indicados se diseccionaron de los animales del grupo control (C) o tratado (T). Se precipitó EV20/MMAF a partir de cantidades iguales de proteína (500 µg) con proteína A-sefarosa. El EV20/MMAF fue detectado por western blot usando anti-IgG humana-HRP. La parte inferior de la figura incluye una representación gráfica de la cuantificación de los niveles de EV20/MMAF mostrados en los western blots. Los niveles de EV20/MMAF en cada tejido se obtuvo de la siguiente manera: señal de la banda del tejido del animal tratado menos la señal de la banda del tejido respectivo del animal no tratado.

9.1.2. Efecto de EV20/MMAF en tumores BTRH

Además, se analizó por western blot la presencia de pHistona H3 y de caspasa 3 procesada en los tumores de los ratones del grupo control y tratado. En la figura 38 puede observarse como ambas proteínas se acumularon en los tumores tratados durante 2 semanas con EV20/MMAF.

A continuación, se analizaron los niveles de HER3 y pHER3, los cuales fueron más bajos en las muestras de tumores tratados con EV20/MMAF durante dos semanas en comparación con los niveles presentes en los tumores no tratados.

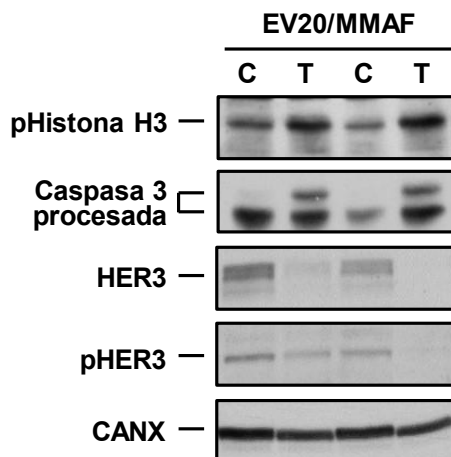


Figura 38. Análisis del efecto de EV20/MMAF en tumores BTRH. Análisis de pHistona H3, caspasa 3 procesada, HER3 y pHER3 en xenoinjertos de ratones creados con células BTRH y tratados (T) o no (C) con EV20/MMAF (3,3 mg/kg) durante 2 semanas.

9.1.3. Seguimiento del crecimiento tumoral a largo plazo

Dada la regresión de los tumores después del tratamiento con una dosis única de EV20/MMAF, se decidió mantener los ratones de los grupos tratados con EV20/MMAF (ya sea a 3,3 o 10 mg/kg) en observación para explorar si los tumores volvían a crecer con el tiempo. Todos los ratones tratados con una dosis única de 10 mg/kg y seguidos durante prácticamente un año no mostraron recidivas de sus tumores iniciales, alcanzando una respuesta duradera (Figura 39). En el caso de los ratones tratados con 3,3 mg/kg, tres de los cinco ratones recayeron. En estos ratones que presentaron recidivas, las nuevas inyecciones de EV20/MMAF pudieron reducir las masas tumorales.

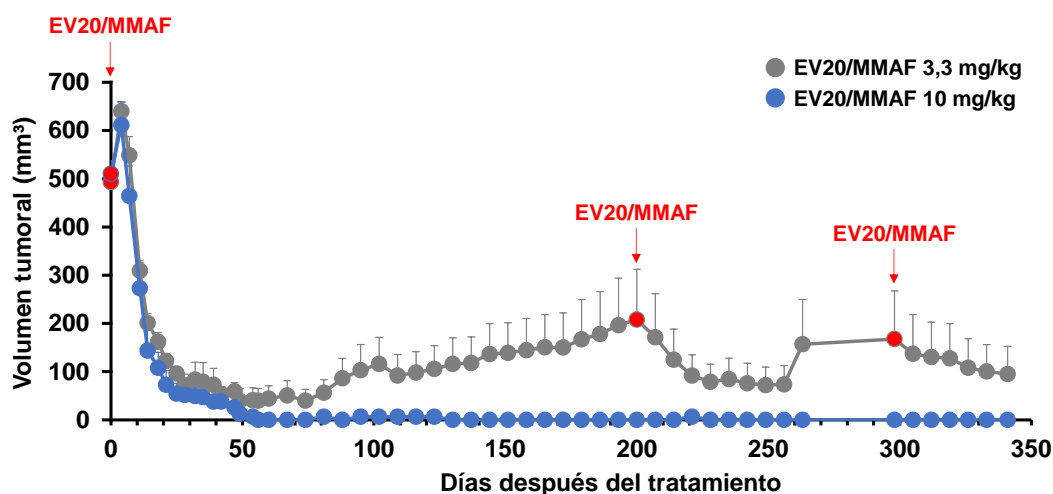


Figura 39. Seguimiento a largo plazo de los ratones con xenoinjertos de células BTRH. Monitorización a largo plazo de ratones inyectados con células BTRH y tratados con EV20/MMAF (3,3 mg/kg, n=5; 10 mg/kg, n=4). Cuando se indica, los ratones se trataron con EV20/MMAF. Los datos se representaron como media + SEM del volumen tumoral.

9.1.4. Cambio en la dosificación de EV20/MMAF y su efecto en tamaños tumorales grandes

Habiendo observado recaídas en ratones tratados con una única dosis de EV20/MMAF a 3,3 mg/kg, se siguió un esquema de dosificación alternativo para intentar reducir la probabilidad de tales recaídas. Con ese fin, ratones portadores de tumores BTRH se trataron durante prácticamente un año con 3,3 mg/kg de EV20/MMAF cada tres semanas. Como se muestra en la figura 40, este protocolo de tratamiento dio como resultado una regresión completa de los tumores, sin recaídas. Además de este experimento se pudo concluir que EV20/MMAF tiene acción en tumores de gran tamaño (1200 y 1400 mm³).

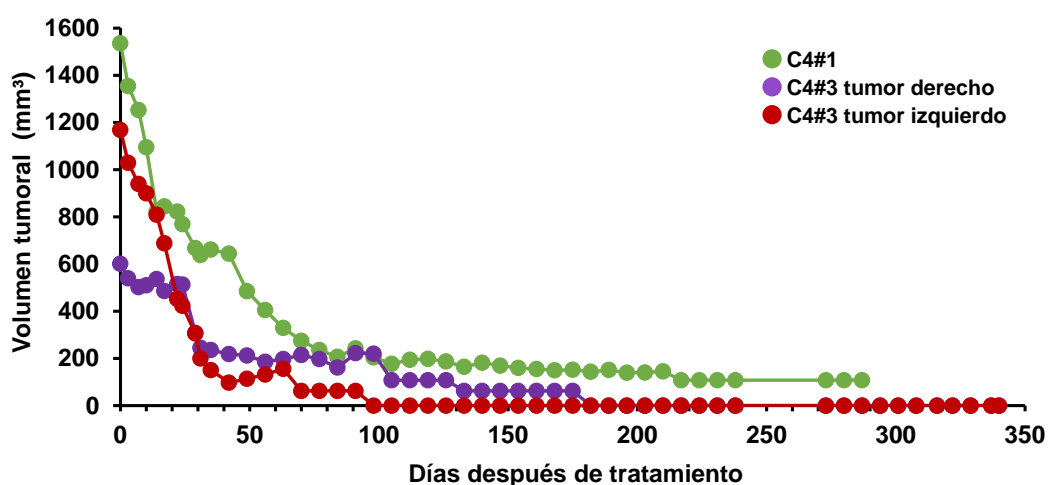


Figura 40. Seguimiento del tamaño de los tumores BTRH de ratones tratados cada 3 semanas con EV20/MMAF. Monitorización de dos ratones portadores de tumores BTRH tratados cada 3 semanas con EV20/MMAF a 3,3 mg/kg.

9.2. Efecto de EV20/MMAF in vivo en el modelo de resistencia secundaria a trastuzumab generado con las células BTRH#10

En los ratones portadores de tumores creados por la inyección de células BTRH, el tratamiento in vivo con trastuzumab cada semana provoca inicialmente la reducción del tumor, seguido en algunos casos de recidivas. Debido al conocimiento de la sensibilidad inicial a trastuzumab de los tumores derivados de BTRH in vivo, se decidió explorar el efecto antitumoral in vivo de EV20/MMAF en dos modelos resistentes a trastuzumab adicionales. Uno de ellos, creado mediante la inyección de células BTRH#10, representó otro modelo de resistencia secundaria a trastuzumab.

Los ratones portadores de xenoinjertos de BTRH#10 mostraron resistencia in vivo a trastuzumab administrado semanalmente (Figura 41A). Los tumores en

ratones inyectados con células BTRH#10 fueron sensibles a la acción de una única dosis de EV20/MMAF, lo que confirma la eficacia de este ADC para provocar regresión tumoral. De nuevo, EV20 desnudo no afectó al crecimiento de los tumores. La administración de trastuzumab, EV20 y EV20/MMAF volvió a mostrar ser tolerable al no afectar al peso de los animales (Figura 41B).

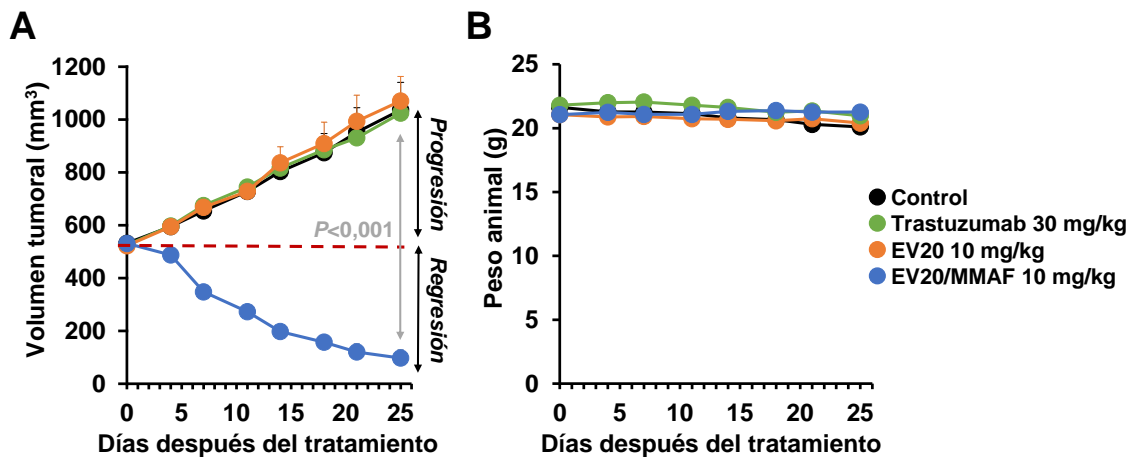


Figura 41. Efecto in vivo de EV20/MMAF en xenoinjertos de células BTRH#10. (A) Efecto in vivo de PBS (control, n=5), trastuzumab (30 mg/kg, n=4), EV20 (10 mg/kg, n=5) y EV20/MMAF (10 mg/kg, n=5) sobre el crecimiento tumoral de xenoinjertos de células BTRH#10. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 500 mm³, los ratones fueron aleatorizados en los grupos indicados previamente. Los datos se representan como la media + SEM. Los *p*-valores exactos de todas las comparaciones de las últimas mediciones y la prueba estadística utilizada se indican en anexo 6. (B) Media de los pesos de los animales presentados en (A).

9.2.1. Seguimiento del crecimiento tumoral a largo plazo

En este experimento, también se realizó un seguimiento a largo plazo de los ratones tratados con EV20/MMAF desde el inicio del experimento para analizar la aparición de posibles recidivas a lo largo del tiempo.

En este caso, uno de los cuatro ratones del grupo tratado con EV20/MMAF presentó crecimiento tumoral tras la regresión, pero seguía siendo sensible a la acción del ADC (Figura 42).

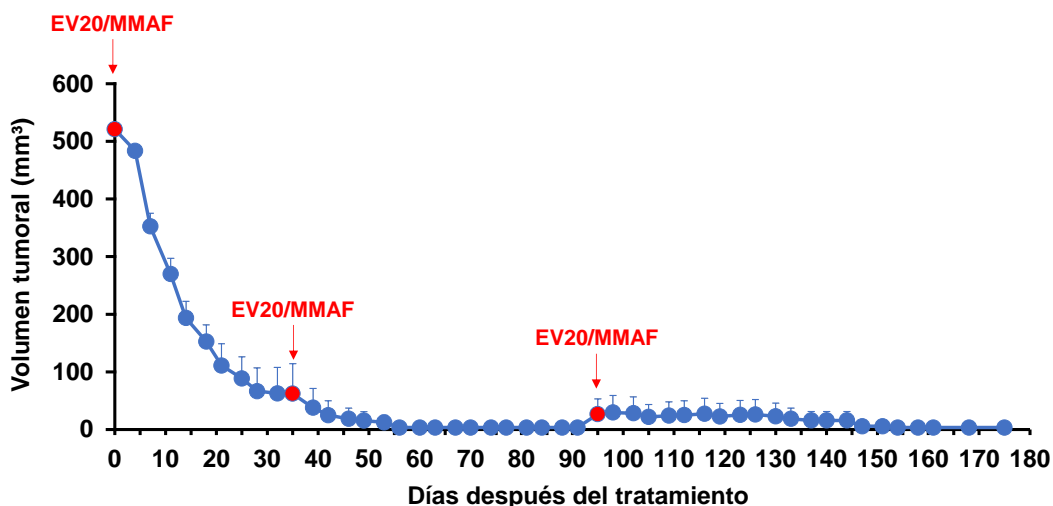


Figura 42. Seguimiento a largo plazo de los ratones con xenoinjertos de células BTRH#10. Monitorización a largo plazo de ratones inyectados con células BTRH#10 y tratados con EV20/MMAF (n=4). Cuando se indica, los ratones se trataron con EV20/MMAF. Los datos se representan como la media + SEM de las medidas del tamaño tumoral.

9.2.2. Efecto de EV20/MMAF en tumores de gran tamaño

Al igual que en el experimento in vivo de las células BTRH, se quiso analizar la capacidad de EV20/MMAF para disminuir tumores de gran tamaño generados con células BTRH#10. Se trataron dos ratones con tumores en torno a 1000 mm^3 y con una única dosis se consiguió una regresión completa y duradera (Figura 43).

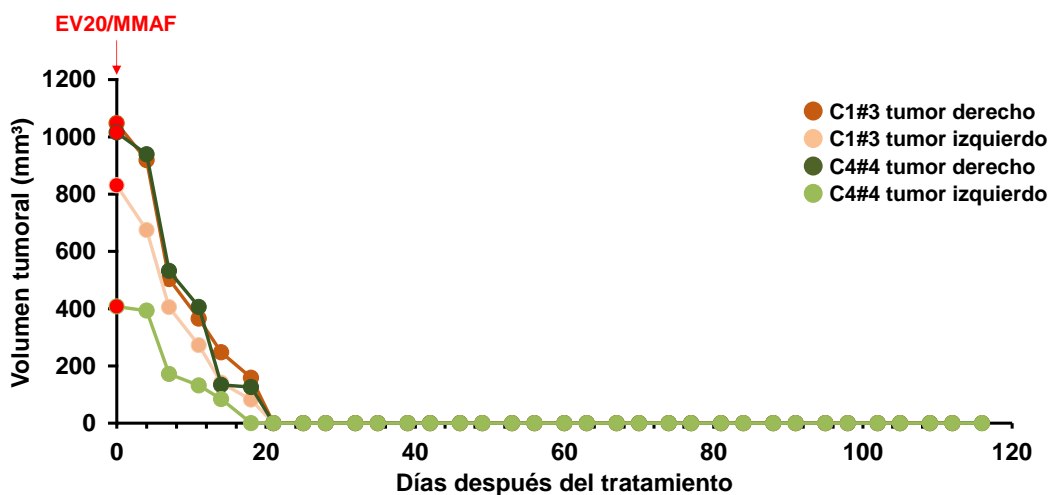


Figura 43. Tratamiento de tumores (1000 mm^3) grandes de células BTRH#10. Dos ratones con tumores grandes fueron tratados con 10 mg/kg de EV20/MMAF y seguidos a lo largo del tiempo.

9.3. Efecto de EV20/MMAF in vivo en el modelo de resistencia primaria a trastuzumab generado con las células HCC1954

Para estudiar el efecto antitumoral de EV20/MMAF in vivo se utilizó otro modelo de resistencia a trastuzumab. En este caso el modelo era de resistencia primaria y fue generado con las células HCC1954. Dicho modelo demostró resistencia in vivo a trastuzumab administrado semanalmente (Figura 44A). Además, los xenoinjertos de HCC1954 fueron sensibles a la acción de una única dosis de EV20/MMAF, confirmándose nuevamente la eficacia de este fármaco para provocar regresión tumoral. En las células HCC1954 implantadas en los ratones, EV20 provocó el estancamiento del crecimiento tumoral, pero no se observó regresión de los tumores. En la figura 44B se puede observar el mantenimiento del peso medio de los ratones de cada grupo de estudio.

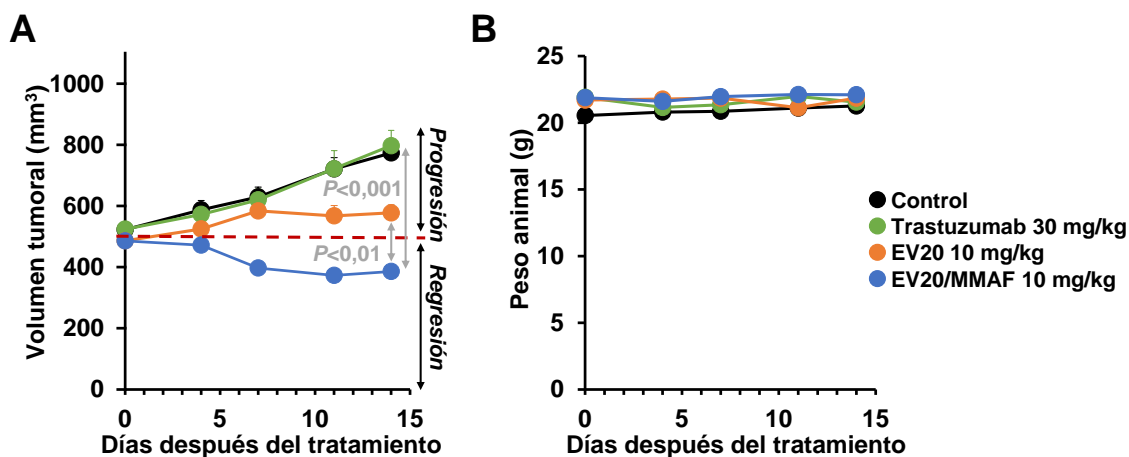


Figura 44. Efecto in vivo de EV20/MMAF en xenoinjertos de células HCC1954. (A) Efecto in vivo de PBS (control, n=5), trastuzumab (30 mg/kg, n=5), EV20 (10 mg/kg, n=4) y EV20/MMAF (10 mg/kg, n=5) en el crecimiento de tumores generados a partir de células HCC1954. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 500 mm³, los ratones fueron divididos en los grupos indicados. Los datos se representan como la media + SEM. Los *p*-valores exactos de todas las comparaciones de las últimas mediciones y la prueba estadística utilizada se indican en anexo 7. **(B)** Media de los pesos de los animales presentados en (A).

9.4. Efecto de EV20/MMAF en modelos de resistencia secundaria a lapatinib, neratinib y T-DM1

También se exploró la acción de EV20/MMAF en modelos de resistencia adquirida a otros fármacos anti-HER2. Con ese fin, usamos los modelos de BT474 resistentes a lapatinib, neratinib o T-DM1 generados en el laboratorio.

9.4.1. Acción de EV20/MMAF *in vitro* en modelos de resistencia secundaria a lapatinib

En el caso de lapatinib, se probó la acción de EV20/MMAF en un conjunto (“pool”) de células resistentes (BTRL) así como en dos clones resistentes a lapatinib (BTRL#3 y BTRL#109). Tras probar la resistencia de estas líneas celulares a lapatinib (Figura 45A), se decidió testar la acción de EV20/MMAF en estas células. El efecto de EV20/MMAF sobre las células BTRL y BTRL#109 fue similar al de las células BT474 parentales. Sin embargo, EV20/MMAF fue ligeramente menos potente en el clon BTRL#3. Los análisis de western blot indicaron que todas las líneas celulares resistentes a lapatinib, ya sea el conjunto o los clones aislados, expresaban niveles similares de HER2 y HER3. Además, se observó que mantienen pHER2, pHER3 y pAKT, aunque a diferentes niveles, siendo las líneas BTRL y BTRL#109 las que presentan los niveles más bajos (Figura 45B).

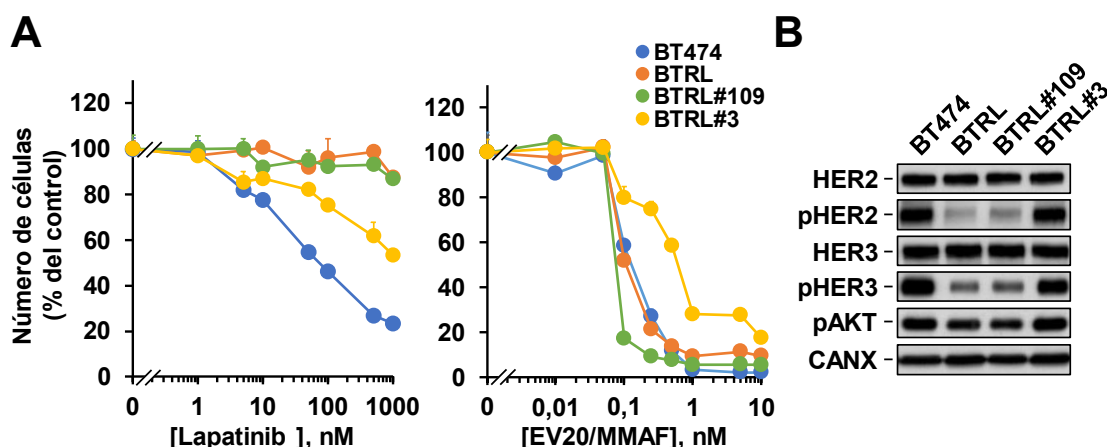


Figura 45. Efecto de EV20/MMAF en modelos de resistencia secundaria a lapatinib. (A) Análisis de dosis-respuesta del efecto de lapatinib (izquierda, 48 horas) y EV20/MMAF (derecha, 5 días) sobre la proliferación de las células BT474, BTRL, BTRL#109 y BTRL#3. Los datos representan la media + SD de los triplicados (normalizados a los controles no tratados) de un experimento que se repitió al menos tres veces. **(B)** Niveles de HER2, pHER2, HER3, pHER3 y pAKT de las células BT474 y líneas resistentes a lapatinib.

9.4.2. Acción de EV20/MMAF *in vitro* en modelos de resistencia secundaria a neratinib

En el caso de neratinib, varios clones mostraron una resistencia mantenida al fármaco a lo largo de varios meses de cultivo, y se seleccionaron dos de ellos (BTRN#5 y BTRN#24) para el análisis posterior con EV20/MMAF (Figura 46A). El tratamiento con EV20/MMAF tuvo un efecto antiproliferativo tanto en los clones resistentes a neratinib como en la línea parental BT474. Como ocurrió con los otros modelos de resistencia secundaria mencionados anteriormente, los niveles de

HER2 y HER3 en los clones resistentes fueron similares a los de la célula parental BT474 (Figura 46B). Los niveles de pHER2 y pHER3 en los clones resistentes a neratinib fueron más bajos que los presentes en BT474, mientras que los de pAKT fueron más altos.

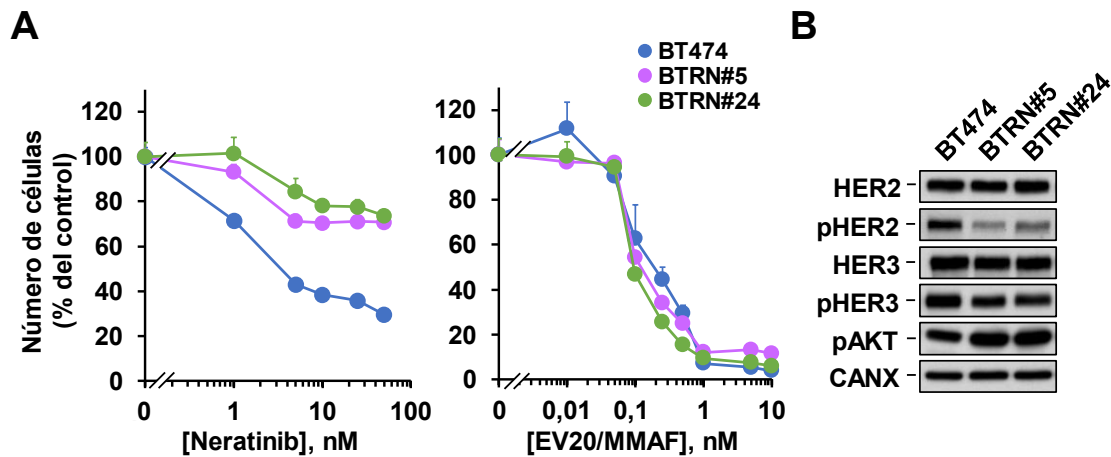


Figura 46. Efecto in vitro de EV20/MMAF en modelos de resistencia secundaria a neratinib. (A) Efecto de neratinib (izquierda, 48 horas) y EV20/MMAF (derecha, 5 días) sobre la proliferación de las células BT474, BTRN#5 y BTRN#24. Los datos representan la media + SD de los triplicados (normalizados a los controles sin tratar) de un experimento que se repitió al menos tres veces. (B) Niveles de HER2, pHER2, HER3, pHER3 y pAKT de las células BT474 y células resistentes a neratinib.

9.4.3. Acción de EV20/MMAF in vitro en modelos de resistencia secundaria a T-DM1

Finalmente, se probó la eficacia de EV20/MMAF en células resistentes a T-DM1 (Figura 47A). EV20/MMAF fue efectivo en estos clones resistentes a T-DM1, aunque en el clon BT-TDM1R#1, que presenta un procesamiento lisosómico deficiente, el efecto de EV20/MMAF fue menos potente. Esto quiere decir que ambos ADCs, T-DM1 y EV20/MMAF, dependen de su procesamiento en los lisosomas como parte de su mecanismo. Los niveles de HER2, HER3, pHER3 y pAKT en los clones resistentes a T-DM1 fueron similares a los de la célula parental BT474, mientras que los niveles de pHER2 fueron más bajos en BT-TDM1R#6 (Figura 47B).

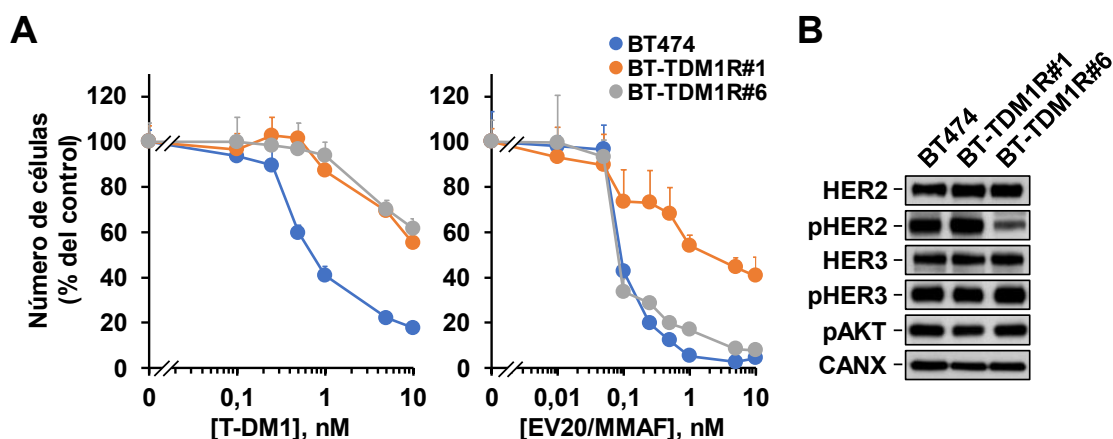


Figura 47. Efecto in vitro de EV20/MMAF en modelos de resistencia secundaria a T-DM1. (A) Dosis-respuesta del efecto de T-DM1 (izquierda) y EV20/MMAF (derecha) a 5 días, sobre la proliferación de las células BT474, BT-TDM1R#1 y BT-TDM1R#6. (B) Niveles de HER2, pHER2, HER3, pHER3 y pAKT de las células BT474 y clones resistentes a T-DM1. Los datos representan la media + SD de los triplicados (normalizados a los controles sin tratar) de un experimento que se repitió al menos tres veces

9.4.4. Acción de EV20/MMAF in vivo en un modelo de resistencia secundaria a T-DM1

Por último, se exploró la acción in vivo de EV20/MMAF en tumores de ratones creados mediante la inyección de células BT-TDM1R#6. Como se muestra en la Figura 48A, T-DM1 no pudo causar la regresión de estos tumores. Por el contrario, EV20/MMAF sí provocó regresión tumoral. De nuevo, EV20 no afectó a la tasa de crecimiento de estos tumores. Estos tratamientos demostraron ser bien tolerados por los animales, sin cambios en sus pesos (Figura 48B).

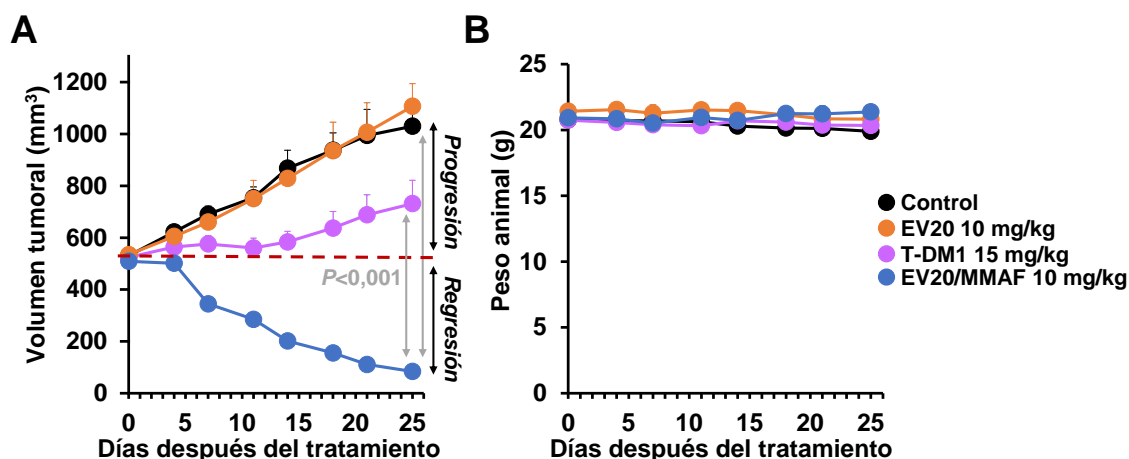


Figura 48. Efecto in vivo de EV20/MMAF en xenoinjertos de células BT-TDM1R#6. (A) Efecto in vivo de PBS (control, n=4), EV20 (10 mg/kg, n=4), T-DM1 (15 mg/kg, n=4) y EV20/MMAF (10 mg/kg, n=4) en el crecimiento tumoral de ratones con tumores de células BT-TDM1R#6. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 500 mm³, los ratones fueron divididos en los grupos indicados previamente. Los datos se representan como la media + SEM. Los p -valores exactos de todas las comparaciones de las últimas mediciones y la prueba estadística utilizada se indican en anexo 8. (B) Media de los pesos de los animales presentados en (A).

9.4.4.1. Seguimiento del crecimiento tumoral a largo plazo

Los ratones portadores de xenoinjertos de BT-TDM1R#6 tratados con EV20/MMAF fueron seguidos durante aproximadamente un año para observar posibles recidivas. En este caso, ninguno de los ratones sufrió regresión tumoral durante el periodo de observación (Figura 49).

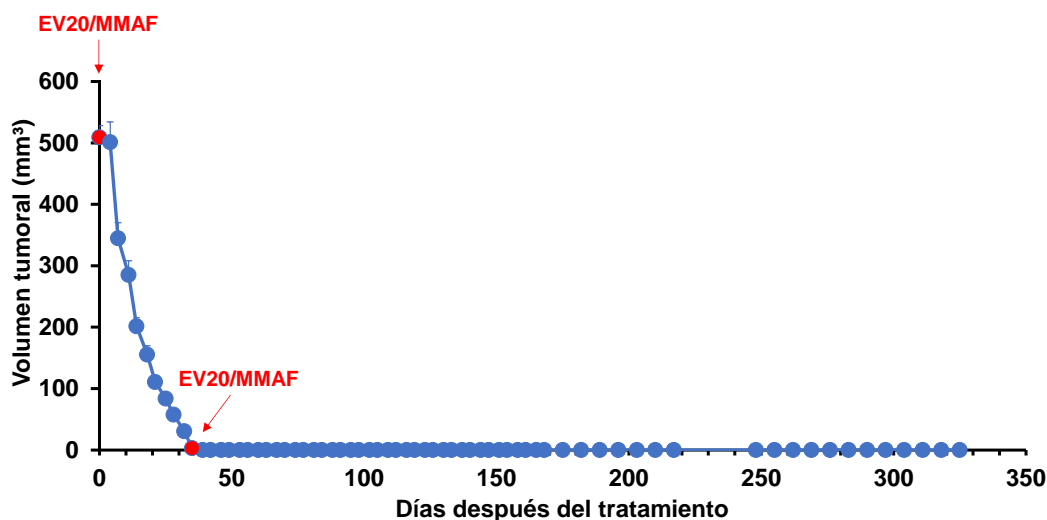


Figura 49. Seguimiento a largo plazo de los ratones con xenoinjertos de células BT-TDM1R#6. Monitorización a largo plazo de ratones inyectados con células BT-TDM1R#6 y tratados con EV20/MMAF (n=4). Cuando se indica, los ratones se trataron con EV20/MMAF. Los datos se representan como la media + SEM de las medidas del tamaño tumoral.

9.4.4.2. Efecto de EV20/MMAF en tumores de gran tamaño

Al igual que en los experimentos in vivo de las células BTRH y BTRH#10, se quiso analizar si EV20/MMAF es capaz de disminuir tumores de gran tamaño resistentes a T-DM1. Se trataron cuatro ratones con tumores en torno a 1000-1400 mm³ y en todos ellos se consiguió una regresión completa y duradera (Figura 50).

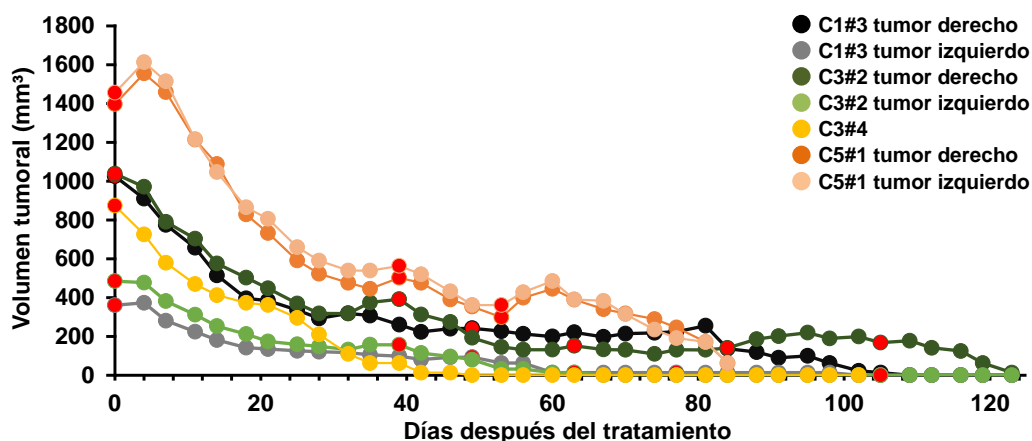


Figura 50. Tratamiento de tumores grandes (1000-1400 mm³) de células BT-TDM1R#6. Cuatro ratones con tumores grandes fueron tratados cuando se indica (círculo rojo) con 10 mg/kg de EV20/MMAF y seguidos a lo largo del tiempo.

DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1. EV20/MMAF, UN ANTICUERPO CONJUGADO A FÁRMACO, EN RESISTENCIA A TERAPIAS ANTI-HER2

Muchos estudios han demostrado el papel crucial de HER3 en el desarrollo tumoral y como causa principal de resistencia a diversas terapias antitumorales en cánceres humanos, incluido el cáncer de mama HER2⁺ (Amin *et al.*, 2010; Holbro *et al.*, 2003; Lee-Hoeflich *et al.*, 2008). De hecho, la señalización de HER3 juega un papel importante en el desarrollo de resistencias a terapias anti-HER y a quimioterapéuticos en este subtipo de cáncer (Garrett *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2007; Sergina *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010).

Se ha observado que la expresión de HER3 aumenta sustancialmente después de la exposición prolongada a trastuzumab en células de cáncer de mama (Narayan *et al.*, 2009). En dos modelos celulares derivados de xenoinjertos con resistencia adquirida a trastuzumab in vivo, se observó aumento de los niveles de activación de EGFR y HER3 (Ritter *et al.*, 2007). Recientemente se han publicado modelos de cáncer de mama HER2⁺ con resistencia adquirida a trastuzumab y T-DM1 que poseen una mayor expresión y activación de HER3 y de su ligando NRG1. Estos resultados fueron confirmados en una pequeña cohorte de pacientes con cáncer de mama HER2⁺. En las biopsias obtenidas antes y después del tratamiento con múltiples terapias anti-HER2, incluido T-DM1, se observó sobreexpresión de HER3 y NRG1 tras la progresión (Schwarz *et al.*, 2017). Aunque en nuestros modelos de resistencia secundaria a terapias anti-HER2 los niveles de HER3 son similares a la línea parental, éstos siguen siendo elevados. Por ello, nuestro grupo y otros autores han visto interesante atacar HER3 para vencer la resistencia a terapias antitumorales.

Los mAbs contra HER3 son el enfoque más directo para interferir con la señalización de HER3 y algunos de ellos están en desarrollo clínico (Kol *et al.*, 2014; R. Mishra *et al.*, 2018). A pesar de la actividad antitumoral observada en los ensayos clínicos, especialmente cuando los mAb HER3 se combinan con otras terapias, estos resultados no se han traducido en un beneficio clínico evidente, aunque la tolerabilidad fuese favorable (Gaborit *et al.*, 2016; Jacob *et al.*, 2018; X. Liu *et al.*, 2019). Por ello, no hay ningún anticuerpo monoclonal dirigido contra HER3 aprobado en la práctica clínica. Además de anticuerpos monoclonales, hay también varios anticuerpos biespecíficos anti-HER3 en ensayos clínicos (Gaborit *et al.*, 2016; Malm *et al.*, 2016).

Los ADCs presentan generalmente una mayor acción antitumoral que la versión desnuda del anticuerpo al combinar la acción específica del anticuerpo con efecto del agente citotóxico. El único ADC en estudio clínico dirigido contra HER3 es U3-1402 (también conocido como patritumab deruxtecan o HER3-DXd), compuesto por el anticuerpo anti-HER3 patritumab unido al inhibidor de la topoisomerasa I deruxtecan (Haratani *et al.*, 2020; Hashimoto *et al.*, 2019; Koganemaru *et al.*, 2019). Tras exitosos resultados preclínicos, U3-1402 entró en estudio de fase I/II para el tratamiento del cáncer de pulmón, cáncer colorectal y cáncer de mama metastásico. Los datos preliminares de estos estudios han sido alentadores, ya que se observaron respuestas parciales y reducción del tamaño tumoral acompañado de un perfil de seguridad y tolerabilidad favorable (Janne *et al.*, 2019; Kogawa *et al.*, 2018; Masuda *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2020).

Debido a estos precedentes, y al hecho de que HER3 se expresa con frecuencia en el cáncer de mama (Bieche *et al.*, 2003; Bobrow *et al.*, 1997; McIntyre *et al.*, 2010), en la primera parte de la presente Tesis Doctoral se decidió explorar el valor terapéutico del ADC EV20/MMAF dirigido a HER3 en cáncer de mama HER2+, incluyendo modelos de resistencia adquirida a terapias anti-HER2 (trastuzumab, lapatinib, neratinib y T-DM1). EV20/MMAF está compuesto por el anticuerpo monoclonal humanizado EV20 y el agente citotóxico MMAF (Capone *et al.*, 2018). EV20 es la versión humanizada del anticuerpo MP-RM-1, dirigido contra el ECD de HER3. Ambos anticuerpos inhiben la activación del receptor dependiente e independiente de ligando, promueven la degradación de HER3 e inhiben la dimerización de HER2-HER3. EV20 y MP-RM-1 tienen potentes efectos antitumorales *in vitro* e *in vivo* en varios modelos de cáncer de mama, páncreas, ovario, próstata y melanoma, incluyendo células tumorales obtenidas de efusiones de pacientes con cáncer de mama y cáncer de ovario (G. Sala *et al.*, 2013; Sala *et al.*, 2012). Se espera que EV20 tenga un efecto más amplio al bloquear la señalización de HER3 en comparación con otros mAbs anti-HER3 similares (como MM-121) que solo bloquean la activación de HER3 inducida por ligando (Schoeberl *et al.*, 2010; Schoeberl *et al.*, 2017; Schoeberl *et al.*, 2009). De hecho, en ensayos clínicos, MM-121 (o también conocido como seribantumab) se tolera bien y se combina de forma segura con varios fármacos, incluyendo terapias anti-hormonales, terapias dirigidas y quimioterapias, pero generalmente no mejora los resultados clínicos (Arnedos *et al.*, 2013; Cleary *et al.*, 2014; Cleary *et al.*, 2017; Higgins *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Sequist, Gray, *et al.*, 2019; Sequist, Janne, *et al.*, 2019). Por

ello, la inhibición dual de la señalización de HER3 por la acción de EV20 sumada a la citotoxicidad de MMAF, hacen a EV20/MMAF un buen candidato para estudios preclínicos.

En los primeros resultados, se observó la activación de HER3 en la línea BT474 y su línea derivada resistente a trastuzumab, BTRH. Además, muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama HER2⁺ confirmaron la presencia de HER3 en este subtipo tumoral. Estos datos confirman la importancia de HER3 en el desarrollo del cáncer de mama HER2⁺ y en la adquisición de resistencias a terapias anti-HER2. En un panel de células HER2⁺, EV20 provocó la disminución de los niveles de HER3 y pHER3 en la mayoría de los casos, confirmándose esta propiedad del anticuerpo (G. Sala *et al.*, 2013; Sala *et al.*, 2012). EV20/MMAF también induce degradación de HER3 en nuestros modelos de BT474 y BTRH. Lo mismo ocurre con patritumab y U3-1402, ambos inducen la degradación de HER3 (Hashimoto *et al.*, 2019). Por tanto, se confirma que el mecanismo de acción de EV20 está conservado en EV20/MMAF como ya se había demostrado anteriormente en otros modelos y en otras versiones de ADCs derivadas de EV20 (EV20-saponina y EV20-sss-vcMMAF) (Capone *et al.*, 2017; Capone *et al.*, 2018; D'Agostino *et al.*, 2021). Ambas versiones de ADCs han demostrado una fuerte actividad antitumoral en melanoma y cáncer de hígado y propiedades similares a las descritas en la presente Tesis Doctoral. Otros ADCs anti-HER3 también están siendo desarrollados a nivel preclínico por otros investigadores, como es el caso de MMAE-9F7-F11, con prometedores resultados en cáncer de páncreas (Bourillon *et al.*, 2019).

EV20/MMAF tuvo un potente efecto antiproliferativo sobre las células de cáncer de mama HER2⁺. Por el contrario, la adición del anticuerpo desnudo EV20 no afectó a la proliferación de estas células, confirmándose que la mera acción sobre HER3 es ineficaz desde el punto de vista terapéutico (Capone *et al.*, 2017). Además, MMAF libre tenía una acción antiproliferativa mucho menor que EV20/MMAF, lo que indica que la suma de EV20 y MMAF en el formato ADC aumenta de manera óptima la potencia con respecto a los fármacos individuales. Al igual ocurre con EV20-saponina, donde el ADC ejerce la acción antitumoral frente a la inactividad de los componentes de manera individual (Capone *et al.*, 2017). En células HER3⁺ de melanoma, MMAF libre mostró menos eficacia que EV20/MMAF (Capone *et al.*, 2018), confirmándose que la internalización del fármaco mediada por EV20 aumenta la actividad terapéutica de ambos agentes y además confirma la baja

capacidad de MMAF de atravesar la membrana plasmática (Doronina *et al.*, 2006). En el caso de U3-1402, el anticuerpo desnudo (patritumab) tampoco tiene efecto en las líneas HER2⁺ testadas, a excepción de MDA-MB-175VII. Sin embargo, el agente citotóxico libre muestra mayor acción que U3-1402 (Hashimoto *et al.*, 2019; Yonesaka *et al.*, 2019). De hecho, a la misma concentración nanomolar, DXd es más potente que MMAF. D'Amico y colaboradores observaron que el ADC anti-HER2 unido a un derivado de la antraciclina tenía mayor acción *in vivo* que el agente citotóxico libre, confirmando la importancia de la unión entre el anticuerpo y el agente citotóxico para el tratamiento dirigido (D'Amico *et al.*, 2019). Otros autores también han reportado una mayor acción antiproliferativa de un ADC anti-HER2 frente al agente citotóxico libre, en este caso un derivado de auristatina F (Woitok *et al.*, 2016). Apoyando esta observación, He y colaboradores reportaron una mayor acción de ADCs anti-HER2 y anti-EGFR frente a la acción de los agentes citotóxicos libres, en este caso MMAF y derivados (He *et al.*, 2019)

La acción del EV20/MMAF depende de la expresión de HER3, como lo demuestra su falta de actividad en las células que expresan de forma basal niveles bajos de HER3, o su acción antiproliferativa disminuida en las células en las que la expresión de HER3 se redujo genéticamente. La correlación entre los niveles de HER3 y la acción antiproliferativa de EV20/MMAF también apoyó la idea de que la acción de este ADC depende de los niveles de HER3. Sin embargo, el valor numérico de esta correlación sugiere que otros factores, además de HER3, dictan la sensibilidad a EV20/MMAF. Este es un hallazgo relevante ya que el uso terapéutico de EV20/MMAF dependerá de la identificación de tumores altamente sensibles al ADC. EV20-Sap mostró la misma dependencia de HER3 (Capone *et al.*, 2017). En el caso de U3-1402 también se observó una correlación inversa entre la viabilidad celular y la unión del ADC a la superficie celular, confirmándose la necesidad de la presencia del antígeno para la acción del ADC (Hashimoto *et al.*, 2019). Al igual que nuestros resultados, también se observó ausencia de efecto en células con bajos niveles de HER3 (MDA-MB-231) (Hashimoto *et al.*, 2019) y en células con silenciamiento genético de HER3 (Yonesaka *et al.*, 2019). U3-1402 también demostró su acción *in vivo* dependiente de HER3 en diferentes modelos con distintos niveles de expresión del receptor (Koganemaru *et al.*, 2019). Estos datos confirman que ambos ADCs tienen una actividad dependiente de los niveles de HER3. Además, igual que en el caso de EV20-Sap, la presencia de NRG no impide

la acción de EV20/MMAF en las células BT474 y BTRH, lo cual es importante desde el punto de vista clínico y terapéutico.

Un factor adicional que puede jugar un papel en la acción de EV20/MMAF se relaciona con su internalización y degradación. Nuestros análisis bioquímicos y de inmunofluorescencia indicaron que EV20/MMAF se internalizó rápidamente y alcanzó los lisosomas como ha sido previamente descrito tanto para EV20 como EV20/MMAF en otros modelos celulares (Capone *et al.*, 2018; Gianluca Sala *et al.*, 2013). La rápida internalización de los anticuerpos contra HER3 también ha sido observado con U3-1402, donde se confirmó que tienen una tasa de internalización más rápida que un anticuerpo anti-HER2 (Hashimoto *et al.*, 2019). En los lisosomas el ADC es degradado por la acción de las proteasas lisosomales generando fragmentos escindidos de EV20/MMAF capaces de moverse desde el lumen lisosómico al citosol, donde la carga útil citotóxica debería alterar la dinámica de los microtúbulos. De hecho, EV20/MMAF impidió el correcto ensamblaje de la maquinaria microtubular responsable de la progresión de las células a lo largo de la mitosis. Tal acción no solo afectó a la dinámica del ciclo celular, sino que también promovió la muerte celular a través del proceso de catástrofe mitótica, como se ha demostrado en otros trabajos con T-DM1 anteriormente publicados por el laboratorio (Montero *et al.*, 2015; Ríos-Luci *et al.*, 2017).

Los modelos in vivo derivados de células BT474 confirmaron la falta de eficacia de EV20 en nuestros modelos. Es relevante comentar que los estudios previos que mostraban que MP-RM-1 y EV20 pueden inducir un retraso en el crecimiento tumoral se basaron en un protocolo diferente que incluía la administración del anticuerpo desnudo dos veces por semana durante un período más prolongado (4-5 semanas) (G. Sala *et al.*, 2013; Sala *et al.*, 2012). Además, en esos estudios se administró EV20 a ratones con tumores mucho más pequeños que los utilizados en el presente estudio (100 mm³ frente a 500 mm³) y en uno de ellos a dosis más altas (20 mg/kg) (Sala *et al.*, 2012). En el caso de los tumores de ratones inyectados con células HCC1954, EV20 ejerció un efecto antiproliferativo visible. El hecho de que EV20 no afectó la proliferación de células HCC1954 in vitro, pero inhibió el crecimiento tumoral de células HCC1954 xenoinjertadas en ratones, sugiere que los factores presentes en el microambiente tisular pueden favorecer el crecimiento tumoral y sensibilizar al tratamiento con anticuerpos. En cualquier caso, la comparación del tratamiento de dosis única con EV20 o EV20/MMAF demostró el

efecto antitumoral in vivo superior del ADC en todos los modelos de resistencia primaria y secundaria a fármacos anti-HER2. Es importante destacar que EV20 in vivo no induce regresión tumoral en ninguno de los modelos analizados, únicamente retraso del crecimiento de los tumores en el modelo de HCC1954, como si es el caso de EV20/MMAF que posee una potente acción antitumoral. En el caso de U3-1402, también se ha reportado la falta de acción del anticuerpo desnudo (patritumab) in vivo frente a la fuerte actividad antitumoral del ADC (Hashimoto *et al.*, 2019; Koganemaru *et al.*, 2019). Estos resultados sugieren que la estrategia de inhibir la señalización de HER3 con un anticuerpo anti-HER3 puede no ser suficiente para inhibir el crecimiento tumoral, y van en línea con la escasa eficacia de los mAbs anti-HER3 en ensayos clínicos.

Un hallazgo relevante de este trabajo fue el fuerte efecto antitumoral de EV20/MMAF sobre las células resistentes a trastuzumab y a otras terapias anti-HER2. Tal acción abre la posibilidad de utilizar EV20/MMAF para combatir la resistencia a las estrategias anti-HER2 actualmente utilizadas en la clínica de los tumores HER2⁺. De hecho, en ratones implantados con células resistentes a trastuzumab, EV20/MMAF tuvo un fuerte efecto antitumoral. Además, es importante mencionar que EV20/MMAF provocó la regresión tumoral incluso de tumores grandes (800-1000 mm³), una posible causa de resistencia. Por otro lado, también es destacable la regresión completa y duradera obtenida después de una dosis única de 10 mg/kg de EV20/MMAF. Este mismo fenómeno fue observado en xenoinjertos de melanoma, confirmándose la eficacia y potencia de EV20/MMAF para promover largas respuestas antitumorales con una única dosis (Capone *et al.*, 2018). Además, en este mismo trabajo, observaron una acumulación de EV20/MMAF en los tumores, al igual que nosotros. La dosis más baja (3,3 mg/kg, dosis única) también provocó la regresión del tumor, pero en algunos ratones se observaron recaídas a lo largo del tiempo. Sin embargo, estos tumores todavía eran sensibles a dosis adicionales de EV20/MMAF. Dado que el tratamiento a 3,3 mg/kg presentó recidivas, se decidió evaluar si el tratamiento con 3,3 mg/kg del ADC cada tres semanas podría evitar dicho fenómeno. Efectivamente, se demostró que el tratamiento continuado durante prácticamente un año provocaba la regresión tumoral en todos los ratones tratados, sin recaídas. Estos datos, junto con la capacidad de ejercer una acción antitumoral en células resistentes a T-DM1, lapatinib o neratinib, e incluso el efecto de EV20/MMAF en células HER2⁺ sin resistencia, ofrecen atractivas posibilidades de utilizar este ADC anti-HER3 en la

clínica del cáncer HER2⁺, incluso más allá del cáncer de mama. De hecho, las terapias anti-HER2 como trastuzumab y T-DXd se utilizan para el tratamiento de tumores gástricos metastásicos HER2⁺. Será interesante explorar el valor de EV20/MMAF para la terapia de estos tumores. En este contexto, U3-1402 ha mostrado eficacia en modelos resistentes a TKIs dirigidos contra EGFR (gefitinib y osimertinib) (Yonesaka *et al.*, 2019). Cabe destacar que ambos modelos de resistencia presentaban mayores niveles de HER3 en superficie y que la exposición a los TKIs anti-EGFR aumentaba los niveles de HER3. Estos datos confirman el papel de HER3 en la resistencia adquirida a terapias anti-HER y la eficacia de usar ADCs anti-HER3 para vencer resistencias.

Además, la potente acción de EV20/MMAF sobre las células que expresan HER3 abre la posibilidad de extender su uso para la terapia de pacientes portadores de tumores oncogénicamente mutados en *ERBB3* (Jaiswal *et al.*, 2013; Kiavue *et al.*, 2020) o que puedan volverse resistentes a las terapias basadas en otros ADC anti-HER2 ó anti-HER3, como ocurre en el caso de T-DM1 y T-DXd. En este caso, T-DXd es efectivo en pacientes con tumores refractarios a terapias anti-HER2 previas, incluyendo T-DM1 (García-Alonso *et al.*, 2020; Modi *et al.*, 2020). Esto es un ejemplo del valor clínico de usar ADCs con diferentes cargas útiles pero dirigidas a la misma proteína de la superficie celular.

La inmunoterapia está demostrando ser una opción terapéutica eficaz en una variedad de cánceres, pero tiene un resultado terapéutico insuficiente (Chen & Mellman, 2017). Recientemente, se ha demostrado que U3-1402 sensibilizó a los tumores HER3⁺ al bloqueo generado por la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1, *programmed cell death protein 1*), mejorando la función e infiltración de las células inmunes innatas y adaptativas, lo que posteriormente sensibilizó al tumor a la inmunoterapia. Debido a esto, la combinación de este ADC y un anticuerpo anti-PD-1 inhibió significativamente el crecimiento tumoral, incluso en ratones refractarios a la terapia anti-PD-1. Además, se demostró que HER3 está frecuentemente expresado en pacientes con tumores sólidos resistentes al inhibidor de PD-1 (Haratani *et al.*, 2020). Esta observación abre la posibilidad de analizar si el ADC EV20/MMAF tendría esta misma propiedad, y de manera general si usar ADCs podría aumentar la sensibilidad a la inmunoterapia en cáncer de mama.

Vale la pena explorar todas estas posibles aplicaciones clínicas citadas anteriormente, una vez que se disponga de biomarcadores adecuados de

sensibilidad al ADC para la correcta selección de los pacientes. En general, la eficacia de una terapia dirigida se puede optimizar mediante el uso de biomarcadores predictivos y de seguimiento que definan la población con más probabilidades de beneficiarse del tratamiento. Dado al aumento de terapias dirigidas a HER3, tanto mAbs, ADCs como anticuerpos biespecíficos, en algunos ensayos clínicos de estas terapias se han analizado posibles biomarcadores para seleccionar la población de estudio y ver si aumenta la eficacia de la terapia. La proteína HER3 se ha postulado como un biomarcador en terapias anti-HER3 (Liu *et al.*, 2016). Por el contrario, otros ensayos clínicos no encontraron que el nivel de HER3 estuviera asociado con la respuesta clínica (Hill *et al.*, 2018; Mendell *et al.*, 2015; Schneeweiss *et al.*, 2018). El ARNm de *ERBB3* también podría ser un posible biomarcador, pero ninguno de los estudios clínicos que lo analizaron como posible biomarcador pudieron mostrar ningún beneficio clínico de las terapias dirigidas a HER3 en la población que expresa HER3 (Fayette *et al.*, 2016; Hill *et al.*, 2018; Jimeno *et al.*, 2016; Mendell *et al.*, 2015).

En un estudio reciente, todos los pacientes con reducción del tamaño tumoral expresaron tanto NRG como HER3 y mostraron una reducción de pHER3 con el tratamiento con CDX-3379, un mAb anti-HER3 (Duvvuri *et al.*, 2019). Otro estudio también informó de una disminución en pHER3 (y también a nivel total) en muestras de tumores pareadas (Reynolds *et al.*, 2017). Por lo tanto, pHER3 podría ser un biomarcador predictivo de la respuesta a la terapia anti-HER3, aunque la IHC para pHER3 a menudo no es fiable en muestras clínicas y puede no ser una forma precisa de predecir la respuesta.

El ARNm de *NRG* también se ha postulado como posible biomarcador para la terapia dirigida a HER3 (Higgins *et al.*, 2014; Holmes *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016; MacBeath *et al.*, 2014; Mendell *et al.*, 2015; Ocaña *et al.*, 2016; Pawel *et al.*, 2014; Schoeberl *et al.*, 2017; Sequist, Gray, *et al.*, 2019; Sequist *et al.*, 2014), aunque otros ensayos clínicos no pudieron reportar ninguna relación beneficiosa entre las terapias anti-HER3 y los niveles ARNm de *NRG* (Fayette *et al.*, 2016; Forster *et al.*, 2019; Hill *et al.*, 2018; Jimeno *et al.*, 2016; Meulendijks *et al.*, 2017; Paz-Arez *et al.*, 2017; Reynolds *et al.*, 2017; Schneeweiss *et al.*, 2018; Sequist, Janne, *et al.*, 2019). El nivel de HRG soluble en suero parece ser un biomarcador predictivo de la eficacia de patritumab más erlotinib en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (Yonesaka *et al.*, 2017).

Por tanto, en este capítulo se ha demostrado que dirigirse a HER3 de forma aislada con el anticuerpo monoclonal EV20 no es suficiente para inhibir completamente la señalización en cáncer de mama HER2⁺. En las células HER2⁺ con altos niveles de HER2 en la membrana plasmática y con activación de HER3 independiente de ligando, probablemente los mAbs no regulen HER3 a niveles suficientemente bajos y, por lo tanto, esta sea la causa de sus efectos mínimos sobre la viabilidad celular. Una mejor aproximación es la administración de agentes citotóxicos (como MMAF) a células cancerosas que expresan HER3 a través de ADCs, como se ha demostrado con el ADC anti-HER3 EV20/MMAF. De hecho, U3-1402 ha reportado prometedores resultados en ensayos clínicos, incluyendo estudios en cáncer de mama. Sin embargo, la falta de biomarcadores predictivos para identificar los pacientes susceptibles sigue siendo una barrera importante para el éxito de las terapias anti-HER3 en los ensayos clínicos en curso. En resumen, en este capítulo se ha caracterizado la acción de un novedoso ADC anti-HER3 (EV20/MMAF) en modelos in vitro e in vivo de resistencia a terapias anti-HER2 usadas en la clínica, obteniéndose una potente acción del mismo (Figura 51).

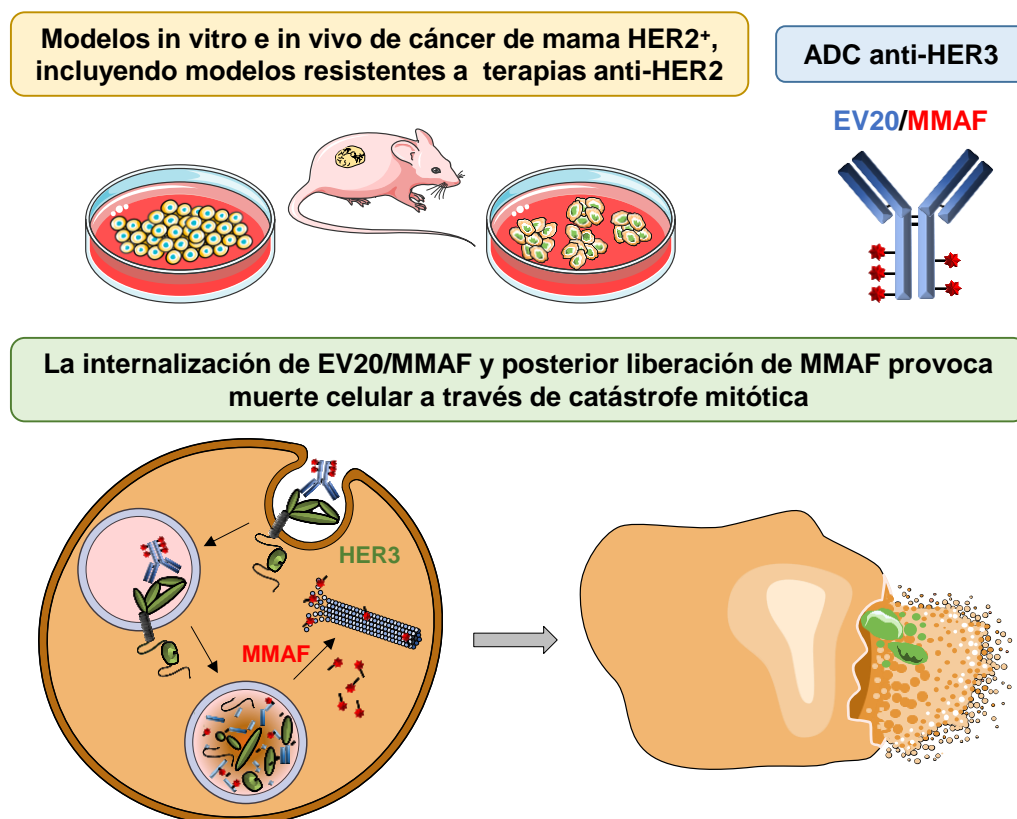


Figura 51. Representación de los modelos de trabajo, de las características de EV20/MMAF y de su mecanismo de acción. EV20/MMAF se une a HER3 en la superficie celular de las células HER2⁺. Su internalización y posterior degradación en los lisosomas provoca la liberación de MMAF que, al inhibir la polimerización de los microtúbulos, provoca la parada en fase G₂/M y posterior catástrofe mitótica, conduciendo a la muerte celular.

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 1. EV20/MMAF, UN ANTICUERPO CONJUGADO A FÁRMACO, EN RESISTENCIA A TERAPIAS ANTI-HER2

1. El receptor HER3 se expresa en modelos celulares de cáncer de mama HER2⁺ con resistencia primaria o secundaria a terapias dirigidas contra HER2.
2. EV20/MMAF, un ADC dirigido frente a HER3, ejerce una fuerte acción antiproliferativa en células HER2⁺ y en células resistentes a terapias anti-HER2.
3. La acción antitumoral de EV20/MMAF es causada por parada en fase G₂/M del ciclo celular y posterior catástrofe mitótica y muerte celular.
4. En ratones con xenoinjertos de células resistentes a trastuzumab o T-DM1, EV20/MMAF es capaz de provocar regresión tumoral completa y de larga duración.
5. La expresión de HER3 en modelos celulares resistentes a terapias anti-HER2, junto a la disponibilidad de ADCs frente a ese receptor, permiten el uso de estos fármacos para combatir la resistencia a terapias anti-HER2 convencionales.

BIBLIOGRAFÍA

- Abel, E. V., Basile, K. J., Kugel, C. H., Witkiewicz, A. K., Le, K., Amaravadi, R. K., Karakousis, G. C., Xu, X., Xu, W., & Schuchter, L. M. (2013). Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. *J Clin Invest*, 123(5), 2155-2168.
- Addo-Yobo, S. O., Straessle, J., Anwar, A., Donson, A. M., Kleinschmidt-Demasters, B., & Foreman, N. K. (2006). Paired overexpression of ErbB3 and Sox10 in pilocytic astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65(8), 769-775.
- Aghazadeh, S., & Yazdanparast, R. (2017). Activation of STAT3/HIF-1 α /Hes-1 axis promotes trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer cells via down-regulation of PTEN. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1861(8), 1970-1980.
- Agus, D. B., Akita, R. W., Fox, W. D., Lewis, G. D., Higgins, B., Pisacane, P. I., Lofgren, J. A., Tindell, C., Evans, D. P., & Maiese, K. (2002). Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer cell*, 2(2), 127-137.
- Alajati, A., Sausgruber, N., Aceto, N., Duss, S., Sarret, S., Voshol, H., Bonenfant, D., & Bentires-Alj, M. (2013). Mammary tumor formation and metastasis evoked by a HER2 splice variant. *Cancer Res*, 73(17), 5320-5327.
- Alley, S. C., Benjamin, D. R., Jeffrey, S. C., Okeley, N. M., Meyer, D. L., Sanderson, R. J., & Senter, P. D. (2008). Contribution of linker stability to the activities of anticancer immunoconjugates. *Bioconjug Chem*, 19(3), 759-765.
- Alroy, I., & Yarden, Y. (1997). The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett*, 410(1), 83-86.
- Amin, D. N., Campbell, M. R., & Moasser, M. M. (2010). The role of HER3, the unpretentious member of the HER family, in cancer biology and cancer therapeutics. *Semin Cell Dev Biol*, 21(9), 944-950.
- Amiri-Kordestani, L., Blumenthal, G. M., Xu, Q. C., Zhang, L., Tang, S. W., Ha, L., Weinberg, W. C., Chi, B., Candau-Chacon, R., Hughes, P., Russell, A. M., Miksinski, S. P., Chen, X. H., McGuinn, W. D., Palmby, T., Schrieber, S. J., Liu, Q., Wang, J., Song, P., ... Cortazar, P. (2014). FDA approval: ado-trastuzumab emtansine for the treatment of patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*, 20(17), 4436-4441.
- Amler, L., Makhija, S., & Januario, T. (2008). *Downregulation of HER3 may predict clinical benefit in ovarian cancer from pertuzumab, a HER2 dimerization-inhibiting antibody*. Paper presented at the Proceedings of the Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO'08).
- Appert-Collin, A., Hubert, P., Cremel, G., & Bennisroune, A. (2015). Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Front Pharmacol*, 6, 283.
- Arnedos, M., Denlinger, C. S., Harb, W. A., Rixe, O., Morris, J. C., Dy, G. K., Adjei, A. A., Pearlberg, J., Follows, S., & Czibere, A. G. (2013). A phase I study of MM-121 in combination with multiple anticancer therapies in patients with advanced solid tumors. In: American Society of Clinical Oncology.
- Arnould, L., Gelly, M., Penault-Llorca, F., Benoit, L., Bonnetain, F., Migeon, C., Cabaret, V., Fermeaux, V., Bertheau, P., Garnier, J., Jeannin, J. F., & Coudert, B. (2006). Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer*, 94(2), 259-267.
- Arteaga, C. L., & Engelman, J. A. (2014). ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 25(3), 282-303.

- Arteaga, C. L., Sliwkowski, M. X., Osborne, C. K., Perez, E. A., Puglisi, F., & Gianni, L. (2011). Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol*, 9(1), 16-32.
- Aurilio, G., Disalvatore, D., Pruneri, G., Bagnardi, V., Viale, G., Curigliano, G., Adamoli, L., Munzone, E., Sciandivasci, A., De Vita, F., Goldhirsch, A., & Nolè, F. (2014). A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases. *Eur J Cancer*, 50(2), 277-289.
- Austin, C. D., De Mazière, A. M., Pisacane, P. I., van Dijk, S. M., Eigenbrot, C., Sliwkowski, M. X., Klumperman, J., & Scheller, R. H. (2004). Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin. *Mol Biol Cell*, 15(12), 5268-5282.
- Ayala de la Peña, F., Andrés, R., Garcia-Sáenz, J. A., Manso, L., Margelí, M., Dalmau, E., Pernas, S., Prat, A., Servitja, S., & Ciruelos, E. (2019). SEOM clinical guidelines in early stage breast cancer (2018). *Clin Transl Oncol*, 21(1), 18-30.
- Baldassarre, T., Truesdell, P., & Craig, A. W. (2017). Endophilin A2 promotes HER2 internalization and sensitivity to trastuzumab-based therapy in HER2-positive breast cancers. *Breast Cancer Res*, 19(1), 1-15.
- Balko, J. M., Miller, T. W., Morrison, M. M., Hutchinson, K., Young, C., Rinehart, C., Sánchez, V., Jee, D., Polyak, K., & Prat, A. (2012). The receptor tyrosine kinase ErbB3 maintains the balance between luminal and basal breast epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(1), 221-226.
- Barbacci, E. G., Guarino, B. C., Stroh, J. G., Singleton, D. H., Rosnack, K. J., Moyer, J. D., & Andrews, G. C. (1995). The structural basis for the specificity of epidermal growth factor and heregulin binding. *J Biol Chem*, 270(16), 9585-9589.
- Barok, M., Joensuu, H., & Isola, J. (2014). Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res*, 16(2), 209.
- Barok, M., Le Joncour, V., Martins, A., Isola, J., Salmikangas, M., Laakkonen, P., & Joensuu, H. (2020). ARX788, a novel anti-HER2 antibody-drug conjugate, shows anti-tumor effects in preclinical models of trastuzumab emtansine-resistant HER2-positive breast cancer and gastric cancer. *Cancer Lett*, 473, 156-163.
- Barok, M., Tanner, M., Köninki, K., & Isola, J. (2011). Trastuzumab-DM1 causes tumour growth inhibition by mitotic catastrophe in trastuzumab-resistant breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res*, 13(2), R46.
- Baselga, J. (2002). A new anti-ErbB2 strategy in the treatment of cancer: prevention of ligand-dependent ErbB2 receptor heterodimerization. *Cancer cell*, 2(2), 93-95.
- Baselga, J., Albanell, J., Molina, M. A., & Arribas, J. (2001). Mechanism of action of trastuzumab and scientific update. *Semin Oncol*, 28(5 Suppl 16), 4-11.
- Baselga, J., Cortés, J., Kim, S. B., Im, S. A., Hegg, R., Im, Y. H., Roman, L., Pedrini, J. L., Pienkowski, T., Knott, A., Clark, E., Benyunes, M. C., Ross, G., & Swain, S. M. (2012). Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 366(2), 109-119.
- Baulida, J., Kraus, M. H., Alimandi, M., Di Fiore, P. P., & Carpenter, G. (1996). All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem*, 271(9), 5251-5257.
- Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C., & Corvaia, N. (2017). Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov*, 16(5), 315-337.

- Berger, M. B., Mendrola, J. M., & Lemmon, M. A. (2004). ErbB3/HER3 does not homodimerize upon neuregulin binding at the cell surface. *FEBS Lett*, 569(1-3), 332-336.
- Berns, K., Horlings, H. M., Hennessy, B. T., Madiredjo, M., Hijmans, E. M., Beelen, K., Linn, S. C., Gonzalez-Angulo, A. M., Stemke-Hale, K., Hauptmann, M., Beijersbergen, R. L., Mills, G. B., van de Vijver, M. J., & Bernards, R. (2007). A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*, 12(4), 395-402.
- Bertrán, A. S. (2020). Cáncer de mama. <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-mama>
- Bezler, M., Hengstler, J. G., & Ullrich, A. (2012). Inhibition of doxorubicin-induced HER3-PI3K-AKT signalling enhances apoptosis of ovarian cancer cells. *Mol Oncol*, 6(5), 516-529.
- Bieche, I., Onody, P., Tozlu, S., Driouch, K., Vidaud, M., & Lidereau, R. (2003). Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas. *Int J Cancer*, 106(5), 758-765.
- Blackwell, K. L., Burstein, H. J., Storniolo, A. M., Rugo, H. S., Sledge, G., Aktan, G., Ellis, C., Florance, A., Vukelja, S., & Bischoff, J. (2012). Overall survival benefit with lapatinib in combination with trastuzumab for patients with human epidermal growth factor receptor 2–positive metastatic breast cancer: final results from the EGF104900 study. *J Clin Oncol*, 30(21), 2585-2592.
- Blobel, C. P. (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(1), 32-43.
- Blows, F. M., Driver, K. E., Schmidt, M. K., Broeks, A., Van Leeuwen, F. E., Wesseling, J., Cheang, M. C., Gelmon, K., Nielsen, T. O., & Blomqvist, C. (2010). Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med*, 7(5), e1000279.
- Bobrow, L. G., Millis, R. R., Happerfield, L. C., & Gullick, W. J. (1997). c-erbB-3 protein expression in ductal carcinoma in situ of the breast. *Eur J Cancer*, 33(11), 1846-1850.
- Bon, G., Pizzuti, L., Laquintana, V., Loria, R., Porru, M., Marchiò, C., Krasniqi, E., Barba, M., Maugeri-Saccà, M., Gamucci, T., Berardi, R., Livi, L., Ficorella, C., Natoli, C., Cortesi, E., Generali, D., La Verde, N., Cassano, A., Bria, E., ... Vici, P. (2020). Loss of HER2 and decreased T-DM1 efficacy in HER2 positive advanced breast cancer treated with dual HER2 blockade: the SePHER Study. *J Exp Clin Cancer Res*, 39(1), 279.
- Bourillon, L., Bourgier, C., Gaborit, N., Garambois, V., Llès, E., Zampieri, A., Ogier, C., Jarlier, M., Radosevic-Robin, N., & Orsetti, B. (2019). An auristatin-based antibody-drug conjugate targeting HER3 enhances the radiation response in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 145(7), 1838-1851.
- Brand, T. M., Hartmann, S., Bholá, N. E., Peyser, N. D., Li, H., Zeng, Y., Wechsler, E. I., Ranall, M. V., Bandyopadhyay, S., & Duvvuri, U. (2017). Human papillomavirus regulates HER3 expression in head and neck cancer: implications for targeted HER3 therapy in HPV+ patients. *Clin Cancer Res*, 23(12), 3072-3083.
- Brenton, J. D., Carey, L. A., Ahmed, A. A., & Caldas, C. (2005). Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol*, 23(29), 7350-7360.
- Burden, S., & Yarden, Y. (1997). Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron*, 18(6), 847-855.

- Burgess, A. W. (2008). EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth factors*, 26(5), 263-274.
- Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. X., Ward, C. W., & Yokoyama, S. (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*, 12(3), 541-552.
- Burris, H. A., 3rd, Rugo, H. S., Vukelja, S. J., Vogel, C. L., Borson, R. A., Limentani, S., Tan-Chiu, E., Krop, I. E., Michaelson, R. A., Girish, S., Amler, L., Zheng, M., Chu, Y. W., Klencke, B., & O'Shaughnessy, J. A. (2011). Phase II study of the antibody drug conjugate trastuzumab-DM1 for the treatment of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive breast cancer after prior HER2-directed therapy. *J Clin Oncol*, 29(4), 398-405.
- Canonici, A., Gijsen, M., Mullooly, M., Bennett, R., Bouguern, N., Pedersen, K., O'Brien, N. A., Roxanis, I., Li, J. L., Bridge, E., Finn, R., Siamon, D., McGowan, P., Duffy, M. J., O'Donovan, N., Crown, J., & Kong, A. (2013). Neratinib overcomes trastuzumab resistance in HER2 amplified breast cancer. *Oncotarget*, 4(10), 1592-1605.
- Cao, Z., Wu, X., Yen, L., Sweeney, C., & Carraway, K. L., 3rd. (2007). Neuregulin-induced ErbB3 downregulation is mediated by a protein stability cascade involving the E3 ubiquitin ligase Nrpd1. *Mol Cell Biol*, 27(6), 2180-2188.
- Capone, E., Giansanti, F., Ponziani, S., Lamolinara, A., Iezzi, M., Cimini, A., Angelucci, F., La Sorda, R., De Laurenzi, V., & Natali, P. G. (2017). EV20-Sap, a novel anti-HER-3 antibody-drug conjugate, displays promising antitumor activity in melanoma. *Oncotarget*, 8(56), 95412.
- Capone, E., Lamolinara, A., D'Agostino, D., Rossi, C., De Laurenzi, V., Iezzi, M., Iacobelli, S., & Sala, G. (2018). EV20-mediated delivery of cytotoxic auristatin MMAF exhibits potent therapeutic efficacy in cutaneous melanoma. *J Control Release*, 277, 48-56.
- Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M. A., Tse, C. K., Edmiston, S., Deming, S. L., Geradts, J., Cheang, M. C., Nielsen, T. O., Moorman, P. G., Earp, H. S., & Millikan, R. C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Jama*, 295(21), 2492-2502.
- Castagnoli, L., Ghedini, G. C., Koschorke, A., Triulzi, T., Dugo, M., Gasparini, P., Casalini, P., Palladini, A., Iezzi, M., Lamolinara, A., Lollini, P. L., Nanni, P., Chiodoni, C., Tagliabue, E., & Pupa, S. M. (2017). Pathobiological implications of the d16HER2 splice variant for stemness and aggressiveness of HER2-positive breast cancer. *Oncogene*, 36(12), 1721-1732.
- Castagnoli, L., Iezzi, M., Ghedini, G. C., Ciravolo, V., Marzano, G., Lamolinara, A., Zappasodi, R., Gasparini, P., Campiglio, M., Amici, A., Chiodoni, C., Palladini, A., Lollini, P. L., Triulzi, T., Menard, S., Nanni, P., Tagliabue, E., & Pupa, S. M. (2014). Activated d16HER2 homodimers and SRC kinase mediate optimal efficacy for trastuzumab. *Cancer Res*, 74(21), 6248-6259.
- Castagnoli, L., Ladomery, M., Tagliabue, E., & Pupa, S. M. (2019). The d16HER2 Splice Variant: A Friend or Foe of HER2-Positive Cancers? *Cancers (Basel)*, 11(7).
- Castiglioni, F., Tagliabue, E., Campiglio, M., Pupa, S. M., Balsari, A., & Ménard, S. (2006). Role of exon-16-deleted HER2 in breast carcinomas. *Endocr Relat Cancer*, 13(1), 221-232.
- Chalhoub, N., & Baker, S. J. (2009). PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol*, 4, 127-150.

- Chan, A., Delalogue, S., Holmes, F. A., Moy, B., Iwata, H., Harvey, V. J., Robert, N. J., Silovski, T., Gokmen, E., von Minckwitz, G., Ejlertsen, B., Chia, S. K. L., Mansi, J., Barrios, C. H., Gnant, M., Buyse, M., Gore, I., Smith, J., 2nd, Harker, G., ... Martin, M. (2016). Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer (ExteNET): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, *17*(3), 367-377.
- Chari, R. V. (2008). Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. *Acc Chem Res*, *41*(1), 98-107.
- Chari, R. V., Miller, M. L., & Widdison, W. C. (2014). Antibody-drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*, *53*(15), 3796-3827.
- Cheang, M. C., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P. S., Parker, J. S., Perou, C. M., Ellis, M. J., & Nielsen, T. O. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, *101*(10), 736-750.
- Chen, D. S., & Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, *541*(7637), 321-330.
- Chen, H., Lin, Z., Arnst, K. E., Miller, D. D., & Li, W. (2017). Tubulin Inhibitor-Based Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules*, *22*(8).
- Cho, H. S., & Leahy, D. J. (2002). Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science*, *297*(5585), 1330-1333.
- Chou, J. L., Huang, R. L., Shay, J., Chen, L. Y., Lin, S. J., Yan, P. S., Chao, W. T., Lai, Y. H., Lai, Y. L., Chao, T. K., Lee, C. I., Tai, C. K., Wu, S. F., Nephew, K. P., Huang, T. H., Lai, H. C., & Chan, M. W. (2015). Hypermethylation of the TGF- β target, ABCA1 is associated with poor prognosis in ovarian cancer patients. *Clin Epigenetics*, *7*(1), 1.
- Chung, Y.-C., Chang, C.-M., Wei, W.-C., Chang, T.-W., Chang, K.-J., & Chao, W.-T. (2018). Metformin-induced caveolin-1 expression promotes T-DM1 drug efficacy in breast cancer cells. *Sci Rep*, *8*(1), 1-9.
- Chung, Y.-C., Kuo, J.-F., Wei, W.-C., Chang, K.-J., & Chao, W.-T. (2015). Caveolin-1 dependent endocytosis enhances the chemosensitivity of HER-2 positive breast cancer cells to trastuzumab emtansine (T-DM1). *PLoS One*, *10*(7), e0133072.
- Ciardiello, F., Kim, N., Saeki, T., Dono, R., Persico, M. G., Plowman, G. D., Garrigues, J., Radke, S., Todaro, G. J., & Salomon, D. S. (1991). Differential expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*(17), 7792-7796.
- CIMA. Centro de información online de medicamentos de la AEMPS - CIMA. <https://cima.aemps.es/cima/publico/home.html>
- Cleary, J. M., McRee, A. J., O'Neil, B. H., Sharma, S., Pearlberg, J., Manoli, S., Kubasek, W. L., & Korn, W. M. (2014). A phase 1 study of MM-121 (a fully human monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor family member ErbB3) in combination with cetuximab and irinotecan in patients with advanced cancers. In: American Society of Clinical Oncology.
- Cleary, J. M., McRee, A. J., Shapiro, G. I., Tolaney, S. M., O'Neil, B. H., Kearns, J. D., Mathews, S., Nering, R., MacBeath, G., & Czibere, A. (2017). A phase 1 study combining the HER3 antibody seribantumab (MM-121) and cetuximab with and without irinotecan. *Invest New Drugs*, *35*(1), 68-78.
- Cocco, E., Lopez, S., Santin, A. D., & Scaltriti, M. (2019). Prevalence and role of HER2 mutations in cancer. *Pharmacol Ther*, *199*, 188-196.

- Cohen, S., Fava, R. A., & Sawyer, S. T. (1982). Purification and characterization of epidermal growth factor receptor/protein kinase from normal mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *79*(20), 6237-6241.
- Cooley, S., Burns, L. J., Repka, T., & Miller, J. S. (1999). Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Exp Hematol*, *27*(10), 1533-1541.
- Cornolti, G., Ungari, M., Morassi, M. L., Facchetti, F., Rossi, E., Lombardi, D., & Nicolai, P. (2007). Amplification and overexpression of HER2/neu gene and HER2/neu protein in salivary duct carcinoma of the parotid gland. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, *133*(10), 1031-1036.
- Corti, C., & Criscitiello, C. (2021). Tucatinib approval by EMA expands options for HER2-positive locally advanced or metastatic breast cancer. *ESMO open*, *6*(2).
- Coussens, L., Yang-Feng, T. L., Liao, Y.-C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P. H., Libermann, T. A., Schlessinger, J., & Francke, U. (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, *230*(4730), 1132-1139.
- Cuello, M., Ettenberg, S. A., Clark, A. S., Keane, M. M., Posner, R. H., Nau, M. M., Dennis, P. A., & Lipkowitz, S. (2001). Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2. *Cancer Res*, *61*(12), 4892-4900.
- D'Agostino, D., Gentile, R., Ponziani, S., Di Vittorio, G., Dituri, F., Giannelli, G., Rossi, C., Marzullo, L., Giansanti, F., & De Laurenzi, V. (2021). EV20-sss-vc/MMAF, an HER-3 targeting antibody-drug conjugate displays antitumor activity in liver cancer. *Oncol Rep*, *45*(2), 776-785.
- D'Amico, L., Menzel, U., Prummer, M., Müller, P., Buchi, M., Kashyap, A., Haessler, U., Yermanos, A., Gèbleux, R., Briendl, M., Hell, T., Wolter, F. I., Beerli, R. R., Truxova, I., Radek, Š., Vljajnic, T., Grawunder, U., Reddy, S., & Zippelius, A. (2019). A novel anti-HER2 anthracycline-based antibody-drug conjugate induces adaptive anti-tumor immunity and potentiates PD-1 blockade in breast cancer. *J Immunother Cancer*, *7*(1), 16.
- Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., & Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*, *5*(10), 2929.
- Deeks, E. D. (2017). Neratinib: First Global Approval. *Drugs*, *77*(15), 1695-1704.
- Di Fiore, P. P., Pierce, J. H., Kraus, M. H., Segatto, O., King, C. R., & Aaronson, S. A. (1987). erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science*, *237*(4811), 178-182.
- Doronina, S. O., Mendelsohn, B. A., Bovee, T. D., Cervený, C. G., Alley, S. C., Meyer, D. L., Oflazoglu, E., Toki, B. E., Sanderson, R. J., Zabinski, R. F., Wahl, A. F., & Senter, P. D. (2006). Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity. *Bioconjug Chem*, *17*(1), 114-124.
- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., & Waterfield, M. (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*, *307*(5951), 521-527.
- Du, C., Yi, X., Liu, W., Han, T., Liu, Z., Ding, Z., Zheng, Z., Piao, Y., Yuan, J., Han, Y., Xie, M., & Xie, X. (2014). MTDH mediates trastuzumab resistance in HER2 positive breast cancer by decreasing PTEN expression through an NFκB-dependent pathway. *BMC Cancer*, *14*, 869.

- Duan, L., Miura, Y., Dimri, M., Majumder, B., Dodge, I. L., Reddi, A. L., Ghosh, A., Fernandes, N., Zhou, P., Mullane-Robinson, K., Rao, N., Donoghue, S., Rogers, R. A., Bowtell, D., Naramura, M., Gu, H., Band, V., & Band, H. (2003). Cbl-mediated ubiquitylation is required for lysosomal sorting of epidermal growth factor receptor but is dispensable for endocytosis. *J Biol Chem*, 278(31), 28950-28960.
- Duvvuri, U., George, J., Kim, S., Alvarado, D., Neumeister, V. M., Chenna, A., Gedrich, R., Hawthorne, T., LaVallee, T., & Grandis, J. R. (2019). Molecular and clinical activity of CDX-3379, an anti-ErbB3 monoclonal antibody, in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res*, 25(19), 5752-5758.
- Endo, Y., Shen, Y., Youssef, L. A., Mohan, N., & Wu, W. J. (2018). T-DM1-resistant cells gain high invasive activity via EGFR and integrin cooperated pathways. *MAbs*, 10(7), 1003-1017.
- Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J. O., Lindeman, N., Gale, C.-M., Zhao, X., & Christensen, J. (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*, 316(5827), 1039-1043.
- Erickson, H. K., Park, P. U., Widdison, W. C., Kovtun, Y. V., Garrett, L. M., Hoffman, K., Lutz, R. J., Goldmacher, V. S., & Blättler, W. A. (2006). Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing. *Cancer Res*, 66(8), 4426-4433.
- Erjala, K., Sundvall, M., Junttila, T. T., Zhang, N., Savisalo, M., Mali, P., Kulmala, J., Pulkkinen, J., Grenman, R., & Elenius, K. (2006). Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res*, 12(13), 4103-4111.
- Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J. A., & Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*, 38(6), 698-707.
- Fayette, J., Wirth, L., Oprean, C., Udrea, A., Jimeno, A., Rischin, D., Nutting, C., Harari, P. M., Csoszi, T., & Cernea, D. (2016). Randomized phase II study of duligotuzumab (MEHD7945A) vs. cetuximab in squamous cell carcinoma of the head and neck (MEHGAN Study). *Front Oncol*, 6, 232.
- Feng, S.-M., Muraoka-Cook, R. S., Hunter, D., Sandahl, M. A., Caskey, L. S., Miyazawa, K., Atfi, A., & Earp III, H. S. (2009). The E3 ubiquitin ligase WWP1 selectively targets HER4 and its proteolytically derived signaling isoforms for degradation. *Mol Cell Biol*, 29(3), 892.
- Ferlay J, L. M., Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>, accessed [08 April 2021].
- Forster, M. D., Dillon, M. T., Kocsis, J., Remenár, É., Pajkos, G., Rolland, F., Greenberg, J., & Harrington, K. J. (2019). Patritumab or placebo, with cetuximab plus platinum therapy in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: A randomised phase II study. *Eur J Cancer*, 123, 36-47.
- Foulkes, W. D., Brunet, J. S., Stefansson, I. M., Straume, O., Chappuis, P. O., Bégin, L. R., Hamel, N., Goffin, J. R., Wong, N., Trudel, M., Kapusta, L., Porter, P., & Akslén, L. A. (2004). The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Cancer Res*, 64(3), 830-835.

- Fragomeni, S. M., Sciallis, A., & Jeruss, J. S. (2018). Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*, 27(1), 95-120.
- Frederick, L., Wang, X. Y., Eley, G., & James, C. D. (2000). Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res*, 60(5), 1383-1387.
- Friess, H., Yamanaka, Y., Kobrin, M. S., Do, D. A., Büchler, M., & Korc, M. (1995). Enhanced erbB-3 expression in human pancreatic cancer correlates with tumor progression. *Clin Cancer Res*, 1(11), 1413-1420.
- Frogne, T., Benjaminsen, R. V., Sonne-Hansen, K., Sorensen, B. S., Nexø, E., Laenkholm, A.-V., Rasmussen, L. M., Riese, D. J., de Cremoux, P., & Stenvang, J. (2009). Activation of ErbB3, EGFR and Erk is essential for growth of human breast cancer cell lines with acquired resistance to fulvestrant. *Breast Cancer Res Treat*, 114(2), 263-275.
- Frolov, A., Schuller, K., Tzeng, C.-W. D., Cannon, E. E., Ku, B. C., Howard, J. H., Vickers, S. M., Heslin, M. J., Buchsbaum, D. J., & Arnoletti, J. P. (2007). ErbB3 expression and dimerization with EGFR influence pancreatic cancer cell sensitivity to erlotinib. *Cancer Biol Ther*, 6(4), 548-554.
- Gaborit, N., Lindzen, M., & Yarden, Y. (2016). Emerging anti-cancer antibodies and combination therapies targeting HER3/ERBB3. *Hum Vaccin Immunother*, 12(3), 576-592.
- Gandullo-Sánchez, L., Ocaña, A., & Pandiella, A. (2021). Generation of Antibody-Drug Conjugate Resistant Models. *Cancers*, 13(18), 4631.
- García-Alonso, S., Ocaña, A., & Pandiella, A. (2018). Resistance to Antibody-Drug Conjugates. *Cancer Res*, 78(9), 2159-2165.
- García-Alonso, S., Ocaña, A., & Pandiella, A. (2020). Trastuzumab Emtansine: Mechanisms of Action and Resistance, Clinical Progress, and Beyond. *Trends Cancer*, 6(2), 130-146.
- Garrett, J. T., Olivares, M. G., Rinehart, C., Granja-Ingram, N. D., Sánchez, V., Chakrabarty, A., Dave, B., Cook, R. S., Pao, W., & McKinely, E. (2011). Transcriptional and posttranslational up-regulation of HER3 (ErbB3) compensates for inhibition of the HER2 tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(12), 5021-5026.
- Geyer, C. E., Forster, J., Lindquist, D., Chan, S., Romieu, C. G., Pienkowski, T., Jagiello-Gruszfeld, A., Crown, J., Chan, A., & Kaufman, B. (2006). Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*, 355(26), 2733-2743.
- Ghosh, R., Narasanna, A., Wang, S. E., Liu, S., Chakrabarty, A., Balko, J. M., González-Angulo, A. M., Mills, G. B., Penuel, E., Winslow, J., Sperinde, J., Dua, R., Pidaparathi, S., Mukherjee, A., Leitzel, K., Kostler, W. J., Lipton, A., Bates, M., & Arteaga, C. L. (2011). Trastuzumab has preferential activity against breast cancers driven by HER2 homodimers. *Cancer Res*, 71(5), 1871-1882.
- Gullick, W. J. (2001). The Type 1 growth factor receptors and their ligands considered as a complex system. *Endocr Relat Cancer*, 8(2), 75-82.
- Hamblett, K. J., Jacob, A. P., Gurgel, J. L., Tometsko, M. E., Rock, B. M., Patel, S. K., Milburn, R. R., Siu, S., Ragan, S. P., Rock, D. A., Borths, C. J., O'Neill, J. W., Chang, W. S., Weidner, M. F., Bio, M. M., Quon, K. C., & Fanslow, W. C. (2015). SLC46A3 Is Required to Transport Catabolites of Noncleavable Antibody Maytansine Conjugates from the Lysosome to the Cytoplasm. *Cancer Res*, 75(24), 5329-5340.

- Han, W., Sfondouris, M. E., & Jones, F. E. (2016). Direct coupling of the HER4 intracellular domain (4ICD) and STAT5A signaling is required to induce mammary epithelial cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 7, 323-327.
- Haratani, K., Yonesaka, K., Takamura, S., Maenishi, O., Kato, R., Takegawa, N., Kawakami, H., Tanaka, K., Hayashi, H., & Takeda, M. (2020). U3-1402 sensitizes HER3-expressing tumors to PD-1 blockade by immune activation. *J Clin Invest*, 130(1), 374-388.
- Harrison, P. T., Vyse, S., & Huang, P. H. (2020). Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Semin Cancer Biol*, 61, 167-179.
- Hashimoto, Y., Koyama, K., Kamai, Y., Hirotani, K., Ogitani, Y., Zembutsu, A., Abe, M., Kaneda, Y., Maeda, N., & Shiose, Y. (2019). A Novel HER3-Targeting Antibody-Drug Conjugate, U3-1402, Exhibits Potent Therapeutic Efficacy through the Delivery of Cytotoxic Payload by Efficient Internalization. *Clin Cancer Res*, 25(23), 7151-7161.
- He, K., Xu, J., Liang, J., Jiang, J., Tang, M., Ye, X., Zhang, Z., Zhang, L., Fu, B., Li, Y., Bai, C., Zhang, L., & Tao, W. (2019). Discovery of A Novel EGFR-Targeting Antibody-Drug Conjugate, SHR-A1307, for the Treatment of Solid Tumors Resistant or Refractory to Anti-EGFR Therapies. *Mol Cancer Ther*, 18(6), 1104-1114.
- Hellyer, N. J., Cheng, K., & Koland, J. G. (1998). ErbB3 (HER3) interaction with the p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J*, 333 (Pt 3)(Pt 3), 757-763.
- Hernández-Sotomayor, S. M., & Carpenter, G. (1992). Epidermal growth factor receptor: elements of intracellular communication. *J Membr Biol*, 128(2), 81-89.
- Higgins, M. J., Doyle, C., Paepke, S., Azaro, A., Martin, M., Semiglazov, V., Smirnova, I., Krasnozhan, D., Manikhas, A., & Harb, W. A. (2014). A randomized, double-blind phase II trial of exemestane plus MM-121 (a monoclonal antibody targeting ErbB3) or placebo in postmenopausal women with locally advanced or metastatic ER+/PR+, HER2-negative breast cancer. In: American Society of Clinical Oncology.
- Hill, A. G., Findlay, M. P., Burge, M. E., Jackson, C., Alfonso, P. G., Samuel, L., Ganju, V., Karthaus, M., Amatu, A., & Jeffery, M. (2018). Phase II study of the dual EGFR/HER3 inhibitor duligotuzumab (MEHD7945A) versus cetuximab in combination with FOLFIRI in second-line RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 24(10), 2276-2284.
- Holbro, T., Beerli, R. R., Maurer, F., Koziczak, M., Barbas, C. F., & Hynes, N. E. (2003). The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(15), 8933-8938.
- Holmes, F. A., McIntyre, K. J., Krop, I. E., Osborne, C. R., Smith II, J. W., Modiano, M. R., Gupta, M., Downey, L. B., Nanda, R., Saleh, M. N., Young, J. R., Horgan, K. E., Kubasek, W., MacBeath, G., Danso, M. A., & O'Shaughnessy, J. A. (2015). Abstract P3-11-03: A randomized, phase 2 trial of preoperative MM-121 with paclitaxel in triple negative (TN) and hormone receptor (HR) positive, HER2-negative breast cancer. *Cancer Res*, 75(9 Supplement), P3-11-03-P13-11-03.
- Hommelgaard, A. M., Lerdrup, M., & van Deurs, B. (2004). Association with membrane protrusions makes ErbB2 an internalization-resistant receptor. *Mol Biol Cell*, 15(4), 1557-1567.
- Howe, L. R., & Brown, P. H. (2011). Targeting the HER/EGFR/ErbB family to prevent breast cancer. *Cancer Prev Res*, 4(8), 1149-1157.
- Huang, X., Gao, L., Wang, S., McManaman, J. L., Thor, A. D., Yang, X., Esteva, F. J., & Liu, B. (2010). Heterotrimerization of the growth factor receptors erbB2, erbB3, and insulin-like growth factor-i receptor in breast cancer cells resistant to herceptin. *Cancer Res*, 70(3), 1204-1214.

- Huang, Z., Choi, B., Mujoo, K., Fan, X., Fa, M., Mukherjee, S., Owiti, N., Zhang, N., & An, Z. (2015). The E3 ubiquitin ligase NEDD4 negatively regulates HER3/ErbB3 level and signaling. *Oncogene*, *34*(9), 1105-1115.
- Humphrey, P. A., Gangarosa, L. M., Wong, A. J., Archer, G. E., Lund-Johansen, M., Bjerkgvig, R., Laerum, O. D., Friedman, H. S., & Bigner, D. D. (1991). Deletion-mutant epidermal growth factor receptor in human gliomas: effects of type II mutation on receptor function. *Biochem Biophys Res Commun*, *178*(3), 1413-1420.
- Hunter, F. W., Barker, H. R., Lipert, B., Rothé, F., Gebhart, G., Piccart-Gebhart, M. J., Sotiriou, C., & Jamieson, S. M. (2020). Mechanisms of resistance to trastuzumab emtansine (T-DM1) in HER2-positive breast cancer. *Br J Cancer*, *122*(5), 603-612.
- Hunter, T., Ling, N., & Cooper, J. A. (1984). Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. *Nature*, *311*(5985), 480-483.
- Hurvitz, S. A., Martin, M., Jung, K. H., Huang, C. S., Harbeck, N., Valero, V., Stroyakovskiy, D., Wildiers, H., Campone, M., Boileau, J. F., Fasching, P. A., Afenjar, K., Spera, G., Lopez-Valverde, V., Song, C., Trask, P., Boulet, T., Sparano, J. A., Symmans, W. F., Thompson, A. M., & Slamon, D. (2019). Neoadjuvant Trastuzumab Emtansine and Pertuzumab in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: Three-Year Outcomes From the Phase III KRISTINE Study. *J Clin Oncol*, *37*(25), 2206-2216.
- Ishii, K., Morii, N., & Yamashiro, H. (2019). Pertuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer: an evidence-based review of its safety, efficacy, and place in therapy. *Core Evid*, *14*, 51-70.
- Islam, S. S., Uddin, M., Noman, A. S. M., Akter, H., Dity, N. J., Basiruzzman, M., Uddin, F., Ahsan, J., Anoor, S., Alaiya, A. A., Al-Alwan, M., Yeger, H., & Farhat, W. A. (2019). Antibody-drug conjugate T-DM1 treatment for HER2+ breast cancer induces ROR1 and confers resistance through activation of Hippo transcriptional coactivator YAP1. *EBioMedicine*, *43*, 211-224.
- Izumi, Y., Xu, L., di Tomaso, E., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2002). Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature*, *416*(6878), 279-280.
- Jacob, W., James, I., Hasmann, M., & Weisser, M. (2018). Clinical development of HER3-targeting monoclonal antibodies: Perils and progress. *Cancer Treat Rev*, *68*, 111-123.
- Jaehne, J., Urmacher, C., Thaler, H., Friedlander-Klar, H., Cordon-Cardo, C., & Meyer, H. (1992). Expression of Her 2/neu oncogene product p185 in correlation to clinicopathological and prognostic factors of gastric carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, *118*(6), 474-479.
- Jaiswal, B. S., Kljavin, N. M., Stawiski, E. W., Chan, E., Parikh, C., Durinck, S., Chaudhuri, S., Pujara, K., Guillory, J., & Edgar, K. A. (2013). Oncogenic ERBB3 mutations in human cancers. *Cancer cell*, *23*(5), 603-617.
- Janne, P. A., Yu, H. A., Johnson, M. L., Steuer, C. E., Vigliotti, M., Iacobucci, C., Chen, S., Yu, C., & Sellami, D. B. (2019). Safety and preliminary antitumor activity of U3-1402: A HER3-targeted antibody drug conjugate in EGFR TKI-resistant, EGFRm NSCLC. *J Clin Oncol*, *37*(15_suppl), 9010-9010.
- Jimeno, A., Machiels, J. P., Wirth, L., Specenier, P., Seiwert, T. Y., Mardjuadi, F., Wang, X., Kapp, A. V., Royer-Joo, S., & Penuel, E. (2016). Phase Ib study of duligotuzumab (MEHD7945A) plus cisplatin/5-fluorouracil or carboplatin/paclitaxel for first-line treatment of recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, *122*(24), 3803-3811.

- Joubert, N., Beck, A., Dumontet, C., & Denevault-Sabourin, C. (2020). Antibody-Drug Conjugates: The Last Decade. *Pharmaceuticals (Basel)*, 13(9).
- Junttila, T. T., Akita, R. W., Parsons, K., Fields, C., Lewis Phillips, G. D., Friedman, L. S., Sampath, D., & Sliwkowski, M. X. (2009). Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer cell*, 15(5), 429-440.
- Junttila, T. T., Li, G., Parsons, K., Phillips, G. L., & Sliwkowski, M. X. (2011). Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 128(2), 347-356.
- Jura, N., Shan, Y., Cao, X., Shaw, D. E., & Kuriyan, J. (2009). Structural analysis of the catalytically inactive kinase domain of the human EGF receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(51), 21608-21613.
- Karamouzis, M. V., Badra, F. A., & Papavassiliou, A. G. (2007). Breast cancer: the upgraded role of HER-3 and HER-4. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(5), 851-856.
- Keam, S. J. (2020). Trastuzumab Deruxtecan: First Approval. *Drugs*, 80(5), 501-508.
- Kiavue, N., Cabel, L., Melaabi, S., Bataillon, G., Callens, C., Lerebours, F., Pierga, J.-Y., & Bidard, F.-C. (2020). ERBB3 mutations in cancer: biological aspects, prevalence and therapeutics. *Oncogene*, 39(3), 487-502.
- Kinneer, K., Meekin, J., Tiberghien, A. C., Tai, Y. T., Phipps, S., Kiefer, C. M., Rebelatto, M. C., Dimasi, N., Moriarty, A., Papadopoulos, K. P., Sridhar, S., Gregson, S. J., Wick, M. J., Masterson, L., Anderson, K. C., Herbst, R., Howard, P. W., & Tice, D. A. (2018). SLC46A3 as a Potential Predictive Biomarker for Antibody-Drug Conjugates Bearing Noncleavable Linked Maytansinoid and Pyrrolobenzodiazepine Warheads. *Clin Cancer Res*, 24(24), 6570-6582.
- Kinugasa, Y., Ishiguro, H., Tokita, Y., Oohira, A., Ohmoto, H., & Higashiyama, S. (2004). Neuroglycan C, a novel member of the neuregulin family. *Biochem Biophys Res Commun*, 321(4), 1045-1049.
- Klos, K. S., Zhou, X., Lee, S., Zhang, L., Yang, W., Nagata, Y., & Yu, D. (2003). Combined trastuzumab and paclitaxel treatment better inhibits ErbB-2-mediated angiogenesis in breast carcinoma through a more effective inhibition of Akt than either treatment alone. *Cancer*, 98(7), 1377-1385.
- Knittle, A. M., Helkkula, M., Johnson, M. S., Sundvall, M., & Elenius, K. (2017). SUMOylation regulates nuclear accumulation and signaling activity of the soluble intracellular domain of the ErbB4 receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 292(48), 19890-19904.
- Knuefermann, C., Lu, Y., Liu, B., Jin, W., Liang, K., Wu, L., Schmidt, M., Mills, G. B., Mendelsohn, J., & Fan, Z. (2003). HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene*, 22(21), 3205-3212.
- Koganemaru, S., Kuboki, Y., Koga, Y., Kojima, T., Yamauchi, M., Maeda, N., Kagari, T., Hirotsu, K., Yasunaga, M., & Matsumura, Y. (2019). U3-1402, a novel HER3-targeting antibody–drug conjugate, for the treatment of Colorectal Cancer. *Mol Cancer Ther*, 18(11), 2043-2050.
- Kogawa, T., Yonemori, K., Masuda, N., Takahashi, S., Takahashi, M., Iwase, H., Nakayama, T., Saeki, T., Toyama, T., Takano, T., Onuma, H., Ogawa, H., Tanaka, Y., Igari, Y., Sugihara, M., Vigliotti, M., Yu, C., Olivo, M. S., Ueno, S., & Iwata, H. (2018). Single agent activity of U3-1402, a HER3-targeting antibody-drug conjugate, in breast cancer patients: Phase 1 dose escalation study. *J Clin Oncol*, 36(15_suppl), 2512-2512.

- Kol, A., Terwisscha van Scheltinga, A. G., Timmer-Bosscha, H., Lamberts, L. E., Bensch, F., de Vries, E. G., & Schröder, C. P. (2014). HER3, serious partner in crime: therapeutic approaches and potential biomarkers for effect of HER3-targeting. *Pharmacol Ther*, *143*(1), 1-11.
- Kostova, V., Désos, P., Starck, J. B., & Kotschy, A. (2021). The Chemistry Behind ADCs. *Pharmaceuticals (Basel)*, *14*(5).
- Koutras, A. K., Fountzilas, G., Kalogeras, K. T., Starakis, I., Iconomou, G., & Kalofonos, H. P. (2010). The upgraded role of HER3 and HER4 receptors in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, *74*(2), 73-78.
- Kraus, M. H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N. C., & Aaronson, S. A. (1989). Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*(23), 9193-9197.
- Kreitman, R. J., & Pastan, I. (2011). Antibody fusion proteins: anti-CD22 recombinant immunotoxin moxetumomab pasudotox. *Clin Cancer Res*, *17*(20), 6398-6405.
- Krop, I. E., Kim, S.-B., Martin, A. G., LoRusso, P. M., Ferrero, J.-M., Badovinac-Crnjevic, T., Hoersch, S., Smitt, M., & Wildiers, H. (2017). Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice in patients with previously treated HER2-positive metastatic breast cancer (TH3RESA): final overall survival results from a randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*, *18*(6), 743-754.
- Kulukian, A., Lee, P., Taylor, J., Rosler, R., de Vries, P., Watson, D., Forero-Torres, A., & Peterson, S. (2020). Preclinical Activity of HER2-Selective Tyrosine Kinase Inhibitor Tucatinib as a Single Agent or in Combination with Trastuzumab or Docetaxel in Solid Tumor Models. *Mol Cancer Ther*, *19*(4), 976-987.
- Le Joncour, V., Martins, A., Puhka, M., Isola, J., Salmikangas, M., Laakkonen, P., Joensuu, H., & Barok, M. (2019). A Novel Anti-HER2 Antibody-Drug Conjugate XMT-1522 for HER2-Positive Breast and Gastric Cancers Resistant to Trastuzumab Emtansine. *Mol Cancer Ther*, *18*(10), 1721-1730.
- Lee-Hoeflich, S. T., Crocker, L., Yao, E., Pham, T., Munroe, X., Hoeflich, K. P., Sliwkowski, M. X., & Stern, H. M. (2008). A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res*, *68*(14), 5878-5887.
- Lee, A. (2020). Tucatinib: first approval. *Drugs*, *80*(10), 1033-1038.
- Lee, B. H., Taylor, M. G., Robinet, P., Smith, J. D., Schweitzer, J., Sehayek, E., Falzarano, S. M., Magi-Galluzzi, C., Klein, E. A., & Ting, A. H. (2013). Dysregulation of cholesterol homeostasis in human prostate cancer through loss of ABCA1. *Cancer Res*, *73*(3), 1211-1218.
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, *141*(7), 1117-1134.
- Lenferink, A. E., Pinkas-Kramarski, R., van de Poll, M. L., van Vugt, M. J., Klapper, L. N., Tzahar, E., Waterman, H., Sela, M., van Zoelen, E. J., & Yarden, Y. (1998). Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *Embo j*, *17*(12), 3385-3397.
- Leung, H. Y., Weston, J., Gullick, W. J., & Williams, G. (1997). A potential autocrine loop between heregulin-alpha and erbB-3 receptor in human prostatic adenocarcinoma. *Br J Urol*, *79*(2), 212-216.
- Li, G., Guo, J., Shen, B.-Q., Yadav, D. B., Sliwkowski, M. X., Crocker, L. M., Lacap, J. A., & Phillips, G. D. L. (2018). Mechanisms of acquired resistance to trastuzumab emtansine in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*, *17*(7), 1441-1453.

- Li, M., Liu, F., Zhang, F., Zhou, W., Jiang, X., Yang, Y., Qu, K., Wang, Y., Ma, Q., & Wang, T. (2019). Genomic ERBB2/ERBB3 mutations promote PD-L1-mediated immune escape in gallbladder cancer: a whole-exome sequencing analysis. *Gut*, *68*(6), 1024-1033.
- Lin, N. U., Borges, V., Anders, C., Murthy, R. K., Paplomata, E., Hamilton, E., Hurvitz, S., Loi, S., Okines, A., & Abramson, V. (2020). *Intracranial efficacy and survival with tucatinib plus trastuzumab and capecitabine for previously treated HER2-positive breast cancer with brain metastases in the HER2CLIMB trial*. *J Clin Oncol*, *38*(23):2610-2619.
- Linardou, H., Dahabreh, I. J., Bafaloukos, D., Kosmidis, P., & Murray, S. (2009). Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC. *Nat Rev Clin Oncol*, *6*(6), 352-366.
- Linggi, B., & Carpenter, G. (2006). ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol*, *16*(12), 649-656.
- Liu, B., Ordonez-Ercan, D., Fan, Z., Edgerton, S. M., Yang, X., & Thor, A. D. (2007). Downregulation of erbB3 abrogates erbB2-mediated tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Int J Cancer*, *120*(9), 1874-1882.
- Liu, J., Ray-Coquard, I. L., Selle, F., Poveda, A., Cibula, D., Hirte, H. W., Raspagliesi, F., Gladieff, L., Harter, P., & Schiavetto, I. (2014). A phase II randomized open-label study of MM-121, a fully human monoclonal antibody targeting ErbB3, in combination with weekly paclitaxel versus weekly paclitaxel in patients with platinum-resistant/refractory ovarian cancers. *J Clin Oncol*, *32*(15):5519-5519.
- Liu, J. F., Ray-Coquard, I., Selle, F., Poveda, A. M., Cibula, D., Hirte, H., Hilpert, F., Raspagliesi, F., Gladieff, L., & Harter, P. (2016). Randomized phase II trial of seribantumab in combination with paclitaxel in patients with advanced platinum-resistant or-refractory ovarian cancer. *J Clin Oncol*, *34*(36), 4345.
- Liu, X., Liu, S., Lyu, H., Riker, A. I., Zhang, Y., & Liu, B. (2019). Development of Effective Therapeutics Targeting HER3 for Cancer Treatment. *Biol Proced Online*, *21*, 5.
- Liu, Y., & Tang, C. (2012). Regulation of ABCA1 functions by signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*, *1821*(3), 522-529.
- Loganzo, F., Tan, X., Sung, M., Jin, G., Myers, J. S., Melamud, E., Wang, F., Diesl, V., Follettie, M. T., & Musto, S. (2015). Tumor cells chronically treated with a trastuzumab-maytansinoid antibody-drug conjugate develop varied resistance mechanisms but respond to alternate treatments. *Molecular cancer therapeutics*, *14*(4), 952-963.
- Loganzo, F., Tan, X., Sung, M., Jin, G., Myers, J. S., Melamud, E., Wang, F., Diesl, V., Follettie, M. T., Musto, S., Lam, M. H., Hu, W., Charati, M. B., Khandke, K., Kim, K. S., Cinque, M., Lucas, J., Graziani, E., Maderna, A., ... Gerber, H. P. (2015). Tumor cells chronically treated with a trastuzumab-maytansinoid antibody-drug conjugate develop varied resistance mechanisms but respond to alternate treatments. *Mol Cancer Ther*, *14*(4), 952-963.
- Lower, E. E., Khan, S., Kennedy, D., & Baughman, R. P. (2017). Discordance of the estrogen receptor and HER-2/neu in breast cancer from primary lesion to first and second metastatic site. *Breast Cancer: Targets Ther*, *9*, 515.
- Lyu, H., Yang, X. H., Edgerton, S. M., Thor, A. D., Wu, X., He, Z., & Liu, B. (2016). The erbB3-and IGF-1 receptor-initiated signaling pathways exhibit distinct effects on lapatinib sensitivity against trastuzumab-resistant breast cancer cells. *Oncotarget*, *7*(3), 2921.
- MacBeath, G., Adiwijaya, B., Liu, J., Sequist, L., Pujade-Lauraine, E., Higgins, M., Tabah-Fisch, I., Pearlberg, J., Moyo, V., & Kubasek, W. (2014). A meta-analysis of biomarkers in three randomized, phase 2 studies of MM-121, a ligand-blocking anti-ERBB3 antibody, in patients with ovarian, lung, and breast cancers. *Ann Oncol*, *25*, iv82.

- Maennling, A. E., Tur, M. K., Niebert, M., Klockenbring, T., Zeppernick, F., Gattenlohner, S., Meinhold-Heerlein, I., & Hussain, A. F. (2019). Molecular Targeting Therapy against EGFR Family in Breast Cancer: Progress and Future Potentials. *Cancers (Basel)*, *11*(12).
- Malm, M., Frejd, F. Y., Ståhl, S., & Löfblom, J. (2016). Targeting HER3 using mono- and bispecific antibodies or alternative scaffolds. *MAbs*, *8*(7), 1195-1209.
- Margolis, B. (1992). Proteins with SH2 domains: transducers in the tyrosine kinase signaling pathway. *Cell Growth Differ*, *3*(1), 73-80.
- Markham, A. (2021). Margetuximab: First Approval. *Drugs*, 1-6.
- Martin, M., Holmes, F. A., Ejlersen, B., Delalogue, S., Moy, B., Iwata, H., von Minckwitz, G., Chia, S. K. L., Mansi, J., Barrios, C. H., Gnant, M., Tomašević, Z., Denduluri, N., Šeparović, R., Gokmen, E., Bashford, A., Ruiz Borrego, M., Kim, S. B., Jakobsen, E. H., ... Chan, A. (2017). Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in HER2-positive breast cancer (ExteNET): 5-year analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, *18*(12), 1688-1700.
- Martínez-Sáez, O., & Prat, A. (2021). Current and Future Management of HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *JCO Oncol Pract*, Op2100172.
- Massagué, J. (1990). Transforming growth factor-alpha. A model for membrane-anchored growth factors. *J Biol Chem*, *265*(35), 21393-21396.
- Massague, J., & Pandiella, A. (1993). Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem*, *62*, 515-541.
- Masuda, N., Yonemori, K., Takahashi, S., Kogawa, T., Nakayama, T., Iwase, H., Takahashi, M., Toyama, T., Saeki, T., Saji, S., Inoue, K., Onuma, H., Tajima, N., Shiose, Y., Chen, S., Guevara, F., Yu, C., Ueno, S., & Iwata, H. (2019). Abstract PD1-03: Single agent activity of U3-1402, a HER3-targeting antibody-drug conjugate, in HER3-overexpressing metastatic breast cancer: Updated results of a phase 1/2 trial. *Cancer Res*, *79*(4 Supplement), PD1-03-PD01-03.
- Matsuoka, T., & Yashiro, M. (2015). Recent advances in the HER2 targeted therapy of gastric cancer. *World J Clin Cases*, *3*(1), 42.
- McIntyre, E., Blackburn, E., Brown, P. J., Johnson, C. G., & Gullick, W. J. (2010). The complete family of epidermal growth factor receptors and their ligands are co-ordinately expressed in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, *122*(1), 105-110.
- Mendell, J., Freeman, D. J., Feng, W., Hettmann, T., Schneider, M., Blum, S., Ruhe, J., Bange, J., Nakamaru, K., Chen, S., Tsuchihashi, Z., von Pawel, J., Copigneaux, C., & Beckman, R. A. (2015). Clinical Translation and Validation of a Predictive Biomarker for Patritumab, an Anti-human Epidermal Growth Factor Receptor 3 (HER3) Monoclonal Antibody, in Patients With Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *EBioMedicine*, *2*(3), 264-271.
- Metzger-Filho, O., Winer, E. P., & Krop, I. (2013). Pertuzumab: optimizing HER2 blockade. *Clin Cancer Res*, *19*(20), 5552-5556.
- Meulendijks, D., Jacob, W., Voest, E. E., Mau-Sorensen, M., Martinez-Garcia, M., Taus, A., Fleitas, T., Cervantes, A., Lolkema, M. P., Langenberg, M. H. G., De Jonge, M. J., Sleijfer, S., Han, J. Y., Calles, A., Felip, E., Kim, S. W., Schellens, J. H. M., Wilson, S., Thomas, M., ... Lassen, U. N. (2017). Phase Ib Study of Lumretuzumab Plus Cetuximab or Erlotinib in Solid Tumor Patients and Evaluation of HER3 and Heregulin as Potential Biomarkers of Clinical Activity. *Clin Cancer Res*, *23*(18), 5406-5415.
- Mishra, R., Alanazi, S., Yuan, L., Solomon, T., Thaker, T. M., Jura, N., & Garrett, J. T. (2018). Activating HER3 mutations in breast cancer. *Oncotarget*, *9*(45), 27773.

- Mishra, R., Patel, H., Alanazi, S., Yuan, L., & Garrett, J. T. (2018). HER3 signaling and targeted therapy in cancer. *Oncol Rev*, *12*(1), 355.
- Mitchell, R. A., Luwor, R. B., & Burgess, A. W. (2018). Epidermal growth factor receptor: Structure-function informing the design of anticancer therapeutics. *Exp Cell Res*, *371*(1), 1-19.
- Mitra, D., Brumlik, M. J., Okamgba, S. U., Zhu, Y., Duplessis, T. T., Parvani, J. G., Lesko, S. M., Brogi, E., & Jones, F. E. (2009). An oncogenic isoform of HER2 associated with locally disseminated breast cancer and trastuzumab resistance. *Mol Cancer Ther*, *8*(8), 2152-2162.
- Mittendorf, E. A., Wu, Y., Scaltriti, M., Meric-Bernstam, F., Hunt, K. K., Dawood, S., Esteva, F. J., Buzdar, A. U., Chen, H., Eksambi, S., Hortobagyi, G. N., Baselga, J., & Gonzalez-Angulo, A. M. (2009). Loss of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes. *Clin Cancer Res*, *15*(23), 7381-7388.
- Modi, S., Saura, C., Yamashita, T., Park, Y. H., Kim, S. B., Tamura, K., Andre, F., Iwata, H., Ito, Y., Tsurutani, J., Sohn, J., Denduluri, N., Perrin, C., Aogi, K., Tokunaga, E., Im, S. A., Lee, K. S., Hurvitz, S. A., Cortes, J., ... Krop, I. (2020). Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*, *382*(7), 610-621.
- Molina, M. A., Codony-Servat, J., Albanell, J., Rojo, F., Arribas, J., & Baselga, J. (2001). Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res*, *61*(12), 4744-4749.
- Molinari, F., & Frattini, M. (2013). Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Front Oncol*, *3*, 326.
- Montero-Conde, C., Ruiz-Llorente, S., Dominguez, J. M., Knäuf, J. A., Viale, A., Sherman, E. J., Ryder, M., Ghossein, R. A., Rosen, N., & Fagin, J. A. (2013). Relief of feedback inhibition of HER3 transcription by RAF and MEK inhibitors attenuates their antitumor effects in BRAF-mutant thyroid carcinomas. *Cancer Discov*, *3*(5), 520-533.
- Montero, J. C., García-Alonso, S., Ocaña, A., & Pandiella, A. (2015). Identification of therapeutic targets in ovarian cancer through active tyrosine kinase profiling. *Oncotarget*, *6*(30), 30057-30071.
- Morrison, M. M., Hutchinson, K., Williams, M. M., Stanford, J. C., Balko, J. M., Young, C., Kuba, M. G., Sánchez, V., Williams, A. J., & Hicks, D. J. (2013). ErbB3 downregulation enhances luminal breast tumor response to antiestrogens. *J Clin Invest*, *123*(10), 4329-4343.
- Moulder, S. L., Borges, V. F., Baetz, T., Mcspadden, T., Fernetich, G., Murthy, R. K., Chavira, R., Guthrie, K., Barrett, E., & Chia, S. K. (2017). Phase I study of ONT-380, a HER2 inhibitor, in patients with HER2+-advanced solid tumors, with an expansion cohort in HER2+ metastatic breast cancer (MBC). *Clin Cancer Res*, *23*(14), 3529-3536.
- Murthy, R. K., Loi, S., Okines, A., Paplomata, E., Hamilton, E., Hurvitz, S. A., Lin, N. U., Borges, V., Abramson, V., & Anders, C. (2020). Tucatinib, trastuzumab, and capecitabine for HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, *382*(7), 597-609.
- Nadal-Serrano, M., Morancho, B., Escrivá-de-Romaní, S., Morales, C. B., Luque, A., Escorihuela, M., Espinosa Bravo, M., Peg, V., Dijcks, F. A., Dokter, W. H. A., Cortés, J., Saura, C., & Arribas, J. (2020). The Second Generation Antibody-Drug Conjugate SYD985 Overcomes Resistances to T-DM1. *Cancers (Basel)*, *12*(3).
- Nagata, Y., Lan, K. H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F. J., Sahin, A. A., Klos, K. S., Li, P., Monia, B. P., Nguyen, N. T., Hortobagyi, G. N., Hung, M. C., & Yu, D. (2004). PTEN

- activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*, 6(2), 117-127.
- Nagy, P., Friedländer, E., Tanner, M., Kapanen, A. I., Carraway, K. L., Isola, J., & Jovin, T. M. (2005). Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res*, 65(2), 473-482.
- Nahta, R. e., & Esteva, F. (2007). Trastuzumab: triumphs and tribulations. *Oncogene*, 26(25), 3637-3643.
- Narayan, M., Wilken, J. A., Harris, L. N., Baron, A. T., Kimbler, K. D., & Maihle, N. J. (2009). Trastuzumab-induced HER reprogramming in "resistant" breast carcinoma cells. *Cancer Res*, 69(6), 2191-2194.
- Naresh, A., Long, W., Vidal, G. A., Wimley, W. C., Marrero, L., Sartor, C. I., Tovey, S., Cooke, T. G., Bartlett, J. M., & Jones, F. E. (2006). The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Res*, 66(12), 6412-6420.
- Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., Akslen, L. A., Ragaz, J., Gown, A. M., Gilks, C. B., van de Rijn, M., & Perou, C. M. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10(16), 5367-5374.
- Niikura, N., Liu, J., Hayashi, N., Mittendorf, E. A., Gong, Y., Palla, S. L., Tokuda, Y., Gonzalez-Angulo, A. M., Hortobagyi, G. N., & Ueno, N. T. (2012). Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. *J Clin Oncol*, 30(6), 593-599.
- Nolting, B. (2013). Linker technologies for antibody-drug conjugates. *Methods Mol Biol*, 1045, 71-100.
- Nordberg, J., Mpindi, J. P., Iljin, K., Pulliainen, A. T., Kallajoki, M., Kallioniemi, O., Elenius, K., & Elenius, V. (2012). Systemic analysis of gene expression profiles identifies ErbB3 as a potential drug target in pediatric alveolar rhabdomyosarcoma. *PLoS one*, 7(12), e50819.
- Nordstrom, J. L., Gorlatov, S., Zhang, W., Yang, Y., Huang, L., Burke, S., Li, H., Ciccarone, V., Zhang, T., & Stavenhagen, J. (2011). Anti-tumor activity and toxicokinetics analysis of MGAH22, an anti-HER2 monoclonal antibody with enhanced Fcγ receptor binding properties. *Breast Cancer Res*, 13(6), 1-14.
- Ocaña, A., Amir, E., & Pandiella, A. (2020). HER2 heterogeneity and resistance to anti-HER2 antibody-drug conjugates. *Breast Cancer Res*, 22(1), 15.
- Ocaña, A., Díez-González, L., Esparís-Ogando, A., Montero, J. C., Amir, E., & Pandiella, A. (2016). Neuregulin expression in solid tumors: prognostic value and predictive role to anti-HER3 therapies. *Oncotarget*, 7(29), 45042-45051.
- Ocana, A., Vera-Badillo, F., Seruga, B., Templeton, A., Pandiella, A., & Amir, E. (2013). HER3 overexpression and survival in solid tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 105(4), 266-273.
- Ogitani, Y., Aida, T., Hagihara, K., Yamaguchi, J., Ishii, C., Harada, N., Soma, M., Okamoto, H., Oitate, M., Arakawa, S., Hirai, T., Atsumi, R., Nakada, T., Hayakawa, I., Abe, Y., & Agatsuma, T. (2016). DS-8201a, A Novel HER2-Targeting ADC with a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor, Demonstrates a Promising Antitumor Efficacy with Differentiation from T-DM1. *Clin Cancer Res*, 22(20), 5097-5108.

- Okines, A. F. (2017). T-DM1 in the Neo-Adjuvant Treatment of HER2-Positive Breast Cancer: Impact of the KRISTINE (TRIO-021) Trial. *Rev Recent Clin Trials*, 12(3), 216-222.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., & Hynes, N. E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo j*, 19(13), 3159-3167.
- Omerovic, J., Santangelo, L., Puggioni, E. M., Marrocco, J., Dall'Armi, C., Palumbo, C., Belleudi, F., Di Marcotullio, L., Frati, L., Torrisi, M. R., Cesareni, G., Gulino, A., & Alimandi, M. (2007). The E3 ligase Aip4/Itch ubiquitinates and targets ErbB-4 for degradation. *Faseb j*, 21(11), 2849-2862.
- Osipo, C., Meeke, K., Cheng, D., Weichel, A., Bertucci, A., Liu, H., & Jordan, V. C. (2007). Role for HER2/neu and HER3 in fulvestrant-resistant breast cancer. *Int J Oncol*, 30(2), 509-520.
- Pareja, F., Geyer, F. C., Marchiò, C., Burke, K. A., Weigelt, B., & Reis-Filho, J. S. (2016). Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. *NPJ Breast Cancer*, 2, 16036.
- Park, S. J., Gu, M. J., Lee, D. S., Yun, S. S., Kim, H. J., & Choi, J. H. (2015). EGFR expression in pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(7), 8298-8304.
- Pawar, A. B., & Sengupta, D. (2019). Resolving the conformational dynamics of ErbB growth factor receptor dimers. *J Struct Biol*, 207(2), 225-233.
- Pawel, J. V., Tseng, J., Dediu, M., Schumann, C., Moritz, B., Mendell-Harary, J., Jin, X., Feng, W., Copigneaux, C., & Beckman, R. A. (2014). Phase 2 HERALD study of patritumab (P) with erlotinib (E) in advanced NSCLC subjects (SBJs). *J Clin Oncol*, 32(15_suppl), 8045-8045.
- Paz-Arez, L., Serwatowski, P., Szcześna, A., Von Pawel, J., Toschi, L., Tibor, C., Morabito, A., Zhang, L., Shuster, D., & Chen, S. (2017). P3. 02b-045 Patritumab plus Erlotinib in EGFR Wild-Type Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Part a Results of HER3-Lung Study: Topic: EGFR Clinical. *J Thorac Oncol*, 12(1), S1214-S1215.
- Perez, E. A., Barrios, C., Eiermann, W., Toi, M., Im, Y. H., Conte, P., Martin, M., Pienkowski, T., Pivot, X., Burris, H., 3rd, Petersen, J. A., Stanzel, S., Strasak, A., Patre, M., & Ellis, P. (2017). Trastuzumab Emtansine With or Without Pertuzumab Versus Trastuzumab Plus Taxane for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive, Advanced Breast Cancer: Primary Results From the Phase III MARIANNE Study. *J Clin Oncol*, 35(2), 141-148.
- Pernas, S., & Tolaney, S. M. (2019). HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance. *Ther Adv Med Oncol*, 11, 1758835919833519.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-752.
- Petit, A. M., Rak, J., Hung, M. C., Rockwell, P., Goldstein, N., Fendly, B., & Kerbel, R. S. (1997). Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol*, 151(6), 1523-1530.
- Phillips, G. D., Fields, C. T., Li, G., Dowbenko, D., Schaefer, G., Miller, K., Andre, F., Burris, H. A., 3rd, Albain, K. S., Harbeck, N., Dieras, V., Crivellari, D., Fang, L.,

- Guardino, E., Olsen, S. R., Crocker, L. M., & Sliwkowski, M. X. (2014). Dual targeting of HER2-positive cancer with trastuzumab emtansine and pertuzumab: critical role for neuregulin blockade in antitumor response to combination therapy. *Clin Cancer Res*, *20*(2), 456-468.
- Phillips, G. D. L., Li, G., Dugger, D. L., Crocker, L. M., Parsons, K. L., Mai, E., Blättler, W. A., Lambert, J. M., Chari, R. V., & Lutz, R. J. (2008). Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res*, *68*(22), 9280-9290.
- Plowman, G. D., Culouscou, J.-M., Whitney, G. S., Green, J. M., Carlton, G. W., Foy, L., Neubauer, M. G., & Shoyab, M. (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(5), 1746-1750.
- Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., He, X., & Perou, C. M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*, *12*(5), R68.
- Prickett, T. D., Agrawal, N. S., Wei, X., Yates, K. E., Lin, J. C., Wunderlich, J. R., Cronin, J. C., Cruz, P., Rosenberg, S. A., & Samuels, Y. (2009). Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nat Genet*, *41*(10), 1127-1132.
- Prigent, S. A., & Gullick, W. J. (1994). Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera. *Embo j*, *13*(12), 2831-2841.
- Qiu, X.-B., & Goldberg, A. L. (2002). Nrdp1/FLRF is a ubiquitin ligase promoting ubiquitination and degradation of the epidermal growth factor receptor family member, ErbB3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(23), 14843-14848.
- Rabindran, S. K., Discafani, C. M., Rosfjord, E. C., Baxter, M., Floyd, M. B., Golas, J., Hallett, W. A., Johnson, B. D., Nilakantan, R., & Overbeek, E. (2004). Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase. *Cancer Res*, *64*(11), 3958-3965.
- Raja, S. M., Clubb, R. J., Bhattacharyya, M., Dimri, M., Cheng, H., Pan, W., Ortega-Cava, C., Lakku-Reddi, A., Naramura, M., & Band, V. (2008). A combination of Trastuzumab and 17-AAG induces enhanced ubiquitinylation and lysosomal pathway-dependent ErbB2 degradation and cytotoxicity in ErbB2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biol Ther*, *7*(10), 1630-1640.
- Rajkumar, T., Goden, C. S., Lemoine, N. R., & Gullick, W. J. (1993). Expression of the c-erbB-3 protein in gastrointestinal tract tumours determined by monoclonal antibody RTJ1. *J Pathol*, *170*(3), 271-278.
- Rajkumar, T., Stamp, G., Hughes, C., & Gullick, W. (1996). c-erbB3 protein expression in ovarian cancer. *Clin Mol Pathol*, *49*(4), M199.
- Reddy, K. (2011). Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options. *Curr Oncol*, *18*(4), 173-179.
- Reis-Filho, J. S., & Pusztai, L. (2011). Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet*, *378*(9805), 1812-1823.
- Reschke, M., Mihic-Probst, D., van der Horst, E. H., Knyazev, P., Wild, P. J., Hutterer, M., Meyer, S., Dummer, R., Moch, H., & Ullrich, A. (2008). HER3 Is a Determinant for Poor Prognosis in Melanoma. *Clin Cancer Res*, *14*(16), 5188-5197.
- Reynolds, K. L., Bedard, P. L., Lee, S.-H., Lin, C.-C., Tabernero, J., Alsina, M., Cohen, E., Baselga, J., Blumenschein, G., & Graham, D. M. (2017). A phase I open-label dose-escalation study of the anti-HER3 monoclonal antibody LJM716 in patients with

- advanced squamous cell carcinoma of the esophagus or head and neck and HER2-overexpressing breast or gastric cancer. *BMC cancer*, 17(1), 1-11.
- Riese, D. J., 2nd, & Stern, D. F. (1998). Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays*, 20(1), 41-48.
- Ríos-Luci, C., Díaz-Rodríguez, E., Gandullo-Sánchez, L., Díaz-Gil, L., Ocaña, A., & Pandiella, A. (2020). Adaptive resistance to trastuzumab impairs response to neratinib and lapatinib through deregulation of cell death mechanisms. *Cancer Lett*, 470, 161-169.
- Ríos-Luci, C., García-Alonso, S., Díaz-Rodríguez, E., Nadal-Serrano, M., Arribas, J., Ocaña, A., & Pandiella, A. (2017). Resistance to the Antibody–Drug Conjugate T-DM1 Is Based in a Reduction in Lysosomal Proteolytic Activity. *Cancer Res*, 77(17), 4639-4651.
- Ritchie, M., Tchistiakova, L., & Scott, N. (2013). Implications of receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking dynamics in the development of antibody drug conjugates. *MABs*, 5(1), 13-21.
- Ritter, C. A., Perez-Torres, M., Rinehart, C., Guix, M., Dugger, T., Engelman, J. A., & Arteaga, C. L. (2007). Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin Cancer Res*, 13(16), 4909-4919.
- Robey, R. W., Pluchino, K. M., Hall, M. D., Fojo, A. T., Bates, S. E., & Gottesman, M. M. (2018). Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer*, 18(7), 452-464.
- Roepstorff, K., Grøvdal, L., Grandal, M., Lerdrup, M., & van Deurs, B. (2008). Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochem Cell Biol*, 129(5), 563-578.
- Roskoski, R., Jr. (2014a). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res*, 79, 34-74.
- Roskoski, R., Jr. (2014b). ErbB/HER protein-tyrosine kinases: Structures and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res*, 87, 42-59.
- Ross, J. S., Fakih, M., Ali, S. M., Elvin, J. A., Schrock, A. B., Suh, J., Vergilio, J. A., Ramkissoon, S., Severson, E., & Daniel, S. (2018). Targeting HER2 in colorectal cancer: The landscape of amplification and short variant mutations in ERBB2 and ERBB3. *Cancer*, 124(7), 1358-1373.
- Ross, J. S., Slodkowska, E. A., Symmans, W. F., Pusztai, L., Ravdin, P. M., & Hortobagyi, G. N. (2009). The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *The oncologist*, 14(4), 320-368.
- Rugo, H. S., Im, S.-A., Cardoso, F., Cortés, J., Curigliano, G., Musolino, A., Pegram, M. D., Wright, G. S., Saura, C., & Escrivá-de-Romaní, S. (2021). Efficacy of margetuximab vs trastuzumab in patients with pretreated ERBB2-positive advanced breast cancer: a phase 3 randomized clinical trial. *JAMA Oncol*, 7(4), 573-584.
- Saatci, Ö., Borgoni, S., Akbulut, Ö., Durmuş, S., Raza, U., Eyüpoğlu, E., Alkan, C., Akyol, A., Kütük, Ö., & Wiemann, S. (2018). Targeting PLK1 overcomes T-DM1 resistance via CDK1-dependent phosphorylation and inactivation of Bcl-2/xL in HER2-positive breast cancer. *Oncogene*, 37(17), 2251-2269.
- Sabbaghi, M., Gil-Gómez, G., Guardia, C., Servitja, S., Arpi, O., García-Alonso, S., Menéndez, S., Arumi-Uria, M., Serrano, L., & Salido, M. (2017). Defective cyclin B1 induction in trastuzumab-emtansine (T-DM1) acquired resistance in HER2-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*, 23(22), 7006-7019.

Sak, M. M., Breen, K., Rønning, S. B., Pedersen, N. M., Bertelsen, V., Stang, E., & Madshus, I. H. (2012). The oncoprotein ErbB3 is endocytosed in the absence of added ligand in a clathrin-dependent manner. *Carcinogenesis*, 33(5), 1031-1039.

Sakai, H., Tsurutani, J., Iwasa, T., Komoike, Y., Sakai, K., Nishio, K., & Nakagawa, K. (2018). HER2 genomic amplification in circulating tumor DNA and estrogen receptor positivity predict primary resistance to trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer*, 25(5), 605-613.

Sala, G., Rapposelli, I. G., Ghasemi, R., Piccolo, E., Traini, S., Capone, E., Rossi, C., Pelliccia, A., Di Risio, A., & D'Egidio, M. (2013). EV20, a novel anti-ErbB-3 humanized antibody, promotes ErbB-3 down-regulation and inhibits tumor growth in vivo. *Translational oncology*, 6(6), 676-IN679.

Sala, G., Rapposelli, I. G., Ghasemi, R., Piccolo, E., Traini, S., Capone, E., Rossi, C., Pelliccia, A., Di Risio, A., D'Egidio, M., Tinari, N., Muraro, R., & Iacobelli, S. (2013). EV20, a Novel Anti-ErbB-3 Humanized Antibody, Promotes ErbB-3 Down-Regulation and Inhibits Tumor Growth In Vivo. *Transl Oncol*, 6(6), 676-684.

Sala, G., Traini, S., D'egidio, M., Vianale, G., Rossi, C., Piccolo, E., Lattanzio, R., Piantelli, M., Tinari, N., & Natali, P. (2012). An ErbB-3 antibody, MP-RM-1, inhibits tumor growth by blocking ligand-dependent and independent activation of ErbB-3/Akt signaling. *Oncogene*, 31(10), 1275-1286.

Sánchez-Martín, M., & Pandiella, A. (2012). Differential action of small molecule HER kinase inhibitors on receptor heterodimerization: therapeutic implications. *Int J Cancer*, 131(1), 244-252.

Sardi, S. P., Murtie, J., Koirala, S., Patten, B. A., & Corfas, G. (2006). Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain. *Cell*, 127(1), 185-197.

Sartor, C. I., Zhou, H., Kozłowska, E., Guttridge, K., Kawata, E., Caskey, L., Harrelson, J., Hynes, N., Ethier, S., Calvo, B., & Earp, H. S., 3rd. (2001). Her4 mediates ligand-dependent antiproliferative and differentiation responses in human breast cancer cells. *Mol Cell Biol*, 21(13), 4265-4275.

Sauveur, J., Conilh, L., Beaumel, S., Chettab, K., Jordheim, L. P., Matera, E. L., & Dumontet, C. (2020). Characterization of T-DM1-resistant breast cancer cells. *Pharmacol Res Perspect*, 8(4), e00617.

Sauveur, J., Matera, E.-L., Chettab, K., Valet, P., Guitton, J., Savina, A., & Dumontet, C. (2018). Esophageal cancer cells resistant to T-DM1 display alterations in cell adhesion and the prostaglandin pathway. *Oncotarget*, 9(30), 21141.

Scaltriti, M., Rojo, F., Ocaña, A., Anido, J., Guzman, M., Cortes, J., Di Cosimo, S., Matias-Guiu, X., Ramon y Cajal, S., Arribas, J., & Baselga, J. (2007). Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 99(8), 628-638.

Schafer, B., Marg, B., Gschwind, A., & Ullrich, A. (2004). Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival. *J Biol Chem*, 279(46), 47929-47938.

Schlam, I., & Swain, S. M. (2021). HER2-positive breast cancer and tyrosine kinase inhibitors: the time is now. *NPJ Breast Cancer*, 7(1), 56.

Schmucker, S., & Sumara, I. (2014). Molecular dynamics of PLK1 during mitosis. *Mol Cell Oncol*, 1(2), e954507.

Schneeweiss, A., Park-Simon, T.-W., Albanell, J., Lassen, U., Cortés, J., Dieras, V., May, M., Schindler, C., Marmé, F., & Cejalvo, J. M. (2018). Phase Ib study evaluating

- safety and clinical activity of the anti-HER3 antibody lumretuzumab combined with the anti-HER2 antibody pertuzumab and paclitaxel in HER3-positive, HER2-low metastatic breast cancer. *Invest New Drugs*, 36(5), 848-859.
- Schoeberl, B., Faber, A. C., Li, D., Liang, M.-C., Crosby, K., Onsum, M., Burenkova, O., Pace, E., Walton, Z., & Nie, L. (2010). An ErbB3 antibody, MM-121, is active in cancers with ligand-dependent activation. *Cancer Res*, 70(6), 2485-2494.
- Schoeberl, B., Kudla, A., Masson, K., Kalra, A., Curley, M., Finn, G., Pace, E., Harms, B., Kim, J., & Kearns, J. (2017). Systems biology driving drug development: from design to the clinical testing of the anti-ErbB3 antibody seribantumab (MM-121). *NPJ Syst Biol Appl*, 3(1), 1-17.
- Schoeberl, B., Pace, E. A., Fitzgerald, J. B., Harms, B. D., Xu, L., Nie, L., Linggi, B., Kalra, A., Paragas, V., & Bukhalid, R. (2009). Therapeutically targeting ErbB3: A key node in ligand-induced activation of the ErbB receptor–PI3K axis. *Sci Signal*, 2(77), ra31-ra31.
- Schrijver, W., Suijkerbuijk, K. P. M., van Gils, C. H., van der Wall, E., Moelans, C. B., & van Diest, P. J. (2018). Receptor Conversion in Distant Breast Cancer Metastases: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 110(6), 568-580.
- Schwarz, L. J., Hutchinson, K. E., Rexer, B. N., Estrada, M. V., Gonzalez Ericsson, P. I., Sanders, M. E., Dugger, T. C., Formisano, L., Guerrero-Zotano, A., & Red-Brewer, M. (2017). An ERBB1-3 neutralizing antibody mixture with high activity against drug-resistant HER2+ breast cancers with ERBB ligand overexpression. *J Natl Cancer Inst*, 109(11), dx065.
- Seo, S., Ryu, M. H., Park, Y. S., Ahn, J. Y., Park, Y., Park, S. R., Ryoo, B. Y., Lee, G. H., Jung, H. Y., & Kang, Y. K. (2019). Loss of HER2 positivity after anti-HER2 chemotherapy in HER2-positive gastric cancer patients: results of the GASTric cancer HER2 reassessment study 3 (GASTHER3). *Gastric Cancer*, 22(3), 527-535.
- SEOM. (2021). Las Cifras del Cáncer en España 2021. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). <https://seom.org/publicaciones/el-cancer-en-espanyacom>
- Sequist, L. V., Gray, J. E., Harb, W. A., Lopez-Chavez, A., Doebele, R. C., Modiano, M. R., Jackman, D. M., Baggstrom, M. Q., Atmaca, A., & Felip, E. (2019). Randomized phase II trial of seribantumab in combination with erlotinib in patients with EGFR Wild-type non-small cell lung cancer. *The oncologist*, 24(8), 1095.
- Sequist, L. V., Janne, P. A., Huber, R. M., Gray, J. E., Felip, E., Perol, M., Hirsch, F. R., Tan, D. S.-W., Kuesters, G., & Zalutskaya, A. (2019). SHERLOC: A phase 2 study of MM-121 plus with docetaxel versus docetaxel alone in patients with heregulin (HRG) positive advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). In: American Society of Clinical Oncology.
- Sequist, L. V., Lopez-Chavez, A., Doebele, R. C., Gray, J. E., Harb, W. A., Modiano, M. R., Jackman, D. M., Baggstrom, M. Q., Atmaca, A., & Felip, E. (2014). A randomized phase 2 trial of MM-121, a fully human monoclonal antibody targeting ErbB3, in combination with erlotinib in EGFR wild-type NSCLC patients. In: American Society of Clinical Oncology.
- Sergina, N. V., Rausch, M., Wang, D., Blair, J., Hann, B., Shokat, K. M., & Moasser, M. M. (2007). Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature*, 445(7126), 437-441.
- Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A., & Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*, 168(4), 707-723.

- Shattuck, D. L., Miller, J. K., Carraway, K. L., & Sweeney, C. (2008). Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res*, *68*(5), 1471-1477.
- Shi, F., Telesco, S. E., Liu, Y., Radhakrishnan, R., & Lemmon, M. A. (2010). ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(17), 7692-7697.
- Shitara, K., Baba, E., Fujitani, K., Oki, E., Fujii, S., & Yamaguchi, K. (2021). Discovery and development of trastuzumab deruxtecan and safety management for patients with HER2-positive gastric cancer. *Gastric Cancer*, *24*(4), 780-789.
- Simpson, B. J., Weatherill, J., Miller, E., Lessells, A., Langdon, S., & Miller, W. (1995). c-erb B-3 protein expression in ovarian tumours. *Br J Cancer*, *71*(4), 758-762.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., & McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, *235*(4785), 177-182.
- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., & Pegram, M. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, *344*(11), 783-792.
- Slesak, B., Harlozinska, A., Porebska, I., Bojarowski, T., Lapinska, J., Rzeszutko, M., & Wojnar, A. (1998). Expression of epidermal growth factor receptor family proteins (EGFR, c-erbB-2 and c-erbB-3) in gastric cancer and chronic gastritis. *Anticancer Res*, *18*(4A), 2727-2732.
- Soltoff, S. P., Carraway, K. L., Prigent, S., Gullick, W., & Cantley, L. C. (1994). ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*, *14*(6), 3550-3558.
- Sorkina, T., Bild, A., Tebar, F., & Sorkin, A. (1999). Clathrin, adaptors and eps15 in endosomes containing activated epidermal growth factor receptors. *J Cell Sci*, *112* (Pt 3), 317-327.
- Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(19), 10869-10874.
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lønning, P. E., Brown, P. O., Børresen-Dale, A. L., & Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(14), 8418-8423.
- Sotiriou, C., Neo, S. Y., McShane, L. M., Korn, E. L., Long, P. M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S. B., Harris, A. L., & Liu, E. T. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(18), 10393-10398.
- Soung, Y. H., Lee, J. W., Kim, S. Y., Wang, Y. P., Jo, K. H., Moon, S. W., Park, W. S., Nam, S. W., Lee, J. Y., Yoo, N. J., & Lee, S. H. (2006). Somatic mutations of the ERBB4 kinase domain in human cancers. *Int J Cancer*, *118*(6), 1426-1429.
- Starr, A., Greif, J., Vexler, A., Ashkenazy-Voghera, M., Gladesh, V., Rubin, C., Kerber, G., Marmor, S., Lev-Ari, S., & Inbar, M. (2006). ErbB4 increases the proliferation potential of human lung cancer cells and its blockage can be used as a target for anti-cancer therapy. *Int J Cancer*, *119*(2), 269-274.

- Steinkamp, M. P., Low-Nam, S. T., Yang, S., Lidke, K. A., Lidke, D. S., & Wilson, B. S. (2014). erbB3 is an active tyrosine kinase capable of homo-and heterointeractions. *Mol Cell Biol*, 34(6), 965-977.
- Stern, D. F. (2008). ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2 duet in mammary development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 13(2), 215.
- Suenaga, A., Takada, N., Hatakeyama, M., Ichikawa, M., Yu, X., Tomii, K., Okimoto, N., Futatsugi, N., Narumi, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Konagaya, A., & Taiji, M. (2005). Novel mechanism of interaction of p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase and ErbB3 receptor-derived phosphotyrosyl peptides. *J Biol Chem*, 280(2), 1321-1326.
- Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., & Collins, V. P. (1990). Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(21), 8602-8606.
- Sun, Y. L., Patel, A., Kumar, P., & Chen, Z. S. (2012). Role of ABC transporters in cancer chemotherapy. *Chin J Cancer*, 31(2), 51-57.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*.
- Sung, M., Tan, X., Lu, B., Golas, J., Hosselet, C., Wang, F., Tylaska, L., King, L., Zhou, D., & Dushin, R. (2018). Caveolae-mediated endocytosis as a novel mechanism of resistance to trastuzumab emtansine (T-DM1). *Mol Cancer Ther*, 17(1), 243-253.
- Suo, Z., Risberg, B., Kalsson, M. G., Willman, K., Tierens, A., Skovlund, E., & Nesland, J. M. (2002). EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol*, 196(1), 17-25.
- Swain, S. M., Kim, S.-B., Cortés, J., Ro, J., Semiglazov, V., Campone, M., Ciruelos, E., Ferrero, J.-M., Schneeweiss, A., & Knott, A. (2013). Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*, 14(6), 461-471.
- Takegawa, N., Nonagase, Y., Yonesaka, K., Sakai, K., Maenishi, O., Ogitani, Y., Tamura, T., Nishio, K., Nakagawa, K., & Tsurutani, J. (2017). DS-8201a, a new HER2-targeting antibody-drug conjugate incorporating a novel DNA topoisomerase I inhibitor, overcomes HER2-positive gastric cancer T-DM1 resistance. *Int J Cancer*, 141(8), 1682-1689.
- Tarantino, P., Morganti, S., Uliano, J., Giugliano, F., Crimini, E., & Curigliano, G. (2021). Margetuximab for the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 21(2), 127-133.
- Thien, C. B., & Langdon, W. Y. (2001). Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(4), 294-307.
- Tóth, G., Szőör, Á., Simon, L., Yarden, Y., Szöllösi, J., & Vereb, G. (2016). *The combination of trastuzumab and pertuzumab administered at approved doses may delay development of trastuzumab resistance by additively enhancing antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*. Paper presented at the MABs.
- Trowbridge, I. S., Collawn, J. F., & Hopkins, C. R. (1993). Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Biol*, 9, 129-161.
- Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. (2020). Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol*, 27(1), 27-35.
- Turpin, J., Ling, C., Crosby, E. J., Hartman, Z. C., Simond, A. M., Chodosh, L. A., Rennhack, J. P., Andrechek, E. R., Ozcelik, J., Hallett, M., Mills, G. B., Cardiff, R. D.,

- Valabrega, G., Montemurro, F., & Aglietta, M. (2007). Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol*, 18(6), 977-984.
- van der Geer, P., & Pawson, T. (1995). The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem Sci*, 20(7), 277-280.
- Van Raemdonck, E., Floris, G., Berteloot, P., Laenen, A., Vergote, I., Wildiers, H., Punie, K., & Neven, P. (2021). Efficacy of anti-HER2 therapy in metastatic breast cancer by discordance of HER2 expression between primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 185(1), 183-194.
- Váradi, T., Schneider, M., Sevcsik, E., Kiesenhofer, D., Baumgart, F., Batta, G., Kovács, T., Platzter, R., Huppa, J. B., & Szöllősi, J. (2019). Homo-and heteroassociations drive activation of ErbB3. *Biophys J*, 117(10), 1935-1947.
- Verma, S., Miles, D., Gianni, L., Krop, I. E., Welslau, M., Baselga, J., Pegram, M., Oh, D.-Y., Diéras, V., & Guardino, E. (2012). Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*, 367(19), 1783-1791.
- Vermeij, J., Teugels, E., Bourgain, C., Xiangming, J., Ghislain, V., Neyns, B., & De Greve, J. (2008). Genomic activation of the EGFR and HER2-neu genes in a significant proportion of invasive epithelial ovarian cancers. *BMC cancer*, 8(1), 1-9.
- Vijapurkar, U., Cheng, K., & Koland, J. G. (1998). Mutation of a Shc binding site tyrosine residue in ErbB3/HER3 blocks heregulin-dependent activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 273(33), 20996-21002.
- Volpi, C. C., Pietrantonio, F., Gloghini, A., Fucà, G., Giordano, S., Corso, S., Pruneri, G., Antista, M., Cremolini, C., Fasano, E., Saggio, S., Faraci, S., Di Bartolomeo, M., de Braud, F., Di Nicola, M., Tagliabue, E., Pupa, S. M., & Castagnoli, L. (2019). The landscape of d16HER2 splice variant expression across HER2-positive cancers. *Sci Rep*, 9(1), 3545.
- von Minckwitz, G., Huang, C. S., Mano, M. S., Loibl, S., Mamounas, E. P., Untch, M., Wolmark, N., Rastogi, P., Schneeweiss, A., Redondo, A., Fischer, H. H., Jacot, W., Conlin, A. K., Arce-Salinas, C., Wapnir, I. L., Jackisch, C., DiGiovanna, M. P., Fasching, P. A., Crown, J. P., ... Geyer, C. E., Jr. (2019). Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*, 380(7), 617-628.
- Vuong, D., Simpson, P. T., Green, B., Cummings, M. C., & Lakhani, S. R. (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch*, 465(1), 1-14.
- Wang, H., Wang, W., Xu, Y., Yang, Y., Chen, X., Quan, H., & Lou, L. (2017). Aberrant intracellular metabolism of T-DM 1 confers T-DM 1 resistance in human epidermal growth factor receptor 2-positive gastric cancer cells. *Cancer Sci*, 108(7), 1458-1468.
- Wang, L., Wang, Q., Gao, M., Fu, L., Li, Y., Quan, H., & Lou, L. (2018). STAT 3 activation confers trastuzumab-emtansine (T-DM 1) resistance in HER 2-positive breast cancer. *Cancer Sci*, 109(10), 3305-3315.
- Wang, S., Huang, X., Lee, C., & Liu, B. (2010). Elevated expression of erbB3 confers paclitaxel resistance in erbB2-overexpressing breast cancer cells via upregulation of Survivin. *Oncogene*, 29(29), 4225-4236.
- Wang, S. E., Xiang, B., Guix, M., Olivares, M. G., Parker, J., Chung, C. H., Pandiella, A., & Arteaga, C. L. (2008). Transforming growth factor β engages TACE and ErbB3 to activate phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in ErbB2-overexpressing breast cancer and desensitizes cells to trastuzumab. *Molecular and cellular biology*, 28(18), 5605-5620.

- Wang, Y., Pennock, S., Chen, X., & Wang, Z. (2002). Endosomal signaling of epidermal growth factor receptor stimulates signal transduction pathways leading to cell survival. *Mol Cell Biol*, 22(20), 7279-7290.
- Wang, Z. (2017). ErbB Receptors and Cancer. *Methods Mol Biol*, 1652, 3-35.
- Wang, Z., Zhang, L., Yeung, T. K., & Chen, X. (1999). Endocytosis deficiency of epidermal growth factor (EGF) receptor-ErbB2 heterodimers in response to EGF stimulation. *Mol Biol Cell*, 10(5), 1621-1636.
- Warren, C. M., & Landgraf, R. (2006). Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. *Cell Signal*, 18(7), 923-933.
- Waterman, H., Sabanai, I., Geiger, B., & Yarden, Y. (1998). Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J Biol Chem*, 273(22), 13819-13827.
- Wheeler, D. L., Huang, S., Kruser, T. J., Nechrebecki, M. M., Armstrong, E. A., Benavente, S., Gondi, V., Hsu, K.-T., & Harari, P. M. (2008). Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene*, 27(28), 3944-3956.
- Wiseman, S. M., Makretsov, N., Nielsen, T. O., Gilks, B., Yorida, E., Cheang, M., Turbin, D., Gelmon, K., & Huntsman, D. G. (2005). Coexpression of the type 1 growth factor receptor family members HER-1, HER-2, and HER-3 has a synergistic negative prognostic effect on breast carcinoma survival. *Cancer*, 103(9), 1770-1777.
- Wissner, A., & Mansour, T. S. (2008). The development of HKI-272 and related compounds for the treatment of cancer. *Arch Pharm (Weinheim)*, 341(8), 465-477.
- Woitok, M., Klose, D., Niesen, J., Richter, W., Abbas, M., Stein, C., Fendel, R., Bialon, M., Püttmann, C., Fischer, R., Barth, S., & Kolberg, K. (2016). The efficient elimination of solid tumor cells by EGFR-specific and HER2-specific scFv-SNAP fusion proteins conjugated to benzylguanine-modified auristatin F. *Cancer Lett*, 381(2), 323-330.
- Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., & Vogelstein, B. (1992). Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(7), 2965-2969.
- Xu, W., Marcu, M., Yuan, X., Mimnaugh, E., Patterson, C., & Neckers, L. (2002). Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20), 12847-12852.
- Yakes, F. M., Chinratanalab, W., Ritter, C. A., King, W., Seelig, S., & Arteaga, C. L. (2002). Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res*, 62(14), 4132-4141.
- Yamashita-Kashima, Y., Iijima, S., Yorozu, K., Furugaki, K., Kurasawa, M., Ohta, M., & Fujimoto-Ouchi, K. (2011). Pertuzumab in combination with trastuzumab shows significantly enhanced antitumor activity in HER2-positive human gastric cancer xenograft models. *Clin Cancer Res*, 17(15), 5060-5070.
- Yamazaki, C. M., Yamaguchi, A., Anami, Y., Xiong, W., Otani, Y., Lee, J., Ueno, N. T., Zhang, N., An, Z., & Tsuchikama, K. (2021). Antibody-drug conjugates with dual payloads for combating breast tumor heterogeneity and drug resistance. *Nat Commun*, 12(1), 3528.
- Yan, M., Parker, B. A., Schwab, R., & Kurzrock, R. (2014). HER2 aberrations in cancer: implications for therapy. *Cancer Treat Rev*, 40(6), 770-780.

- Yan, M., Schwaederle, M., Arguello, D., Millis, S. Z., Gatalica, Z., & Kurzrock, R. (2015). HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. *Cancer Metastasis Rev*, 34(1), 157-164.
- Yarden, Y. (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*, 37 Suppl 4, S3-8.
- Yarden, Y., & Pines, G. (2012). The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer*, 12(8), 553-563.
- Yarden, Y., & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2), 127-137.
- Yi, E. S., Harclerode, D., Gondo, M., Stephenson, M., Brown, R. W., Younes, M., & Cagle, P. T. (1997). High c-erbB-3 protein expression is associated with shorter survival in advanced non-small cell lung carcinomas. *Mod Pathol*, 10(2), 142-148.
- Yonesaka, K., Hirotani, K., von Pawel, J., Dediu, M., Chen, S., Copigneaux, C., & Nakagawa, K. (2017). Circulating heregulin level is associated with the efficacy of patritumab combined with erlotinib in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 105, 1-6.
- Yonesaka, K., Takegawa, N., Watanabe, S., Haratani, K., Kawakami, H., Sakai, K., Chiba, Y., Maeda, N., Kagari, T., & Hirotani, K. (2019). An HER3-targeting antibody–drug conjugate incorporating a DNA topoisomerase I inhibitor U3-1402 conquers EGFR tyrosine kinase inhibitor-resistant NSCLC. *Oncogene*, 38(9), 1398-1409.
- Yonesaka, K., Zejnullahu, K., Okamoto, I., Satoh, T., Cappuzzo, F., Souglakos, J., Ercan, D., Rogers, A., Roncalli, M., & Takeda, M. (2011). Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci Transl Med*, 3(99), 99ra86-99ra86.
- Yu, H., Baik, C., Gold, K., Hayashi, H., Johnson, M., Koczywas, M., Murakami, H., Nishio, M., Steuer, C., & Su, W. (2020). LBA62 Efficacy and safety of patritumab deruxtecan (U3-1402), a novel HER3 directed antibody drug conjugate, in patients (pts) with EGFR-mutated (EGFRm) NSCLC. *Ann Oncol*, 31, S1189-S1190.
- Zamanian-Daryoush, M., Lindner, D. J., DiDonato, J. A., Wagner, M., Buffa, J., Rayman, P., Parks, J. S., Westerterp, M., Tall, A. R., & Hazen, S. L. (2017). Myeloid-specific genetic ablation of ATP-binding cassette transporter ABCA1 is protective against cancer. *Oncotarget*, 8(42), 71965-71980.
- Zhang, J., Saba, N. F., Chen, G. Z., & Shin, D. M. (2015). Targeting HER (ERBB) signaling in head and neck cancer: An essential update. *Mol Aspects Med*, 45, 74-86.
- Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A., & Kuriyan, J. (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, 125(6), 1137-1149.
- Zhuang, G., Brantley-Sieders, D. M., Vaught, D., Yu, J., Xie, L., Wells, S., Jackson, D., Muraoka-Cook, R., Arteaga, C., & Chen, J. (2010). Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy. *Cancer Res*, 70(1), 299-308.
- Zuo, W.-J., Jiang, Y.-Z., Wang, Y.-J., Xu, X.-E., Hu, X., Liu, G.-Y., Wu, J., Di, G.-H., Yu, K.-D., & Shao, Z.-M. (2016). Dual Characteristics of Novel HER2 Kinase Domain Mutations in Response to HER2-Targeted Therapies in Human Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 22(19), 4859-4869.

FINANCIACIÓN

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada por Lucía Gandullo Sánchez en el Centro de Investigación del Cáncer-Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CIC-IBMCC) centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad de Salamanca (USAL). También han colaborado en este trabajo el Instituto de Biomedicina de Salamanca (IBSAL) y el Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer (CIBERONC).

La autora del trabajo ha sido beneficiaria de un contrato predoctoral (BES-2016-077748) del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). Esta beca está asociada a un proyecto de investigación concedido al Dr. Atanasio Pandiella (director de este trabajo) por el MINECO (BFU2015-71371-R). El trabajo que se desarrolla en el laboratorio del Dr. Atanasio Pandiella también está financiado por la Junta de Castilla y León, el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), la Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer (AECC), la Fundación CRIS contra el Cáncer, la Asociación Leonesa de Mujeres Operadas de cáncer de Mama (ALMOM) y la Asociación Ceutí de Mujeres Mastectomizadas (ACMUMA). El laboratorio del Dr. Atanasio Pandiella recibe apoyo adicional de la Comunidad Europea, a través del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Actualmente, Lucía Gandullo Sánchez está contratada por FEDER y la Junta de Castilla y León (Programa Operativo 2014.2020) a través de la Fundación de Investigación Del Cáncer (FICUS).

Parte del trabajo mostrado en esta tesis doctoral ha sido publicado en los siguientes artículos científicos:

- Ríos-Luci, C., Díaz-Rodríguez, E., **Gandullo-Sánchez, L.**, Díaz-Gil, L., Ocaña, A., & Pandiella, A. (2020). Adaptive resistance to trastuzumab impairs response to neratinib and lapatinib through deregulation of cell death mechanisms. *Cancer Lett*, 470, 161-169.
- **Gandullo-Sánchez, L.**, Capone, E., Ocana, A., Iacobelli, S., Sala, G., & Pandiella, A. (2020). HER3 targeting with an antibody-drug conjugate bypasses resistance to anti-HER2 therapies. *EMBO Mol Med*, 12(5), e11498.
- **Gandullo-Sánchez, L.**, Ocaña, A., & Pandiella, A. (2021). Generation of Antibody-Drug Conjugate Resistant Models. *Cancers*, 13(18), 4631.

Otros trabajos en los que se ha participado y que también han sido publicados:

- García-Alonso, S., Romero-Pérez, I., **Gandullo-Sánchez, L.**, Chinchilla, L., Ocaña, A., Montero, J. C., & Pandiella, A. (2021). Altered proTGF α /cleaved TGF α ratios offer new therapeutic strategies in renal carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1), 1-13.

AGRADECIMIENTOS

Me toca escribir la parte más personal y sin duda la más difícil de la Tesis Doctoral. Estos cuatro años han sido los más importantes y significativos de mi vida y resumirlos en tres páginas es un reto.

Me gustaría empezar agradeciendo su ayuda y confianza al Dr. Atanasio Pandiella. Gracias por confiar en mi trabajo y defenderlo tanto o más que yo. Me has hecho un regalo incalculable al permitirme sentir lo que es la satisfacción por la investigación. Espero que sigamos trabajando y disfrutando juntos muchos años más.

A mis compañeros de laboratorio, ha sido un privilegio trabajar con cada uno de ellos. Gracias especialmente a Elena y Juan Carlos por su dedicación y por guiarme en mis primeros pasos en el laboratorio. A Azucena, por su claridad y sinceridad, que nos han hecho entendernos tan bien durante estos años, y en profesional, por su ayuda a lo largo del doctorado y sus correcciones en la tesis. A Anita, Ari, Sara, Patricia, Adrián, Yolanda, Laura(s), Jorge, Javi, Cris, Álex e Idioa, por ser unos compañeros excelentes que me han hecho aprender mucho más en el terreno personal que en el profesional. Fany, conocerte es un regalo que me llevo del laboratorio y espero conservarlo durante toda la vida. Gracias, amiga, por tu ayuda durante todo este periodo, espero haber estado a la altura contigo. La distancia España-Perú no ha podido con nosotras, ni podrá. A mis chicas que llegaron más tarde, pero me dieron el oxígeno que necesitaba, Sofía, Inés y Sheila. Gracias por vuestra compañía y ayuda, por vuestra buena predisposición y por crear un buen ambiente de trabajo. Os deseo la mayor suerte en esta etapa emprendida y que cumpláis todos vuestros sueños en el terreno personal y profesional. A mis compañeros de otros laboratorios, en especial Raquel(es), Judith y Elena, por nuestras confidencias y desahogos en los pasillos. Habéis contribuido a que mi trabajo en este centro sea mucho más llevadero y divertido.

A todos los Servicios del Centro de Investigación del Cáncer, que contribuyen al funcionamiento de este lugar y que están siempre dispuestos a ayudar. Gracias a vuestro trabajo habéis hecho posible que yo cumpla un sueño.

A mi otra familia investigadora. Mi estancia en el laboratorio 108 del Instituto de Investigación de Sevilla no hizo más que avivar mis ganas por investigar. Gracias a todos mis compañeros, en especial a Marina y Mari Carmen, por ser buenas compañeras, pero aún mejores personas y amigas. Al Dr. Rafael Fernández Chacón, tus consejos, ayuda y entusiasmo han sido imprescindibles para mi

formación. Volver a tu laboratorio cada vez que voy a Sevilla es como ir a casa, solo trae cosas buenas. Dani, mi compadre, te conocí gracias al máster y le disté sentido a un año que parecía gris. Eres luz, diversión, descaro, transparencia, sinceridad, confianza, desahogo... en definitiva, amistad.

A los amigos que me llevo de Salamanca. Angie, quien diría que lo que empezó pedaleando en *spinning* acabaría siendo una amistad gracias al CIC. Gracias por escucharme en mis agonías y por saber transmitirme ánimos y confianza a través de tus consejos. Esto solo acaba de empezar. Ainhoa, nos conocimos de casualidad en Salamanca, pero estoy segura de que la vida nos hubiese unido en cualquier otro momento o lugar. Tú y Unai os habéis convertido para Juanfran y para mí en unos amigos muy especiales. Hicisteis de Salamanca nuestro hogar y espero seguir viviendo momentos tan únicos como hasta ahora a vuestro lado. A mis chicos de Altafit, en especial a Sara, Mauro, Natalia y Ramón, por las risas, bromas, copas, comidas, cenas y juegos de mesa que me han hecho sentirme arropada. Pero, sobre todo, gracias por querer y cuidar a lo más importante que tengo aquí conmigo en Salamanca. Toño, aunque quizás nunca llegues a leer esto, gracias por tu buen humor, por acompañarme cada día a casa después del gimnasio y por tu buena predisposición siempre. Personas como tú hacen de este mundo un lugar mejor. Guada, cuando nos conocimos en el gimnasio, cada una con sus problemas, no supimos vernos. Sin embargo, una de las cosas buenas de la pandemia es que consiguió abrirnos los ojos. A partir de ese momento, has sido uno de mis mayores apoyos en Salamanca. GRACIAS por aguantarme, apoyarme, escucharme, aconsejarme, comprenderme... como nadie había hecho hasta ahora aquí. Te aseguro que haré todo lo que este en mis manos para que esta amistad sea para siempre.

A mis amigos de toda la vida. Patri, her, estos años han sido duros, pero siempre que te he necesitado has estado ahí. Veinticinco años de amistad me siguen pareciendo pocos. Natalia y Celia, siempre que conseguimos reunirnos me hacéis sentir que el tiempo no pasa y que la amistad prevalece en el tiempo y la distancia. Mis gitanos, los amigos que la universidad me regaló. Javi, tu carisma y espontaneidad te hacen ser una persona única y especial. Marta, tu tranquilidad, comprensión y buen humor han sido imprescindibles para mí. Isa, desde Dublín hemos sabido seguir siendo amigas y confidentes. A mi otra compañera de seminario y vida, Clara, eres única. Tu sensibilidad hace de ti una persona que es

imposible no querer. Shaki, aunque te de coraje que te llamemos así, no imagino que sería de nosotros sin ti. Eres el motivo de acabar cada reunión llorando, de risas, claro está. Tu buen sentido del humor te hacen ser una amiga increíble. A María, que fue la última en llegar, pero la primera en sumarse a cualquier fiesta. Brindaremos pronto con vino rosado. En general, mis gitanos, gracias por aparecer en mi vida en el año 2011 en aquella clase de bioquímica y por hacer de esos 4 años los más felices de mi vida, los recordaré siempre con una sonrisa gracias a vosotros. Pero sobre todo gracias por quedaros aún conmigo, por nuestras reuniones, cenas, comidas, risas, viajes, ferias, confidencias, fiestas y sin fin de momentos que tengo atesorados para mí.

A mi familia, mis tíos, primos y familia política, por vuestra confianza en mí. A mis padres, por ser los mayores pilares que la vida me ha dado. Vuestra ayuda y comprensión han sido las herramientas que me han permitido llegar a donde estoy hoy. Vuestro amor, lo que ha hecho que este camino sea maravilloso. Mama, gracias por tus consejos y visitas durante estos cuatro años que me han arropado y permitido avanzar y cumplir un sueño. Papa, eres mi debilidad, mi felicidad va condicionada a la tuya. Gracias por anteponerme siempre a todo, nunca te podré devolver todo lo que haces por mí. A mi hermana, mi confidente en la distancia y mi mejor amiga, la que nunca falla. No hay obstáculos que no superemos juntas ni problemas a los que no le podamos encontrar solución. Eres mi para siempre. Os quiero por encima de todo.

A Juanfran. He conseguido no llorar hasta llegar aquí, pero contigo es imposible. Lo que me has hecho sentir durante estos 11 años es el regalo más maravilloso que me podrás dar. Tú siempre serás mi mayor descubrimiento y mi constante en este mundo caótico. Tú, más que nadie, sabes todo lo que he pasado estos cuatro años y tenerte aquí en Salamanca es lo que me ha hecho superar cada piedra en el camino. Llegar a casa, nuestro hogar, y tenerte, ha hecho que me acueste cada día con una sonrisa. No tengo dudas de que, pase lo que pase, eres el amor de mi vida. Gracias por ser mis alas y mis ganas de volar, por tu comprensión, ayuda, respeto y amor. Gracias por anteponer mis sueños a los tuyos. Gracias por ser tú y permitirnos ser nosotros. Gracias por concebir el amor como lo hago yo, bonito, sano, divertido, confidente, seguro, ... ETERNO.

ANEXOS

Anexo 1. Lista de p-valores exactos para los datos de la figura 14A

Grupos de comparación	Análisis estadístico	P-valor
Control vs trastuzumab en BT474	ANOVA bifactorial con corrección de Bonferroni	$5,667 \times 10^{-8}$
Control vs trastuzumab en BTRH		0,022
Control vs trastuzumab en BTRH#10		0,163
Entre todos los controles		1
Trastuzumab en BT474 vs trastuzumab en BTRH		0,000003
Trastuzumab en BT474 vs trastuzumab en BTRH#10		$7,439 \times 10^{-7}$
Trastuzumab en BTRH vs trastuzumab en BTRH#10		0,819

Anexo 2. Lista de p-valores exactos para los datos de la figura 16B

Grupos de comparación	Análisis estadístico	P-valor
Control vs trastuzumab en BT474	ANOVA bifactorial con corrección de Bonferroni	$1,003 \times 10^{-13}$
Control vs trastuzumab en BTRH		0,001375
Control vs trastuzumab en PDX118		$3,519 \times 10^{-16}$
Control vs trastuzumab en TR1		$5,716 \times 10^{-9}$
Control vs trastuzumab en TR2		$1,712 \times 10^{-9}$
Entre todos los controles		1
Trastuzumab en BT474 vs trastuzumab en BTRH		$7,775 \times 10^{-11}$
Trastuzumab en BT474 vs trastuzumab en PDX118		0,000056
Trastuzumab en BT474 vs trastuzumab en TR1		$9,050 \times 10^{-7}$
Trastuzumab en BT474 vs trastuzumab en TR2		0,000004
Trastuzumab en BTRH vs trastuzumab en PDX		$9,058 \times 10^{-14}$
Trastuzumab en BTRH vs trastuzumab en TR1		0,000083
Trastuzumab en BTRH vs trastuzumab en TR2		0,000018

Trastuzumab en PDX118 vs trastuzumab en TR1		6,209x10 ⁻¹¹
Trastuzumab en PDX118 vs trastuzumab en TR2		1,590x10 ⁻¹⁰
Trastuzumab en TR1 vs trastuzumab en TR2		1

Anexo 3. Lista de *p*-valores exactos para los datos de la figura 20

Grupos de comparación	Análisis estadístico	<i>P</i> -valor
Control vs EV20/MMAF en BT474	ANOVA de una vía con corrección de Welch seguido de la prueba post-hoc de Games-Howell	0,015
Control vs NRG en BT474		0,648
Control vs NRG+EV20/MMAF en BT474		0,018
NRG vs EV20/MMAF en BT474		0,010
NRG vs NRG+EV20/MMAF en BT474		0,011
NRG+EV20/MMAF vs EV20/MMAF en BT474		0,016
Control vs EV20/MMAF en BTRH		0,004
Control vs NRG en BTRH		0,499
Control vs NRG+EV20/MMAF en BTRH		0,002
NRG vs EV20/MMAF en BTRH		0,009
NRG vs NRG+EV20/MMAF en BTRH		0,009
NRG+EV20/MMAF vs EV20/MMAF en BTRH		0,026

Anexo 4. Lista de *p*-valores exactos para los datos de la figura 24B

Grupos de comparación	Análisis estadístico	<i>P</i> -valor
shC vs shHER3 #1	ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni	0,000004
shC vs shHER3 #2		4,286x10 ⁻⁷
shHER3 #1 vs shHER3 #2		0,0005

Anexo 5. Lista de p-valores exactos para los datos de la figura 36A

Grupos de comparación	Análisis estadístico	P-valor
Control vs EV20/MMAF (3,3 mg/kg)	ANOVA de una vía con corrección de Welch seguido de la prueba post-hoc de Games-Howell	0,039
Control vs EV20/MMAF (10 mg/kg)		0,034
Control vs EV20		1
EV20 vs EV20/MMAF (3,3 mg/kg)		0,010
EV20 vs EV20/MMAF (10 mg/kg)		0,008
EV20/MMAF (3,3 mg/kg) vs EV20/MMAF (10 mg/kg)		0,482

*El análisis estadístico presentado en esta tabla se realizó para las últimas medidas realizadas.

Anexo 6. Lista de p-valores exactos para los datos de la figura 41A

Grupos de comparación	Análisis estadístico	P-valor
Control vs trastuzumab	ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni	1
Control vs EV20/MMAF		$2,6686 \times 10^{-7}$
Control vs EV20		1
EV20 vs EV20/MMAF		$3,0355 \times 10^{-7}$
EV20 vs trastuzumab		1
Trastuzumab vs EV20/MMAF		$1,2872 \times 10^{-7}$

*El análisis estadístico presentado en esta tabla se realizó para las últimas medidas realizadas.

Anexo 7. Lista de p-valores exactos para los datos de la figura 44A

Grupos de comparación	Análisis estadístico	P-valor
Control vs trastuzumab	ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni	1
Control vs EV20/MMAF		$9,8897 \times 10^{-7}$
Control vs EV20		0,008731
EV20 vs EV20/MMAF		0,007886
EV20 vs trastuzumab		0,004650
Trastuzumab vs EV20/MMAF		$8,6914 \times 10^{-7}$

*El análisis estadístico presentado en esta tabla se realizó para las últimas medidas realizadas.

Anexo 8. Lista de p-valores exactos para los datos de la figura 48A

Grupos de comparación	Análisis estadístico	P-valor
Control vs T-DM1	ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni	0,112047
Control vs EV20/MMAF		0,000004
Control vs EV20		1

EV20 vs EV20/MMAF		0,000002
EV20 vs T-DM1		0,029783
T-DM1 vs EV20/MMAF		0,000214

*El análisis estadístico presentado en esta tabla se realizó para las últimas medidas realizadas.