



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Nuevas estrategias frente a receptores de la familia ErbB/HER y sus ligandos en cáncer

Tesis Doctoral

Inés Romero Pérez

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

CSIC-Universidad de Salamanca

Salamanca, noviembre 2023

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

CERTIFICA

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Nuevas estrategias frente a receptores de la familia ErbB/HER y sus ligandos en cáncer” presentada por Dña. Inés Romero Pérez, graduada en Biología por la Universidad de Girona, 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 3 de noviembre de 2023.

Fdo: Atanasio Pandiella Alonso

Director de la tesis doctoral

A Miguel

A mis padres

*"El trabajo duro vence al talento cuando el talento no trabaja
duro"*

Tim Notke

ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN	25
1. RECEPTORES ERBB/HER Y SUS LIGANDOS	27
1.1. Miembros de la familia ErbB/HER	27
1.2. Estructura y activación de los receptores	27
1.3. Ligandos de la familia del EGF	29
1.3.1. TGF α	30
1.4. Rutas de señalización mediadas por los receptores ErbB/HER.....	32
1.5. Implicación de los receptores ErbB/HER y sus ligandos en cáncer	32
1.5.1. EGFR	33
1.5.2. HER2	33
1.5.3. Ligandos de la familia del EGF	33
1.5.3.1. TGF α	34
2. TERAPIAS DIRIGIDAS CONTRA LOS RECEPTORES ERBB/HER	34
2.1. Anticuerpos monoclonales.....	36
2.2. Inhibidores de la actividad tirosina quinasa.....	37
2.2.1. Mecanismo de acción	37
2.2.2. Mecanismos de resistencia	38
2.3. Anticuerpos conjugados a fármacos	39
2.3.1. Diseño del ADC	40
2.3.1.1. Selección del antígeno	40
2.3.1.2. Selección del anticuerpo	40
2.3.1.3. Diseño del <i>linker</i>	41
2.3.1.4. Bioconjugación	42
2.3.1.5. Selección del agente citotóxico	43
2.3.1.6. Mecanismo de acción.....	44
2.3.1.7. Mecanismos de resistencia	46
2.4. Receptores de antígeno quimérico (CARs).....	47
3. CÁNCER DE RIÑÓN.....	50
3.1. Epidemiología.....	50
3.2. Clasificación.....	50
3.3. Tratamiento.....	53
4. CÁNCER DE PÁNCREAS.....	54
4.1. Epidemiología.....	54
4.2. Clasificación.....	55
4.3. Tratamiento.....	56

5. CÁNCER DE MAMA	58
5.1. Epidemiología.....	58
5.2. Clasificación.....	59
5.3. Tratamiento.....	63
OBJETIVOS	67
MATERIALES Y MÉTODOS	71
1. REACTIVOS Y ANTICUERPOS.....	73
1.1. Reactivos	73
1.2. Anticuerpos	74
1.2.1. Producción de anticuerpos policlonales.....	76
1.2.1.1. Acoplamiento de los péptidos.....	76
1.2.1.1.1. TGF α (Tail)	76
1.2.1.2. Obtención de los antiseros.....	76
1.2.1.2.1. TGF α (Tail)	76
1.2.1.2.2. DXd	77
1.2.2. Producción de anticuerpos monoclonales	77
1.2.3. Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad	77
1.2.4. Generación de anticuerpos conjugados a fármacos	79
1.2.4.1. Conjugación a SMCC-DM1.....	79
1.2.4.2. Conjugación a DXd y MMAF	79
2. CULTIVOS CELULARES	80
2.1. Líneas celulares	80
2.2. Condiciones de cultivo y mantenimiento.....	81
2.3. Preservación de líneas celulares	81
3. MODIFICACIONES GENÉTICAS	82
3.1. Transfección con plásmidos	82
3.2. Transducción con lentivirus y retrovirus	82
3.3. Modificación génica mediante shRNA	83
3.4. Modificación génica mediante CRISPR/Cas9.....	84
3.5. Reconstitución génica de <i>EGFR</i> y <i>TGFA</i> en clones CRISPR	84
3.6. Ensayos de proliferación celular	85
3.6.1. Metabolización de MTT.....	85
3.6.2. Contaje celular.....	85
4. CITOMETRIA DE FLUJO.....	86
4.1. <i>Single-cell sorting</i>	86
5. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN	86

5.1.	Construcción del vector retroviral pLZR_hTGF α y vectores CAR	86
5.1.1.	Reacción en cadena de la polimerasa	87
5.1.2.	Digestión mediante enzimas de restricción y ligación	89
6.	SECUENCIACIÓN DE NOVO DE LAS REGIONES VARIABLES DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-TGFα	90
6.1.	Extracción y purificación de RNA	90
6.2.	Síntesis de cDNA a partir de RNA: RT-PCR	90
6.3.	Clonación de las regiones variables en pCR TM 2.1-TOPO-TA [®]	92
6.4.	Alineamiento y análisis de datos.....	92
6.5.	PCR híbrida	92
7.	MICROARRAYS DE RNA	93
7.1.	Extracción y purificación del RNA.....	93
7.2.	Cuantificación, análisis de calidad e hibridación del RNA	93
7.3.	Análisis de datos.....	94
8.	ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	94
8.1.	Preparación de lisados celulares	94
8.2.	Inmunoprecipitación	94
8.3.	Inmunoprecipitación en superficie	95
8.4.	Biotinilación de TGF α en la superficie celular	95
8.5.	Detección de TGF α soluble en el medio de cultivo	95
8.6.	Electroforesis y <i>Western Blot</i>	96
8.7.	<i>Arrays</i> de proteínas	97
9.	INMUNOFLUORESCENCIA	98
9.1.	Internalización del anti-TGF α -mAb y colocalización con LAMP-1	98
10.	ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	99
10.1.	Activación del receptor de EGF	99
10.2.	Capacidad bloqueante de los anticuerpos anti-TGF α	99
11.	ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	100
11.1.	Cepas de ratón y mantenimiento de los animales.....	100
11.2.	Producción de xenoinjertos	100
12.	ESTUDIOS <i>IN SILICO</i>	101
13.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	101
	BIBLIOGRAFÍA.....	103
	FINANCIACIÓN	125
	AGRADECIMIENTOS.....	129

ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP-binding cassette transporter</i> Transportador del casete de unión a ATP
ACD	<i>Acquired cystic disease</i> Enfermedad quística adquirida
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i> Desintegrina y metaloproteasa
ADEX	<i>Aberrantly differentiated endocrine exocrine</i> Exocrino endocrino con diferenciación aberrante
ADC	<i>Antibody-drug conjugate</i> Anticuerpo conjugado a fármaco
ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i> Quinasa del linfoma anaplásico
AREG	<i>Amphiregulin</i> Anfiregulina
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i> Ataxia telangiectasia mutada
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> Ácido bicinconínico
BCL	<i>B-cell lymphoma</i> Linfoma de células B
BRCA1	<i>Breast cancer type 1 susceptibility protein</i> Proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 1
BRCA2	<i>Breast cancer type 2 susceptibility protein</i> Proteína de susceptibilidad al cáncer de mama de tipo 2
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> Albúmina sérica bovina
bsAbs	<i>Biespecific antibodies</i> Anticuerpos biespecíficos
BTC	<i>Betacellulin</i> Betacelulina
CAR-T	<i>Chimeric antigen receptor T-cell</i> Célula T con receptor de antígeno quimérico
CCLE	<i>Cancer Cell Line Encyclopedia</i> Enciclopedia de líneas celulares cancerosas
CCR	Carcinoma de células renales
CCPRCC	<i>Clear cell papillary renal cell carcinoma</i> Carcinoma papilar de células renales de células claras
ccRCC	<i>Clear cell renal cell carcinoma</i> Carcinoma de células renales de células claras

CD3ζ	<i>Cluster of differentiation 3ζ</i> Clúster de diferenciación 3ζ
CDC	<i>Complement-dependent cytotoxicity</i> Citotoxicidad dependiente del complemento
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> Ciclina dependiente de quinasa
cDNA	<i>Complementary DNA</i> ADN complementario
CDR	<i>Complementarity-determining region</i> Región determinante de la complementariedad
chRCC	<i>Chromophobe renal cell carcinoma</i> Carcinoma de células renales cromóforas
CKS1	<i>Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1</i> Subunidad reguladora 1 de quinastas dependientes de ciclina
CM	Cáncer de mama
CNBr	<i>Cyanogen bromide</i> Bromuro de cianógeno
CP	<i>Pancreatic cancer</i> Cáncer de páncreas
CQ	Cloroquina
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas
CSC	<i>Cancer stem cell</i> Célula madre cancerosa
CSPG5	<i>Chondroitin sulfate proteoglycan 5</i> Proteoglicano 5 condroitín sulfato
CTLA-4	<i>Cytotoxic t-lymphocyte antigen 4</i> Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos
DAR	<i>Drug-antibody ratio</i> Ratio fármaco-anticuerpo
DEGs	<i>Deregulated genes</i> Genes desregulados
DM1	<i>Emtansine</i> Mertansina
DMA	<i>Dimethylacetamide</i> Dimetilacetamida
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's médium</i> Medio de Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> Dimetil sulfóxido

DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> Ácido desoxirribonucleico
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i> Deoxinucleótido trifosfato
DXd	<i>Deruxtecan</i> Deruxtecan
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i> Transición epitelio-mesénquima
EPGN	<i>Epigen/epithelial mitogen</i> Mitógeno epitelial
ER	<i>Estrogen receptor</i> Receptor de estrógenos
EREG	<i>Epiregulin</i> Epiregulina
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> Clasificación de células activadas por fluorescencia
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> Suero bovino fetal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> Administración de alimentos y medicamentos
FH	<i>Fumarate hydratase</i> Fumarato hidratasa
FR	<i>Framework Regions</i> Regiones marco
HBEGF	<i>Heparin binding EGF like growth factor</i> Factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina
HER	<i>Human epidermal growth factor receptor</i> Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
HER2-E	<i>HER-2 enriched</i> HER-2 enriquecido
Hh	<i>Hedgehog</i> Hedgehog
HLRCC	<i>Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer</i> Leiomiomatosis hereditaria y cáncer de células renales
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> Peroxidasa de rábano
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>

	Proteína de shock térmico de 90 kDa
ICI	<i>Immune checkpoint inhibitor</i> Inhibidor de puntos de control inmunológico
IF	<i>Immunofluorescence</i> Inmunofluorescencia
IFNα	<i>Interferon alpha</i> Interferón alfa
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> Factor de crecimiento similar a la insulina
IgG	<i>Immunoglobulin G</i> Inmunoglobulina G
IHQ	<i>Immunohistochemistry</i> Inmunohistoquímica
IL-2	<i>Interleukin-2</i> Interleuquina-2
IMGT	<i>Immunogenetics</i> Inmunogenética
IP	<i>Immunoprecipitation</i> Inmunoprecipitación
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i> Hemocianina de lapa
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma virus</i> Virus del sarcoma de rata Kirsten
KRH	<i>Krebs-Ringer-HEPES buffer</i> Tampón Krebs-Ringer-HEPES
LAMP1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i> Proteína 1 de membrana asociada a lisosoma
mAb	<i>Monoclonal antibody</i> Anticuerpo monoclonal
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> Proteína quinasa activada por mitógeno
MBS	<i>3-maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester</i> N-hidroxisuccinimida del ácido m-maleibenzoico
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> Proteína quinasa quinasa activada por mitógeno
MGP	<i>Matrix Gla protein</i> Matriz de proteína Gla
MiT	<i>Microphthalmia transcription factor</i> Factor de transcripción de microftalmia
MMAF	<i>Monomethyl auristatin F</i> Monometil-auristatina F

MMLV-RT	<i>Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase</i> Trasncriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney
mRNA	<i>Messenger RNA</i> ARN mensajero
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> Diana de la rapamicina en mamíferos
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NEAA	<i>Non-essential amino acids</i> Aminoácidos no esenciales
NEM	<i>N-ethylmaleimide</i> N-etilmaleimida
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cell</i> Factor nuclear de células T activadas
NRG	<i>Neuregulin</i> Neuregulina
NSLC	<i>Non-small cell lung cancer</i> Carcinoma de pulmón no microcítico
OMS	Organización mundial de la salud
PADI3	<i>Peptidyl arginine deiminase 3</i> Peptidil arginina deiminasa 3
PALB2	<i>Partner and localizer of BRCA2</i> Socio y localizador de BRCA2
PARP	<i>Poly-ADP ribose polymerase</i> Poli-ADP-ribosa-polimerasa
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> Tampón de fosfato salino
PCA	<i>Principal component analysis</i> Análisis de componentes principales
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	<i>Programmed death 1</i> Muerte programada 1
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i> Adenocarcinoma ductal pancreático
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i> Ligando 1 de muerte programada
PDX1	<i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i> Homeobox 1 pancreático y duodenal
PEGPH20	<i>PEGylated recombinant human hyaluronidase</i> Hialuronidasa humana recombinante pegilada

PI3K	<i>Phosphatidyl inositol 3-kinase</i> Fosfatidilinositol-3-quinasa
PKM2	<i>Pyruvate kinase M2</i> Piruvato quinasa M2
PLCY	<i>Phospholipase C gamma</i> Fosfolipasa C gamma
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PR	<i>Progesterone receptor</i> Receptor de progesterona
pRCC	<i>Papillary renal cell carcinoma</i> Carcinoma papilar de células renales
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> Fosfatasa homóloga a la tensina
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> Difluoruro de polivinilideno
ROI	<i>Region of interest</i> Region de interés
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> Instituto conmemorativo del parque Roswell
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i> Receptor tirosina quinasa
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
scFv	<i>A single-chain variable fragment</i> Fragmento variable de cadena sencilla
SDH	<i>Succinate dehydrogenase</i> Succinato deshidrogenasa
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SERPINB5	<i>Serpin Family B Member 5</i> Miembro 5 de la familia Serpina B
SFK	<i>Src family of protein tyrosine kinases</i> Familia Src de proteínas tirosina quinasas
SG	<i>Sacitumab govitecan</i> Sacitumab govitecan
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i> ARN de orquilla corta
SIRT2	<i>Silent Mating Type Information Regulation 2 Homolog-2</i> Homólogo 2 de la regulación de información de tipo de apareamiento silencioso 2

SMART	<i>Switching mechanism at the 5' end of RNA transcript</i> Mecanismo de cambio en el extremo 5' del transcrito de RNA
SRC	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase sarcoma</i> Proto-oncogén de la proteína-tirosina quinasa de sarcoma
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i> Transductor de señales y activador de transcripción
TBS-T	<i>Tris-buffer saline with Tween</i> Tampón Tris salino con Tween
TCEP	<i>Tris (2-carboxyethyl) phosphine</i> Tris (2-carboxietil) fosfina
T-DM1	<i>Ado-trastuzumab emtansine</i> Ado-trastuzumab emtansina
T-DXd	<i>Trastuzumab deruxtecan</i> Trastuzumab deruxtecan
TGFα	<i>Transforming growth factor alpha</i> Factor de crecimiento y transformación de tipo alfa
TKI	<i>Tyrosine kinase inhibitor</i> Inhibidor de tirosina quinasa
TME	<i>Tumor microenvironment</i> Microambiente tumoral
TNBC	<i>Triple negative breast cancer</i> Cáncer de mama triple negativo
TRCC	<i>Translocation renal cell carcinoma</i> Carcinoma de células renales por translocación
TROP2	<i>Trophoblast cell-surface antigen 2</i> Antígeno de superficie celular del trofoblasto 2
TRUCKs	<i>T-cells redirected for antigen-unrestricted cytokine-initiated killing</i> Células T redirigidas para la destrucción iniciada por citoquinas sin restricción de antígeno
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> Factor de crecimiento del endotelio vascular
v-erbB	<i>Erythroblastic leukemia viral oncogene B</i> Oncogén viral de la leucemia de eritroblastosis B
V_H	<i>Variable heavy chain</i> Cadena pesada variable
VHL	<i>Von Hippel-Lindau</i>
V_L	<i>Variable light chain</i> Cadena ligera variable
WB	<i>Western blot</i>
Wnt	<i>Wingless-related integration site</i> Sitio de integración relacionado con wingless

WT *Wild type*
Forma silvestre

INTRODUCCIÓN

1. RECEPTORES ERBB/HER Y SUS LIGANDOS

1.1. Miembros de la familia ErbB/HER

Los receptores de la familia ErbB/HER pertenecen a la súper familia de receptores tirosina quinasa (RTKs) (Carreón et al., 2012), y está compuesta por cuatro miembros: receptor para el crecimiento epidérmico EGFR/ErbB1/HER, c-Neu/ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 y ErbB4/HER4 (Tebbutt, Pedersen, & Johns, 2013). La actividad de estos receptores se encuentra regulada por factores de crecimiento, y median una amplia variedad de respuestas celulares para responder correctamente a las señales del entorno (Tebbutt, Pedersen, & Johns, 2013; Zaczek, Brandt, & Bielawski, 2005). Además, los receptores ErbB se expresan en una amplia variedad de tejidos de origen epitelial, mesenquimal y neuronal, donde juegan un papel importante tanto en el desarrollo, proliferación como en la diferenciación celular (Olayioye et al., 2000). Por todo ello, la sobreexpresión, amplificación o la adquisición de mutaciones en estos receptores se asocia al desarrollo de numerosos tipos de cáncer, convirtiéndolos en importantes dianas terapéuticas (Appert-Collin et al., 2015; Olayioye et al., 2000).

1.2. Estructura y activación de los receptores

Todos los miembros de la familia de receptores ErbB/HER presentan la misma estructura: 4 subdominios extracelulares (I-V) que forman el dominio de unión al ligando, una región hidrofóbica transmembrana, y una región intracelular donde se encuentra el dominio con actividad tirosina quinasa y la cola C-terminal con potenciales sitios de fosforilación (Leahy, 2004; Olayioye et al., 2000).

La activación de los receptores se produce tras la unión del ligando a los subdominios I y III de la región extracelular (Burgess et al., 2003; Olayioye et al., 2000). Este suceso produce un cambio conformacional en la estructura del receptor, que pasa de una conformación cerrada o inactiva a una conformación activa, que supone la exposición del brazo de dimerización localizado en el subdominio II (Figura 1) (Burgess et al., 2003). La exposición de dicho brazo conduce a la dimerización entre receptores idénticos (homodimerización) o diferentes (heterodimerización) de la misma familia de receptores HER (Linggi & Carpenter, 2006; Olayioye et al., 2000). En consecuencia, se produce la estimulación de la actividad tirosina quinasa del dominio intracelular de

ambos receptores (Olayioye et al., 2000), además de la autofosforilación de los residuos de tirosina específicos del extremo C-terminal (Linggi & Carpenter, 2006; Olayioye et al., 2000). Los residuos fosforilados sirven como sitio de unión de distintas moléculas intracelulares, que están involucradas en la activación de las vías de señalización “aguas abajo” del receptor (Linggi & Carpenter, 2006; Marmor, Skaria, & Yarden, 2004; Olayioye et al., 2000). Los posteriores efectos sobre la expresión génica determinan la respuesta biológica a la activación del receptor (Olayioye et al., 2000).

A pesar de que los receptores ErbB/HER siguen una estructura general compartida, existen algunas peculiaridades que hacen a HER2 y HER3 distintos de los demás. Por un lado, no se ha encontrado ningún ligando que active al receptor HER2 (Cho et al., 2003; Hynes & Lane, 2005). La estructura de su región extracelular es diferente a las demás, y el brazo de dimerización está siempre expuesto (Hynes & Lane, 2005). Este hecho hace que HER2 sea el receptor preferido para los otros receptores activos, ya que se encuentra siempre preparado para su heterodimerización (Burgess et al., 2003; Hynes & Lane, 2005; Marmor, Skaria, & Yarden, 2004). Por otro lado, el receptor HER3 presenta una actividad catalítica ineficiente (Trenker, Diwanji, & Jura, 2021). Este hecho produce que su señalización dependa de la interacción con otros receptores activos, principalmente de HER2 (Burgess et al., 2003; Linggi & Carpenter, 2006).

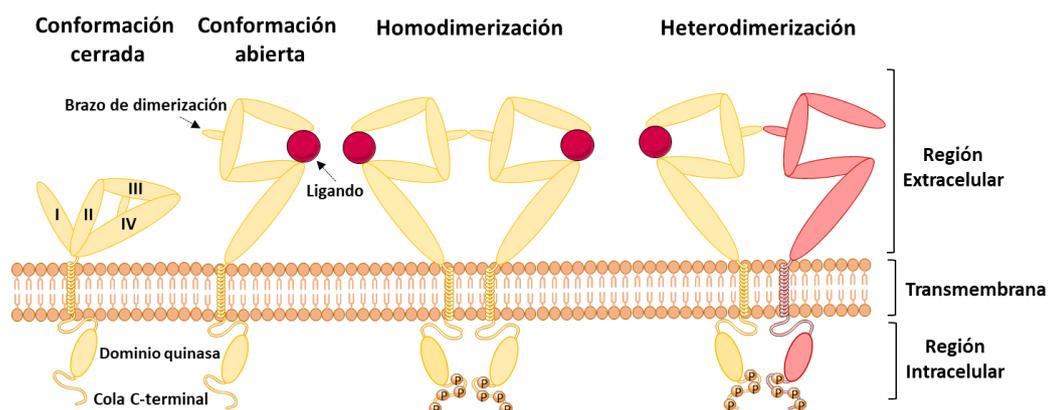


Figura 1. Estructura y activación de los receptores ErbB/HER. Cuando el ligando se une a los dominios I y III del receptor, el dominio extracelular sufre un cambio conformacional que conlleva a la exposición del brazo de dimerización. Este hecho produce que interacte con otros receptores con conformación abierta, ya sean iguales (homodimerización) o distintos (heterodimerización) a él. Este proceso da lugar a la activación del dominio tirosina quinasa de ambos receptores, con la consecuente fosforilación de los residuos tirosina del dominio C-terminal que activarán las distintas vías de señalización intracelular.

1.3. Ligandos de la familia del EGF

Los ligandos que se unen y activan a los receptores ErbB pertenecen a la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), ya que se caracterizan por presentar al menos un dominio EGF en su estructura (Massague & Pandiella, 1993; Normanno et al., 2005). La mayoría de ellos se producen como precursores transmembrana, que se procesan posteriormente por la acción de proteasas, principalmente de la familia ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*; desintegrina y metaloproteasa) (Massague & Pandiella, 1993; Olayioye et al., 2000). Este procesamiento da lugar a la liberación del ligando soluble activo (Massague & Pandiella, 1993; Olayioye et al., 2000; Singh & Harris, 2005). Además, los ligandos precursores que no han sido escindidos también pueden activar los receptores HER de otras células, mediante el proceso de activación yuxtacrina (Fuller, Sivarajah, & Sugden, 2008; Singh & Harris, 2005).

El dominio EGF de los ligandos de la familia de receptores ErbB está compuesto por aproximadamente 50 aminoácidos. Éstos incluyen seis residuos de cisteína que forman tres puentes disulfuro responsables de definir tanto su estructura como su especificidad de unión al receptor (Fuller, Sivarajah, & Sugden, 2008; Normanno et al., 2005). Los cuatro receptores son reconocidos por una multitud de ligandos extracelulares, que se unen a uno o más receptores ErbB, y que se pueden clasificar en tres grupos según su especificidad de unión (Figura 2) (Fuller, Sivarajah, & Sugden, 2008; Lemmon, 2009; Normanno et al., 2005; Roskoski, 2004):

- **Especificidad por EGFR:** EGF, TGF α (*transforming growth factor alpha*; factor de crecimiento y transformación de tipo alfa) y AREG (*amphiregulin*; anfiregulina).
- **Especificidad por EGFR y HER4:** BTC (*betacellulin*; betacelulina), HBEGF (*heparin binding EGF like growth factor*; factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina), EREG (*epiregulin*; epiregulina) y EPGN (*epigen/epithelial mitogen*; mitógeno epitelial).
- **Especificidad por HER3 y HER4:** NRG1 y 2 (*neuregulin*; neuregulina) con especificidad por HER3 y HER4; NRG3 y 4, con especificidad por HER4; y CSPG5 (*chondroitin sulfate proteoglycan 5*; proteoglicano 5 condroitín sulfato), con especificidad por HER3.

Tal y como se ha comentado anteriormente, aún no se ha descrito ningún ligando directo que produzca la activación de HER2 (Olayioye et al., 2000).

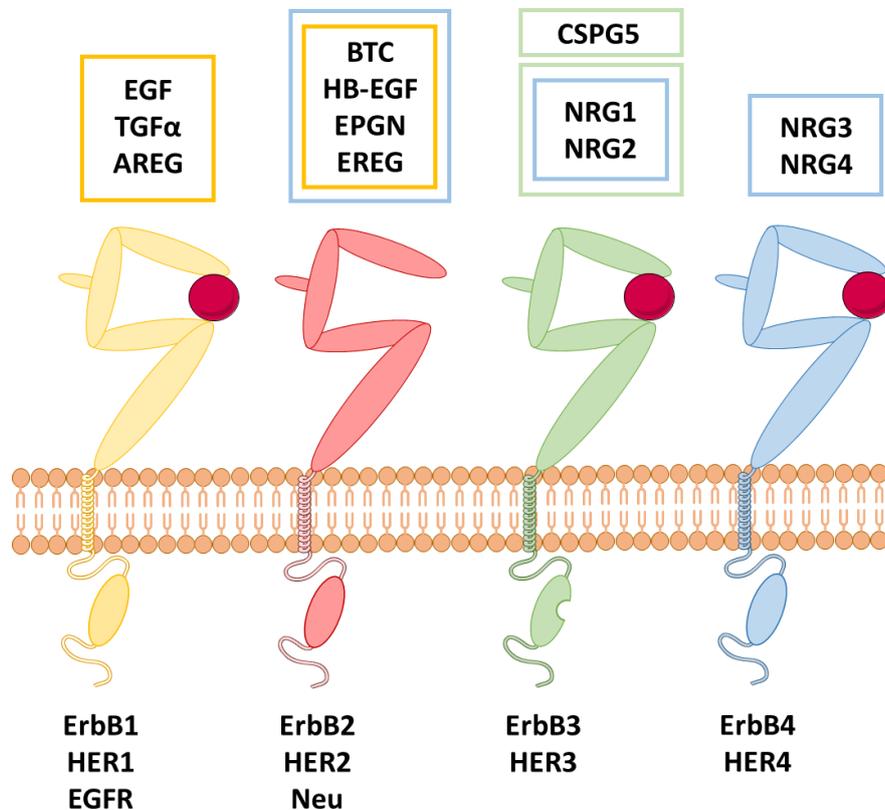


Figura 2. Receptores de la familia ErbB/HER y sus ligandos. La familia de receptores ErbB/HER está compuesta por cuatro miembros: EGFR, HER2, HER3 y HER4. Excepto HER2, la activación de cada uno de ellos se encuentra mediada por factores de crecimiento específicos de la familia del EGF, que producen el inicio de una determinada respuesta celular.

1.3.1. TGF α

El factor de crecimiento y transformación de tipo α (TGF α), es un polipéptido de 50 aminoácidos que forma parte de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Junier et al., 1994), y es uno de los principales ligandos del receptor de EGF (Burgess et al., 2003).

El gen que codifica por el *TGFA* humano se encuentra en el brazo corto del cromosoma 2 (2p13), y abarca una región de 138,7 kb. Su transcrito, de 4326 bases, codifica por un péptido de 160 aminoácidos (Derynck, 1992; Singh & Coffey, 2014). Esta forma precursora comienza con una secuencia señal en la región N-terminal de 20-22 aminoácidos que se elimina del resto del precursor entre los residuos alanina (Ala) y

leucina (Leu), durante su translocación a la luz del retículo endoplasmático (Brachmann et al., 1989; Singh & Coffey, 2014). La escisión del péptido señal da lugar a su forma de 17-18 kDa, denominada pro-TGF α , que una vez llega a la superficie celular sufre dos escisiones por metaloproteasas entre los residuos de alanina y valina (Val), tanto distales como proximales al dominio EGF (Bosenberg, Pandiella, & Massague, 1993; Brachmann et al., 1989; Singh & Coffey, 2014). Este hecho permite la liberación del TGF α soluble maduro de 6 kDa al medio extracelular (Pandiella & Massague, 1991; Singh & Coffey, 2014). Como resultado, queda una forma truncada de TGF α anclada en la membrana de las células de 15 kDa (Cola/Tail), que presenta un dominio extracelular corto (Brachmann et al., 1989), seguido de una cadena hidrofóbica transmembrana y un dominio citoplasmático de 39 aminoácidos (Figura 3) (Brachmann et al., 1989; Kumar, Bustin, & McKay, 1995). No solo la forma soluble de TGF α es capaz de activar al receptor, ya que su forma precursora de membrana también ejerce un papel importante en la estimulación de EGFR, dada por el contacto entre célula-célula (Anklesaria et al., 1990; Brachmann et al., 1989).

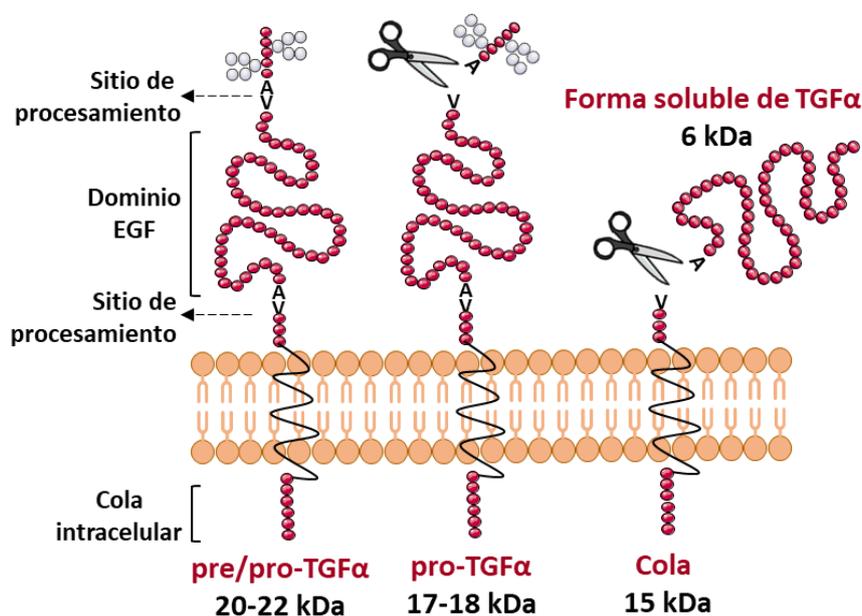


Figura 3. Procesamiento de TGF α . Durante la translocación de TGF α hacia la membrana celular, la pro-forma de 22 kDa es escindida a la altura del péptido señal. La forma resultante de 17-18 kDa expuesta en la superficie de las células sufre dos procesos proteolíticos que liberan el TGF α soluble activo. Este hecho deja su forma procesada de 15 kDa anclada en membrana de las células. El ligando soluble de 6 kDa resultante será el responsable, conjuntamente con la pro-forma no escindida de 17 kDa, de activar al receptor de EGF tanto de la propia célula como de las células adyacentes.

1.4. Rutas de señalización mediadas por los receptores ErbB/HER

La activación de los receptores ErbB/HER mediante la unión de sus ligandos produce la fosforilación de los residuos de tirosina ubicados principalmente en el dominio C-terminal (Linggi & Carpenter, 2006; Olayioye et al., 2000). Estos residuos de fosfotirosina son puntos de reclutamiento de proteínas adaptadoras que darán lugar a la activación de distintas vías de señalización celular (Eccles, 2011; Yarden & Sliwkowski, 2001). Los sitios de autofosforilación, y por lo tanto las proteínas y vías de señalización intracelular que se activen, serán determinadas tanto por el tipo de ligando como por los receptores que dimericen durante el proceso de activación (Hynes & MacDonald, 2009; Yarden & Sliwkowski, 2001). Esto desencadenará una determinada respuesta celular, que se verá reflejada en procesos clave como la proliferación, migración, metabolismo y/o supervivencia celular (Eccles, 2011; Yarden & Sliwkowski, 2001).

Cabe destacar que aunque los distintos receptores ErbB comparten la activación de diferentes vías de señalización, cada receptor tiene preferencia de activación por una determinada ruta (Yarden & Sliwkowski, 2001). Por ejemplo, los receptores HER3 y HER4 activan directamente la vía de PI3K, por lo que su potencia sobre ella es mayor, a diferencia de los receptores EGFR y HER2, que necesitan de proteínas adaptadoras para su activación (Eccles, 2011; Yarden & Sliwkowski, 2001).

1.5. Implicación de los receptores ErbB/HER y sus ligandos en cáncer

Tal y como se ha comentado anteriormente, debido al papel fundamental que desempeñan los receptores ErbB/HER en el control de las funciones fisiológicas de las células, su sobreexpresión o la aparición de mutaciones que puedan alterar su funcionamiento pueden ser responsables de la aparición de patologías oncológicas (Appert-Collin et al., 2015; Eccles, 2011; Hynes & Lane, 2005). Por ello, el estudio de las alteraciones de los receptores ErbB es clave para el desarrollo de terapias dirigidas que puedan combatir esta enfermedad (Appert-Collin et al., 2015). A continuación, se detallará el papel de los receptores EGFR, HER2, y del ligando TGF α en cáncer, por ser los 3 focos de mayor relevancia en este estudio.

1.5.1. EGFR

La función fisiológica de EGFR es regular principalmente el desarrollo y la homeostasis del tejido epitelial (Sigismund, Avanzato, & Lanzetti, 2018). Por ello, alteraciones en su expresión se encuentran relacionadas con múltiples tipos de cáncer, como por ejemplo de pulmón, mama, cabeza y cuello, y páncreas, entre otros (Sigismund, Avanzato, & Lanzetti, 2018; Wang, 2017). Sus alteraciones pueden deberse tanto a la amplificación del gen EGFR como a la sobreexpresión, mutación o delección de la proteína (Roskoski, 2014).

1.5.2. HER2

Tanto la amplificación como la sobreexpresión de HER2 se ha observado en aproximadamente el 20% de los cánceres de mama, comprendiendo un subconjunto separado de pacientes con esta patología (Yan et al., 2014). En el cáncer gástrico avanzado, alrededor del 20% de los pacientes también muestra amplificación o sobreexpresión de HER2 (Bose et al., 2013; Yan et al., 2014). Además del cáncer de mama y gástrico, actualmente se han descrito una variedad de tumores que sobreexpresan y/o exhiben amplificación del gen HER2 (Yan et al., 2014). Más recientemente, se han detectado mutaciones somáticas del gen HER2 en una variedad de tipos de cáncer humano, en los que se incluyen el cáncer de mama, pulmón, ovario y colon (Connell & Doherty, 2017; Yan et al., 2014). Estas alteraciones pueden producir la adquisición de resistencias a las actuales terapias dirigidas contra HER2 (Bose et al., 2013; Cocco et al., 2019).

1.5.3. Ligandos de la familia del EGF

La sobreproducción de ligandos de la familia del EGF es uno de los mecanismos por los que las células tumorales activan aberrantemente a los receptores ErbB/HER (Arteaga & Engelman, 2014; Yarden & Sliwkowski, 2001). Estos ligandos pueden provenir tanto del estroma como de la propia célula tumoral (Arteaga & Engelman, 2014). De todos los ligandos que componen la familia del EGF, el papel de TGF α en cáncer es el mejor caracterizado (Arteaga & Engelman, 2014; Yarden & Sliwkowski, 2001).

1.5.3.1. TGF α

Se ha descrito que TGF α actúa como un potente mitógeno en células epiteliales y fibroblastos, y puede funcionar como factor angiogénico *in vivo* en las células endoteliales de los capilares (Ciardiello et al., 1991; Yeh & Yeh, 1989). Dado que una de las principales características de TGF α es su capacidad de promover la proliferación de las células, se ha demostrado que éste podría servir como marcador tumoral en distintos tipos de cáncer (Ilio, Sensibar, & Lee, 1995; Laird, Brown, & Fausto, 1994). Hasta ahora, los tipos de carcinomas en los que se ha asociado una expresión anormal de TGF α incluyen el cáncer de hígado, gastrointestinal, mama, piel, pulmón, cerebro y páncreas, entre otros (Sandgren et al., 1990; Yeh & Yeh, 1989). Además, su sobreexpresión se encuentra frecuentemente relacionada con la sobreexpresión de EGFR, hecho que genera un fuerte *loop* autocrino entre ligando y receptor que promueve el crecimiento de las células tumorales (Kumar, Bustin, & McKay, 1995; Laird, Brown, & Fausto, 1994).

El estudio de Jhappan (Jhappan et al., 1990), demostró que el efecto de la sobreproducción de TGF α en ratones transgénicos produjo la aparición de carcinomas hepatocelulares multifocales, además de un crecimiento excesivo de las células que revisten el conducto epitelial de la glándula mamaria. El páncreas de estos ratones también mostró una fibrosis intersticial progresiva y una metaplasia acinar-ductal, un proceso clave para el desarrollo del cáncer de páncreas (Humphreys & Hennighausen, 2000; Jhappan et al., 1990).

2. TERAPIAS DIRIGIDAS CONTRA LOS RECEPTORES ERBB/HER

En la última década, los avances significativos en el tratamiento contra el cáncer han supuesto un aumento en la supervivencia y calidad de vida de los pacientes (Abou-Jawde et al., 2003). Entre ellos, se incluye el desarrollo de nuevas terapias dirigidas que permiten actuar de forma bastante selectiva contra las células tumorales (Padma, 2015). Este hecho supone un menor daño a las células sanas del tejido, lo que reduce los numerosos efectos secundarios producidos por la inespecificidad de los demás tratamientos (Abou-Jawde et al., 2003; Padma, 2015).

En este sentido, la implicación de los receptores ErbB/HER en la formación, crecimiento y comportamiento invasivo de las células tumorales les ha convertido en

una interesante diana terapéutica en el tratamiento contra el cáncer (D. Chen et al., 2021; Mosesson & Yarden, 2004). La mayoría de terapias dirigidas contra ellos se resumen en dos categorías: anticuerpos monoclonales (mAb, *monoclonal antibody*) y moléculas pequeñas inhibidoras de la actividad tirosina quinasa (TKIs, *tyrosine kinase inhibitors*). Además, existe una tercera categoría derivada de los anticuerpos monoclonales, denominada ADCs (*antibody-drug conjugates*, anticuerpos conjugados a fármacos) y una nueva modalidad emergente basada en la terapia de células T con receptores de antígeno quimérico (CAR-T, *chimeric antigen receptor T-cells*). Actualmente, no existe ningún CAR-T aprobado para el uso clínico contra los receptores ErbB/HER (Wang, Yuan, & Xue, 2023). A continuación, se resumen en la Tabla 1 las principales terapias dirigidas utilizadas en la práctica clínica contra estos receptores.

Tabla 1. Terapias dirigidas contra los receptores HER aprobadas para su uso en la práctica clínica.

Nombre genérico/comercial	Diana	Uso clínico
Anticuerpos monoclonales		
Cetuximab (Erbix®)	EGFR	-Cáncer de cabeza y cuello -Cáncer colorectal EGFR+ sin KRAS mutado
Panitumumab (Vectibix®)	EGFR	-Cáncer colorectal metastásico EGFR+ sin KRAS mutado
Necitumumab (Portrazza®)	EGFR	-NSCLC* escamoso metastásico
Nimotuzumab (Theraloc®)	EGFR	-Cáncer de cabeza y cuello -Cáncer de páncreas
Amivantamab-vmjw (Rybrevant®)	EGFR/MET*	-NSCL con inserción en el exon 20 de EGFR -NSCLC
Trastuzumab (Herceptin®) y sus derivados	HER2	-Cáncer de mama y gástrico HER2+ metastásico
Pertuzumab (Perjeta®)	HER2	-Cáncer de mama HER2+ metastásico
Margetuximab (Margenza®)	HER2	-Cáncer de mama HER2+ metastásico
MCLA-128 (Zenocutuzumab®)	HER2/HER3	-Cáncer de mama -Cáncer de pulmón -PDAC* -NSCLC

Inhibidores tirosina quinasa		
Gefitinib (Iressa®)	EGFR	-NSCLC delección en el exón 21 o mutación L858R en EGFR
Erlotinib (Tarceva®)	EGFR	-NSCLC con delección en el exón 19 o mutación L858R en EGFR -Cáncer de páncreas metastásico
Osimeritinib (Tagrisso®)	EGFR	-NSCLC con mutacion T790M en EGFR
Vandetanib (Caprelesa®)	EGFR	-Cáncer de tiroides metastásico
Lapatinib (Tykerb®)	EGFR/HER2	-Cáncer de mama HER2+ metastásico
Tucatinib (Tukysa®)	HER2	-Cáncer de mama HER2+ metastásico
Neratinib (Nerlynx®)	EGFR/HER2/HER4	-Cáncer de mama HER2+ metastásico
Afatinib (Giotrif®)	EGFR/HER2/HER4	-NSCLC con mutaciones activadoras en EGFR
Dacomitinib (Vizimpro®)	EGFR/HER2/HER4	-NSCLC con mutaciones activadoras en EGFR
Anticuerpos conjugados a fármacos		
Trastuzumab emtansina (T-DM1, Kadcyła®)	HER2	-Cáncer de mama HER2+ metastásico
Trastuzumab deruxtecan (T-DXd, DS-8201a, Enhertu®)	HER2	-Cáncer de mama y gástrico HER2+ metastásico

*NSCLC: *non-small-cell lung cancer*; cáncer de pulmón de células no pequeñas. PDAC: *pancreatic ductal adenocarcinoma*; adenocarcinoma ductal pancreático. MET: tirosina-proteína quinasa MET.

2.1. Anticuerpos monoclonales

Existen cuatro mecanismos a través de los cuales los anticuerpos monoclonales ejercen su efecto antitumoral: bloqueo de la señalización mediada por el receptor, activación de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o de anticuerpos (ADCC), e inducción de la inmunidad adaptativa (Galluzzi et al., 2012; Scott, Allison, & Wolchok, 2012; Shuptrine, Surana, & Weiner, 2012). El primer mecanismo se produce a partir de la unión directa del mAb al receptor, que impide tanto la unión de su ligando como la dimerización entre receptores (Scott, Allison, & Wolchok, 2012). Este mecanismo es utilizado por ejemplo por cetuximab, un anticuerpo monoclonal anti-EGFR que induce la parada del ciclo celular y la apoptosis de las células tumorales tras

bloquear tanto la unión de sus ligandos como la dimerización del receptor (Scott, Allison, & Wolchok, 2012; Shuptrine, Surana, & Weiner, 2012).

2.2. Inhibidores de la actividad tirosina quinasa

2.2.1. Mecanismo de acción

Los inhibidores de la actividad tirosina quinasa (TKIs) son una familia de pequeñas moléculas o péptidos capaces de inhibir la actividad catalítica de proteínas quinasas, ya sean receptoras o citosólicas (Bonanno, Jirillo, & Favaretto, 2011; Cismowski, 2006). Esta inhibición se produce al interferir directamente con el sitio de unión del ATP o determinados sustratos al dominio catalítico de las proteínas (Bonanno, Jirillo, & Favaretto, 2011). Los TKIs sintetizados contra los receptores ErbB pueden unirse a ellos tanto de manera reversible como irreversible, y pueden inhibir de manera simultánea a distintos receptores de la misma familia (Arora & Scholar, 2005; Robert, 2011). En consecuencia, la inhibición de su actividad reprime las distintas vías de señalización intracelular que se encuentran asociadas (Arora & Scholar, 2005).

En cuanto a los TKIs contra EGFR, estos se clasifican en tres grupos principales: inhibidores reversibles de primera generación (gefitinib, erlotinib y lapatinib); inhibidores irreversibles de segunda generación (afatinib, dacomitinib y neratinib); e inhibidores de tercera generación (AZD9291 y CLO-1686). Estos últimos se dirigen principalmente a la mutación T790M, que se asocia a la resistencia adquirida a los TKIs de primera generación en NSCLC (Reardon, Wen, & Mellingerhoff, 2014). Gefitinib y erlotinib, utilizados principalmente en el tratamiento del cáncer de pulmón, han mostrado el espectro más amplio de efectos secundarios sobre la piel y cabello, incluyendo varios tipos de alopecia (Du et al., 2021; Hartmann et al., 2009). Lapatinib, a diferencia de los dos anteriores, es un inhibidor dual tanto de EGFR como HER2 (Hartmann et al., 2009). Su uso se ha limitado principalmente a pacientes con cáncer de mama metastásico avanzado, en los que el tratamiento con trastuzumab ha fracasado (Hartmann et al., 2009; Tiwari, Mishra, & Abraham, 2016; Voigtlaender, Schneider-Merck, & Trepel, 2018). En cuanto a neratinib, es un TKI que se une irreversiblemente a distintos receptores de la familia HER, incluyendo EGFR, HER2 y HER4 (Tiwari, Mishra, & Abraham, 2016). Su uso se ha centrado principalmente, al igual que lapatinib, en el

tratamiento adyuvante de pacientes con cáncer de mama HER2+ que han dejado de responder a trastuzumab. Se ha demostrado, además, que el uso de neratinib puede superar la resistencia adquirida a otros fármacos, causada principalmente por mutaciones en HER2 (Tiwari, Mishra, & Abraham, 2016; Wu et al., 2023).

2.2.2. Mecanismos de resistencia

Tal y como se ha comentado anteriormente, cada vez existen más evidencias que demuestran las modificaciones genéticas o epigenéticas que adquieren las células tumorales para resistir a los tratamientos con TKIs (Bonanno, Jirillo, & Favaretto, 2011). Aunque la gran mayoría son de origen desconocido, se ha conseguido identificar algunos de los mecanismos más comunes (Figura 4):

- **Alteración de los niveles del RTK:** La resistencia adquirida que se desarrolla en la mayoría de pacientes con enfermedad avanzada resulta en la pérdida o disminución de los niveles de expresión del propio oncogén (Tortora, 2011; Wilks, 2015). En consecuencia, se produce una pérdida o disminución de la efectividad del TKI (Tortora, 2011). Por ejemplo, se ha descrito que en células de NSCLC una disminución en la expresión de EGFR puede causar la resistencia a erlotinib (Haque et al., 2020).
- **Mutaciones en el dominio tirosina quinasa:** Hasta el momento, se han descrito más de 100 mutaciones causantes de la resistencia a TKIs. Entre ellas, las más comunes afectan al dominio tirosina quinasa del receptor, produciendo la pérdida de afinidad de los TKIs por su sitio de unión. Otras mutaciones pueden causar que el ATP quede unido de forma permanente a la quinasa (Bonanno, Jirillo, & Favaretto, 2011). La mutación T790M de EGFR, por ejemplo, se encuentra localizada en un punto clave del dominio catalítico, que produce una mayor afinidad del ATP por su sitio de unión en comparación al TKI (Bonanno, Jirillo, & Favaretto, 2011; Uribe, Marrocco, & Yarden, 2021).
- **Activación de vías de señalización compensatorias:** Por ejemplo, la amplificación del RTK MET se encuentra en el 20% de pacientes con NSCLC con resistencia a gefitinib y erlotinib (Bonanno, Jirillo, & Favaretto, 2011). Los cambios de expresión en proteínas intermediarias con actividad quinasa pueden producir la activación

permanente de las vías de señalización “aguas abajo” del receptor (Wilks, 2015). La activación constitutiva de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR, por ejemplo, se ha datado como responsable de la adquisición de resistencias a lapatinib en cáncer de mama HER2+ (D'Amato et al., 2015; Wilks, 2015).

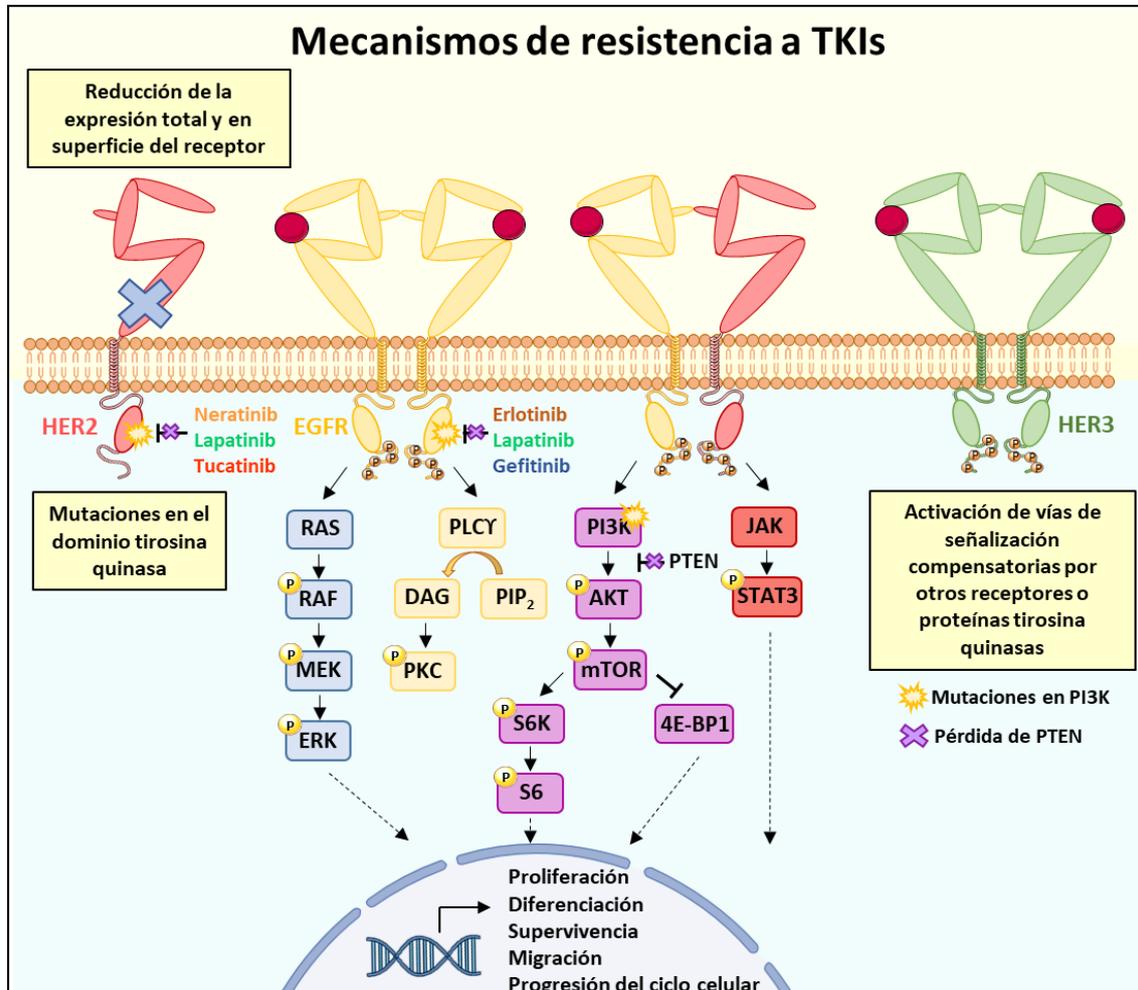


Figura 4. Resumen esquemático de los principales mecanismos de resistencia a TKIs. Entre los mecanismos de resistencia adquirida más comúnmente registrados se encuentran: (i) reducción de la expresión del receptor diana; (ii) mutaciones en el dominio tirosina quinasa que producen una disminución de la capacidad de unión del TKI al receptor y; (iii) activación de vías de señalización compensatorias por otros RTKs o TKs.

2.3. Anticuerpos conjugados a fármacos

A pesar del beneficio clínico que ha supuesto el desarrollo de terapias dirigidas, los posibles efectos tóxicos que pueden llegar a producir han supuesto un problema a lo largo de su uso en la práctica clínica (Marei, Cenciarelli, & Hasan, 2022; Zahavi & Weiner, 2020). Los anticuerpos conjugados a fármacos (ADCs), han supuesto un tratamiento

alternativo prometedor, ya que utilizan la especificidad de los anticuerpos monoclonales para dirigir cargas citotóxicas hacia un antígeno diana, que se encuentra diferencialmente expresado en la superficie de las células tumorales (Abuhelwa, Alloghbi, & Nagasaka, 2022; Khongorzul et al., 2020). La estructura de los ADCs incluye tres partes principales: (i) el anticuerpo monoclonal responsable de reconocer al antígeno en la superficie de la célula tumoral, (ii) el agente citotóxico responsable de matar a la célula cancerosa una vez liberado en su interior y (iii), el enlace o *linker* que conecta el anticuerpo y la carga citotóxica (Kostova et al., 2021). Hasta la fecha, la FDA ha aprobado el uso de un total de trece ADCs para el tratamiento de tumores sólidos y neoplasias hematológicas (Martin et al., 2023; Yin et al., 2023).

2.3.1. Diseño del ADC

La seguridad y eficacia de los ADCs viene determinada por la correcta selección de sus componentes: antígeno diana, anticuerpo monoclonal, tipo de agente citotóxico y el *linker* que unirá el anticuerpo a la carga (Khongorzul et al., 2020).

2.3.1.1. Selección del antígeno

Para la óptima selección de la diana molecular, el antígeno debe tener una serie de características: (i) estar altamente expresado en las células tumorales y con baja o nula expresión en las células sanas (Diamantis & Banerji, 2016; Khongorzul et al., 2020; Marei, Cenciarelli, & Hasan, 2022). HER2, por ejemplo, se expresa casi 100 veces más en las células tumorales HER2+ que en el tejido sano (Diamantis & Banerji, 2016; Khongorzul et al., 2020); (ii) encontrarse expuesto en la superficie de las células tumorales para que el ADC en circulación pueda unirse a él (Khongorzul et al., 2020); y (iii), el antígeno diana debe tener la capacidad de internalizar para facilitar el transporte del ADC al interior de la célula, y liberar ahí al agente citotóxico para que ejerza su acción (Diamantis & Banerji, 2016; Khongorzul et al., 2020).

2.3.1.2. Selección del anticuerpo

El anticuerpo monoclonal es el componente principal del diseño y estructura del ADC (Abuhelwa, Alloghbi, & Nagasaka, 2022; Khongorzul et al., 2020). Este debe estar dirigido contra un antígeno único y específico en la célula tumoral y con mínima reactividad cruzada e inmunogenicidad con el tejido normal (Abuhelwa, Alloghbi, & Nagasaka, 2022; Marei, Cenciarelli, & Hasan, 2022). Los anticuerpos que tienen baja

especificidad por el antígeno pueden causar toxicidades no deseadas al interactuar con las células sanas, o provocar la eliminación prematura del ADC antes de que llegue al propio tumor (Marei, Cenciarelli, & Hasan, 2022). De los cinco tipos de inmunoglobulina que pueden tener los anticuerpos (M, A, D, E y G) (Diamantis & Banerji, 2016), la IgG1 es la más utilizada para el diseño de ADCs (Abuhelwa, Alloghbi, & Nagasaka, 2022; Diamantis & Banerji, 2016). Esto es debido a su fácil fabricación en comparación a otras IgGs, su baja eliminación durante la circulación y su alta capacidad de activar distintas funciones inmunes, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (Abuhelwa, Alloghbi, & Nagasaka, 2022; Diamantis & Banerji, 2016). Como ejemplo tendríamos a T-DM1, un ADC contra HER2 que conserva el mecanismo de acción del anticuerpo no conjugado (trastuzumab) y que es capaz de activar la ADCC (Diamantis & Banerji, 2016; Krop & Winer, 2014), produciendo una mayor respuesta antitumoral.

2.3.1.3. Diseño del *linker*

El enlace o *linker* utilizado para la unión entre el anticuerpo y el agente citotóxico es un factor determinante de la farmacocinética, índice terapéutico y eficacia del propio ADC (Diamantis & Banerji, 2016). Por ello, el *linker* debe estar diseñado para ser estable en el torrente sanguíneo y no liberar al citotóxico del ADC antes de llegar a la diana molecular, ocasionando toxicidad fuera de ella (Diamantis & Banerji, 2016; Marei, Cenciarelli, & Hasan, 2022). Al mismo tiempo, debe ser capaz de liberar la carga de manera eficiente una vez el ADC haya internalizado (Diamantis & Banerji, 2016). Los enlaces utilizados pueden ser de dos tipos: escindibles y no escindibles:

- **Enlaces no escindibles:** Son enlaces que permanecen estables en la circulación sistémica y requieren una degradación completa del anticuerpo para que se produzca la liberación del fármaco acoplado (Abuhelwa, Alloghbi, & Nagasaka, 2022; Marei, Cenciarelli, & Hasan, 2022). Por lo tanto, los agentes citotóxicos no se liberan fuera de la diana celular, lo que reduce los posibles efectos tóxicos en las células sanas (Khongorzul et al., 2020; McKertish & Kayser, 2021). El ADC es internalizado de forma específica y posteriormente se degrada en los lisosomas de la célula diana. Es ahí cuando el fármaco se libera y se acumula dentro de la célula

tumoral, donde ejerce su principal función citotóxica (Diamantis & Banerji, 2016; McKertish & Kayser, 2021).

- **Enlaces escindibles:** A pesar de ser menos estables en la circulación sanguínea en comparación a los enlaces no escindibles, son el principal grupo de enlaces utilizados en el diseño de ADCs (Khongorzul et al., 2020; McKertish & Kayser, 2021). Los enlaces escindibles están diseñados para liberar el agente citotóxico una vez el ADC llega a la célula diana (McKertish & Kayser, 2021). Tras su internalización, el enlace es escindido mediante cambios ambientales, ya sean cambios en el potencial redox, pH o por la acción de enzimas proteolíticas, que producen la liberación del fármaco libre dentro de la célula (Diamantis & Banerji, 2016; Khongorzul et al., 2020). En algunos casos, el citotóxico libre puede difundir a través de la membrana celular y matar a las células circundantes, produciendo el denominado efecto *bystander* (Diamantis & Banerji, 2016; McKertish & Kayser, 2021). Los enlaces escindibles pueden ser de dos tipos: escindibles químicamente o enzimáticamente. Algunas de las enzimas que producen este procesamiento se encuentran sobreexpresadas en las propias células tumorales, como es el caso de la catepsina B (McKertish & Kayser, 2021). En cuanto a la escisión química, ésta puede ser de dos tipos: sensible al ambiente ácido, como es el microambiente tumoral, el lisosoma (pH 4,8) o el endosoma (pH 5-6), o sensibles al glutatión, el cual suele estar sobreexpresado también en las células tumorales (Diamantis & Banerji, 2016; Khongorzul et al., 2020; McKertish & Kayser, 2021).

2.3.1.4. Bioconjugación

El proceso de conjugación, que une el anticuerpo al agente citotóxico, es un proceso clave que determina la potencialidad del ADC. Este proceso no debe alterar ni la integridad ni el funcionamiento del anticuerpo, y tampoco su capacidad de unión al antígeno (Abdollahpour-Alitappeh et al., 2019). Por lo general, los métodos de conjugación más utilizados son mediante los residuos de aminoácidos lisina (Lys) y cisteína (Cys), expuestos en las cadenas del anticuerpo (McKertish & Kayser, 2021). Los residuos de lisina son de fácil conjugación, ya que se encuentran expuestos directamente en la superficie de las cadenas del anticuerpo (Abdollahpour-Alitappeh et al., 2019; McKertish & Kayser, 2021). Aunque la estructura de la IgG tenga más de 80

residuos de lisina (Abdollahpour-Alitappeh et al., 2019), no llega a diez el número de residuos que acaban siendo accesibles para la conjugación (McKertish & Kayser, 2021). A diferencia de las lisinas, solo se encuentran 16 pares de residuos de cisteína dentro de la secuencia de la IgG (Abdollahpour-Alitappeh et al., 2019). Para que estos puedan quedar expuestos y accesibles a la conjugación, es necesario que previamente se reduzcan los cuatro enlaces disulfuro presentes entre las cadenas del anticuerpo, mediante el uso de disolventes (Abdollahpour-Alitappeh et al., 2019; Kostova et al., 2021; McKertish & Kayser, 2021). Para mejorar estos métodos de conjugación, se han empezado a desarrollar otras estrategias alternativas, como la conjugación de los citotóxicos a glutamina, glicanos, o a aminoácidos no naturales y etiquetas peptídicas cortas incorporadas artificialmente (McKertish & Kayser, 2021; Zhou, 2017).

Otro factor importante a tener en cuenta es la cantidad de moléculas de agente citotóxico que se cargan en el anticuerpo a través del *linker* (DAR, *drug to antibody ratio*; ratio fármaco-anticuerpo). La unión de pocas moléculas del fármaco producirá una menor eficacia del ADC, aunque un exceso de las mismas puede afectar a su estructura y estabilidad, que puede conllevar a una mayor toxicidad sistémica (Diamantis & Banerji, 2016; Tang et al., 2017). Aunque no se haya determinado un DAR óptimo para el diseño de un ADC, lo más común es que este valor se encuentre entre 4 y 8 (Adem et al., 2014; Diamantis & Banerji, 2016). Por ejemplo, T-DM1 presenta un DAR de 3,5, sacitumab govitecan de 7,6, y T-DXd de 8 (Tang et al., 2017).

2.3.1.5. Selección del agente citotóxico

Para poder crear un buen ADC, es crucial elegir un potente agente citotóxico que ejerza los máximos efectos tóxicos con una dosis mínima (Diamantis & Banerji, 2016; McKertish & Kayser, 2021). Además, debe ser estable tanto en la circulación sistémica como dentro de los lisosomas, presentar una baja inmunogenicidad, pequeño peso molecular, y un tiempo de vida largo (Khongorzul et al., 2020; McKertish & Kayser, 2021).

Se utilizan dos categorías principales de agentes citotóxicos para el desarrollo de ADCs: inhibidores de microtúbulos y fármacos que dañan al DNA. En el primer grupo, encontraríamos los análogos de la auristatina (MMAE, MMAF) y los maitansinoides (DM1 y DM4) (Diamantis & Banerji, 2016; McKertish & Kayser, 2021). Entre ellos, los análogos de la auristatina son los agentes citotóxicos más utilizados para el diseño de

ADCs. Ambos MMAE y MMAF son agentes antimetabólicos que bloquean el proceso de polimerización de la tubulina, provocando la parada del ciclo celular y la consecuente apoptosis de las células (Diamantis & Banerji, 2016). El segundo grupo incluye agentes de rotura de doble cadena (caliqueamicina), agentes alquilantes (duocarmicina), reticulantes (dímero de pirrolbenzodiazepina-PBD), intercalantes (doxorubicina) e inhibidores de la DNA topoisomerasa I (exatecán) (Diamantis & Banerji, 2016; McKertish & Kayser, 2021). A continuación, se muestra en detalle todos los componentes que forman parte de la estructura de un ADC (Figura 5):

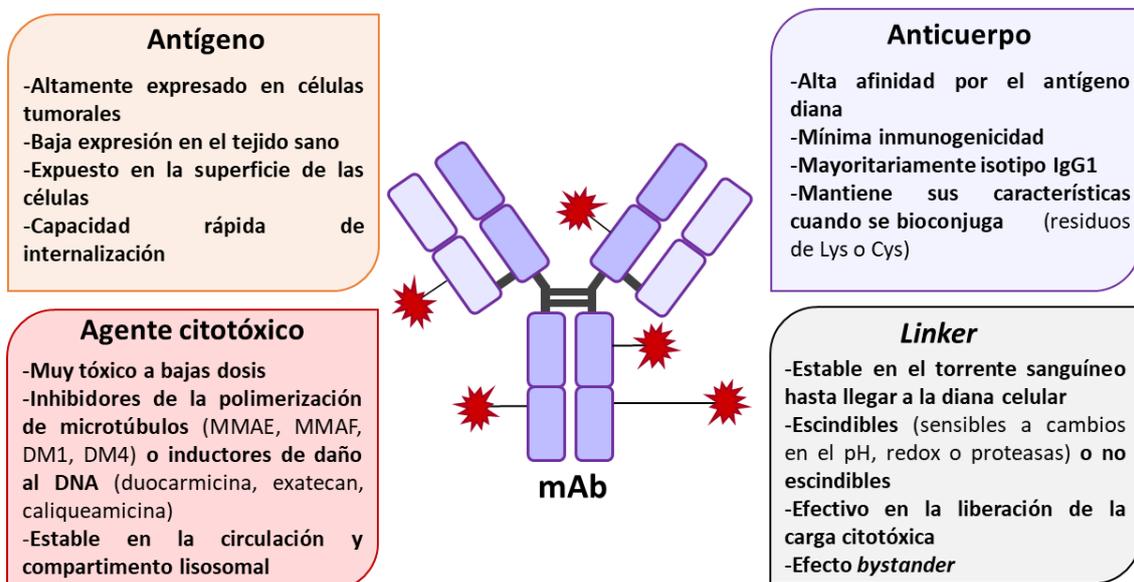


Figura 5. Estructura y características de un ADC y su antígeno diana. Los ADCs se encuentran formados por tres unidades estructurales: el anticuerpo monoclonal, dirigido específicamente a una diana molecular, la cual se encuentra altamente expresada en las células tumorales en comparación a las células del tejido sano; el enlace o *linker*, el cual es necesario que sea estable durante la circulación del ADC por el torrente sanguíneo, y puede tener la capacidad de ser escindido o no; y el agente citotóxico, que será el causante de matar a la célula tumoral a través de inhibir la polimerización de los microtúbulos o ejerciendo un daño directo sobre el DNA.

2.3.1.6. Mecanismo de acción

Los ADCs se administran a los pacientes por vía intravenosa y se desplazan por el torrente sanguíneo hasta alcanzar su diana molecular en la superficie de las células (Abdollahpour-Alitappeh et al., 2019; Khongorzul et al., 2020). Tras darse el reconocimiento antígeno-anticuerpo, el complejo internaliza mediante endocitosis mediada por receptores hasta llegar a los lisosomas de la célula (Abuhelwa, Alloghbi, & Nagasaka, 2022; Khongorzul et al., 2020). Este proceso puede darse a través de tres

mecanismos: (i) endocitosis mediada por clatrina (ruta principal de internalización de los ADCs), (ii) endocitosis mediada por caveolas y (iii) pinocitosis (Abdollahpour-Alitappeh et al., 2019; Khongorzul et al., 2020). Posteriormente, el ambiente ácido y rico en proteasas del lisosoma produce la descomposición del complejo antígeno-ADC, lo que permite la liberación del fármaco citotóxico (Abuhelwa, Alloghbi, & Nagasaka, 2022; Marei, Cenciarelli, & Hasan, 2022). El citotóxico libre puede finalmente actuar sobre sus dianas moleculares (polimerización de los microtúbulos o DNA), induciendo la muerte de la célula tumoral (Abdollahpour-Alitappeh et al., 2019; Marei, Cenciarelli, & Hasan, 2022). Además, si el fármaco liberado es permeable, puede difundir fuera de la célula diana y matar a células cercanas que expresen o no el antígeno diana del ADC. Este mecanismo se denomina “efecto *bystander*” (Abdollahpour-Alitappeh et al., 2019; Abuhelwa, Alloghbi, & Nagasaka, 2022) (Figura 6).

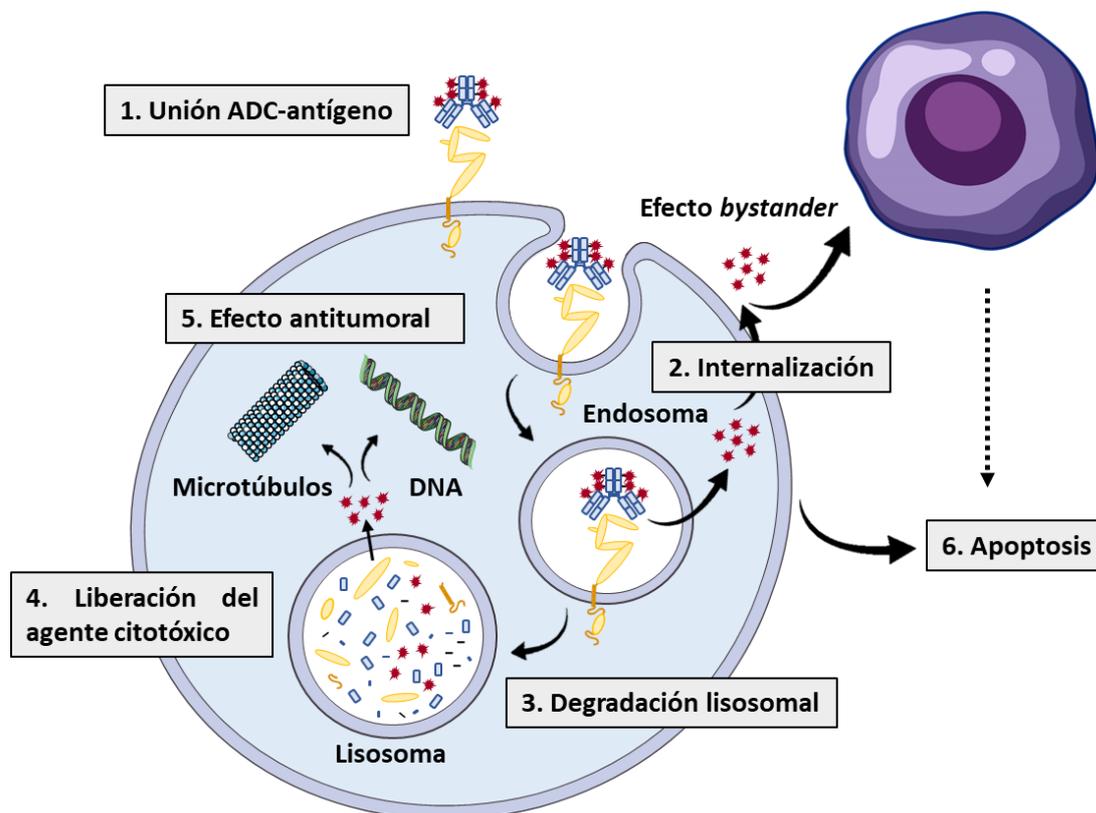


Figura 6. Esquema del mecanismo de acción de los ADCs. Tras la administración intravenosa del tratamiento, el ADC se une al antígeno específico expuesto en la superficie de las células diana (1). La unión produce la internalización del complejo antígeno-ADC (2), que progresa a través de la vía endocítica hasta que se degrada en el lisosoma (3). La degradación causada por el ambiente ácido del compartimento o por la acción de enzimas proteolíticas produce la liberación del agente citotóxico al citoplasma (4). Éste ejerce finalmente su acción antitumoral, afectando a la polimerización de los microtúbulos o directamente al DNA (5), produciendo la muerte de la célula tumoral (6). Además, la difusión del fármaco a través de la membrana celular puede producir la muerte de otras células cercanas (efecto *bystander*).

El mecanismo comentado anteriormente produce que aquellos tumores con expresión heterogénea del antígeno puedan beneficiarse de este efecto, el cual viene dado tanto por el tipo de *linker* como del agente citotóxico utilizado (Abdollahpour-Alitappeh et al., 2019). El fármaco “emtansina”, utilizado en el ADC T-DM1 no puede penetrar la membrana de las células, por lo que su efecto *bystander* se encuentra limitado (Abuhelwa, Alloghbi, & Nagasaka, 2022).

2.3.1.7. Mecanismos de resistencia

Aunque los ADCs supongan un método ideal de administración de fármacos tóxicos a las células tumorales, la resistencia a estos tratamientos sigue siendo un obstáculo en el tratamiento contra el cáncer (Khongorzul et al., 2020). Esta resistencia puede haber existido desde el inicio del tratamiento (resistencia primaria o *de novo*) o surgido después del tratamiento con el fármaco (resistencia secundaria o adquirida) (Khongorzul et al., 2020; Marei, Cenciarelli, & Hasan, 2022). En general, los mecanismos de resistencia a los ADCs pueden surgir frente a cualquiera de sus componentes (mAb o fármaco citotóxico) (Garcia-Alonso, Ocana, & Pandiella, 2018), o debido a la activación de vías de señalización relacionadas con la supervivencia (Khongorzul et al., 2020). Algunos de los mecanismos de resistencia registrados se resumen en: (i) alteración en los niveles de antígeno reconocido por el mAb, (ii) problemas en la internalización y tráfico del ADC, (iii) problemas en la degradación del complejo ADC-antígeno, (iv) alteración en las bombas de expulsión de fármacos del lisosoma al citoplasma, (v) alteraciones en las dianas del agente citotóxico (microtúbulos o DNA) y (vi), alteraciones en proteínas relacionadas con el ciclo celular o vías de señalización intracelular (Garcia-Alonso, Ocana, & Pandiella, 2018). Para HER2, el truncamiento del ectodominio del receptor o su enmascaramiento por componentes de la matriz extracelular han demostrado ser mecanismos de resistencia a trastuzumab (Garcia-Alonso, Ocana, & Pandiella, 2018; Marei, Cenciarelli, & Hasan, 2022). Pacientes que desarrollan resistencia a T-DM1 han revelado desarrollar alteraciones en la ciclina B, una proteína reguladora del ciclo celular, además de la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-x. Distintos estudios han relacionado también la resistencia a ADCs con deficiencias en los transportadores de membrana dependientes de ATP (ABC; *ATP-binding cassette*), a un aumento del pH lisosomal o la inhibición de sus enzimas

proteolíticas que producen la degradación y expulsión del fármaco (García-Alonso, Ocaña, & Pandiella, 2018; Khongorzul et al., 2020; Marei, Cenciarelli, & Hasan, 2022).

2.4. Receptores de antígeno quimérico (CARs)

A pesar de los grandes avances logrados en la terapia contra el cáncer, los tratamientos tradicionales como la quimioterapia, radioterapia y cirugía no han conseguido la remisión completa y duradera de la mayoría de neoplasias malignas (Wei et al., 2019). La inmunoterapia basada en células T que expresan receptores de antígenos quimérico (CAR), se ha convertido en una alternativa prometedora a los tratamientos convencionales (Jayaraman et al., 2020; Ramírez-Chacon et al., 2022), especialmente en tumores hematológicos (Jayaraman et al., 2020). En 2017, la FDA aprobó en EEUU la terapia con células T en neoplasias hematológicas debido a su eficacia contra tumores CD19+ (Larson & Maus, 2021).

Este tipo de inmunoterapia se centra en impulsar la citotoxicidad de las propias células T del paciente contra antígenos específicos en las células tumorales (Ramírez-Chacon et al., 2022). La estructura básica del receptor de antígeno quimérico (CAR) expresado en la célula T incluye un dominio extracelular de unión al antígeno, el cual suele ser un fragmento variable de cadena sencilla de un anticuerpo monoclonal (scFv), un dominio espaciador, un dominio transmembrana, y uno o varios dominios citoplasmáticos activadores de la señalización intracelular (Hanssens et al., 2022; Jayaraman et al., 2020; Ramírez-Chacon et al., 2022). Según el número y tipo de dominios co-estimuladores que formen el dominio intracelular del CAR, las células CAR-T se pueden clasificar en cinco generaciones distintas (Jayaraman et al., 2020; Mehrabadi et al., 2022) (Figura 7):

- **CARs de primera generación:** Contienen un único dominio activador, que suele ser el dominio citoplasmático CD3 ζ o la cadena del receptor Fc (FcR). Son los encargados de iniciar la cascada de señalización para que la célula T se active. Este tipo de células T fueron los primeros CAR-T que se diseñaron, sin embargo, tuvieron poca eficiencia en los ensayos clínicos debido a la falta de producción de citoquinas (Jayaraman et al., 2020; Mehrabadi et al., 2022; Zhang et al., 2017). Además, se demostró una

mayor potencialidad del activador CD3 ζ frente al activador FcR en diversos estudios (Jayaraman et al., 2020).

- **CARs de segunda y tercera generación:** Incluyen un dominio co-estimulador, derivado de CD28 o 4-1BB, que se encuentra en serie con el dominio activador CD3 ζ o FcR (Jayaraman et al., 2020; Mehrabadi et al., 2022). La presencia de estos co-estimuladores prolongan la vida de las células T *in vivo*, además de aumentar la proliferación, citotoxicidad y secreción de citoquinas por los CAR-T (Mehrabadi et al., 2022; Zhang et al., 2017). Una optimización de estas construcciones son los CAR-T de tercera generación, que combinan múltiples dominios co-estimuladores (CD28, 41BB o CD28-OX40) con el activador CD3 ζ (Jayaraman et al., 2020; Mehrabadi et al., 2022).

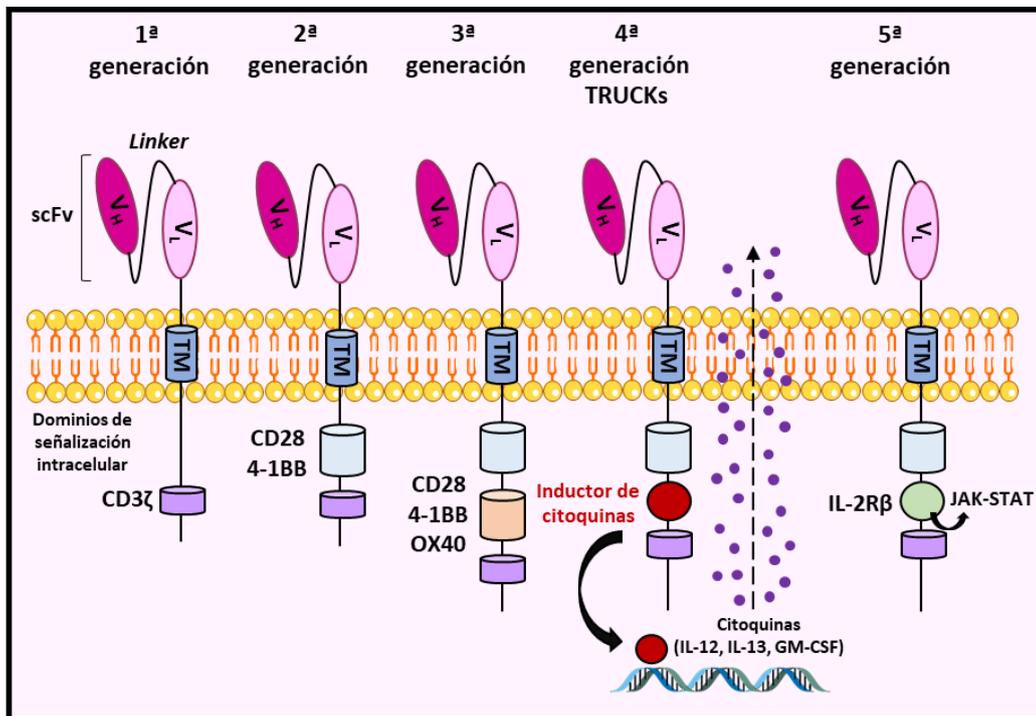


Figura 7. Estructura de las distintas generaciones de receptores de antígenos quiméricos (CARs). La estructura general de un CAR está compuesta por tres componentes principales: el dominio extracelular de reconocimiento al antígeno, el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular. Los CARs de primera generación solo tienen el dominio activador CD3 ζ , mientras que los CARs de segunda y tercera generación tienen además una o dos moléculas co-estimuladoras (CD28, 4-1BB u OX40). Los CARs de cuarta generación, también llamados TRUCKs, se modifican añadiendo factores de transcripción capaces de estimular la producción de citoquinas, como por ejemplo NFAT. A los CARs de quinta generación, en cambio, se les han añadido receptores de citoquinas (IL-2R β) capaces de activar vías de señalización como la de JAK-STAT.

- **CARs de cuarta generación:** Los CARs de cuarta generación, también conocidos como TRUCKs (*T cells redirected for antigen-unrestricted cytokine-initiated killing*; células T redirigidas para la eliminación universal por citoquinas), contienen transgenes para la producción de citoquinas u otros ligandos co-estimuladores (Larson & Maus, 2021; Mehrabadi et al., 2022). Como resultado, los TRUCK activan y atraen células del sistema inmune innato que ayudan a la eliminación del tumor (Mehrabadi et al., 2022; Zhang et al., 2017).
- **CARs de quinta generación:** Esta nueva generación de CARs contiene un dominio intracelular adicional de receptores de citoquinas (por ejemplo IL-2R β), capaces de activar vías de señalización como la de JAK-STAT, que promueven la proliferación extra de las células T (Golubovskaya, 2022; Umut et al., 2021).

De manera general, las células CAR-T se activan tras reconocer al antígeno por la región scFv (Larson & Maus, 2021). Cabe mencionar que existen CARs con un dominio de reconocimiento basado en el propio receptor o ligando natural, que son capaces de reconocer a sus propios ligandos o receptores. El uso menos común de este tipo de CARs es debido a su mayor capacidad de unión fuera del objetivo diana (Hanssens et al., 2022). Tras este reconocimiento, se activa la señalización mediada por el dominio intracelular, que desencadena una respuesta efectora que se encarga de la proliferación, citotoxicidad y secreción de citoquinas, entre otras funciones, de la célula T sobre la célula tumoral (Lu & Jiang, 2022). En cuanto al funcionamiento en clínica, el proceso se inicia con la extracción de leucocitos del paciente (leucoféresis). Las células T obtenidas se activan a través de anticuerpos monoclonales anti-CD3 ζ y factores de crecimiento o citoquinas, como por ejemplo la interleuquina-2 (IL-2) (Lu & Jiang, 2022; Zhang et al., 2017). Tras la activación, la construcción CAR se introduce en el genoma de las células T del paciente mediante vectores retro o lentivirales, o mediante electroporación (Larson & Maus, 2021; Lu & Jiang, 2022). Finalmente, las células T se expanden en bioreactores y se transfieren nuevamente a los pacientes en una o distintas dosis repartidas en diferentes días (Larson & Maus, 2021).

Aunque el tratamiento con células CAR-T ha demostrado tener buenos resultados, su largo ciclo de preparación y el complejo proceso de desarrollo, así como la necesidad de individualizar la terapia a cada paciente, han resultado ser limitaciones

importantes para su aplicación (Lu & Jiang, 2022). Además, problemas relacionados con la proliferación, toxicidad, persistencia limitada *in vivo* y algunos mecanismos de resistencia como la pérdida de expresión del antígeno diana, son causantes de las principales limitaciones a la hora de ponerla en uso en la práctica clínica (Shah & Fry, 2019).

3. CÁNCER DE RIÑÓN

3.1. Epidemiología

El cáncer de riñón, o carcinoma de células renales (CCR), afecta a casi 300.000 personas en todo el mundo y es responsable de más de 100.000 muertes al año (Linehan et al., 2019). Aunque los pacientes que presentan una enfermedad localizada tienen una tasa de supervivencia de entre el 20%-95% a los 5 años, no más del 10% de pacientes con enfermedad metastásica suelen sobrevivir (Huang et al., 2022; Linehan et al., 2019). En España, según el estudio realizado por Gómez-Palomo y colaboradores, las tasas de incidencia, prevalencia y mortalidad han aumentado significativamente estos últimos años tanto en hombres como en mujeres, y se espera que estos valores sigan creciendo (Gomez-Palomo et al., 2022). El tabaquismo, consumo de alcohol, obesidad y la hipertensión han sido factores de riesgo relacionados con el aumento tanto de la incidencia como la mortalidad del cáncer de riñón. Estos datos impulsan la necesidad de prestar especial atención a todos aquellos factores que sean potencialmente modificables, para que la incidencia de esta enfermedad no siga en aumento (Huang et al., 2022).

3.2. Clasificación

Según sus características morfológicas, moleculares y genéticas, el carcinoma de células renales fue subdividido en distintas categorías por la OMS en el año 2016 (Warren & Harrison, 2018). Los subtipos principales de esta clasificación incluyen el carcinoma de células renales de células claras (ccRCC), el carcinoma papilar de células renales (pRCC) y el CCR cromóforo (chRCC) (Huang & Hsieh, 2020; Moch, 2013). A continuación, se muestra una pequeña descripción de los distintos subtipos registrados por la OMS, según su incidencia (Inamura, 2017; Warren & Harrison, 2018):

(i) Subtipos principales de CCR:

- a. **Carcinoma renal de células claras (ccRCC):** Comprenden entre el 65-70% de todos los CCR y tienen un peor pronóstico que los CCR papilares o cromófobos. En el 90% de los casos presentan alteraciones en el gen supresor de tumores de von Hippel-Lindau (VHL), y son muy comunes las mutaciones recurrentes en la vía PI3K/Akt/mTOR.
- b. **Carcinoma papilar de células renales (pRCC):** Representan entre el 15-20% de todos los CCR, y aunque se han asociado con un mejor pronóstico que los ccRCC, los pacientes con pRCC metastásico suelen presentar peor pronóstico que los ccRCC metastásicos. Alteraciones en MET se han asociado con regularidad a esta patología.
- c. **Carcinoma renal cromóforo (chRCC):** Comprenden entre el 5-7% de todos los CCR, y suelen presentar un pronóstico favorable. El 24% de los chRCC metastásicos presentan mutaciones en PTEN.

(ii) Subtipos minoritarios:

- a. **Neoplasia renal quística multilocular:** Se define como un tumor renal compuesto enteramente por quistes, cuyos septos contienen células claras individuales o en grupos sin crecimiento expansivo. Por ello, este subtipo de neoplasia presenta un bajo potencial maligno.
- b. **Carcinoma renal de translocación de la familia MiT (TRCC de la familia MiT):** Se caracterizan por surgir especialmente en niños y adultos jóvenes que presentan CCR. Resultan de la translocación de los factores de transcripción MiT TFE3 y TFEB con otros genes.
- c. **Carcinoma renal tubuloquístico:** Es un CCR quístico poco común y comprende menos del 1% de todos los CCR. Generalmente, se asocia con un buen pronóstico y afecta en mayor medida a hombres.
- d. **Carcinoma renal asociado a enfermedad quística adquirida (CCR asociado a ACD):** Es el tumor renal más común en aquellos pacientes tanto con enfermedad

renal terminal como con enfermedad renal quística adquirida. La mayoría presentan un comportamiento indolente.

- e. **Carcinoma renal papilar de células claras (CCPRCC):** Es probablemente el cuarto subtipo de CCR más común y representa entre el 3-4% de los tumores renales. Es generalmente indolente y muy poco recurrente, y la probabilidad de generar metástasis suele ser muy baja.
- f. **Carcinoma renal con deficiencia de succinato deshidrogenasa (CCR con deficiencia de SDH):** Comprende entre el 0,05-0,2% de todos los CCR y afecta a aquellos pacientes con mutaciones hereditarias en uno de los genes SDH, encargados de formar el complejo mitocondrial.
- g. **Leiomiomatosis hereditaria y carcinoma de células renales (HLRCC):** Es un desorden de hereditaria autosómica dominante, que se caracteriza por la aparición de leiomiomas cutáneos y uterinos, junto a un carcinoma renal papilar de tipo 2. Este síndrome es causado por mutaciones en la línea germinal del gen de la fumarato-hidratasa (FH), y presenta un mal pronóstico, un comportamiento agresivo y una diseminación temprana y generalizada de la enfermedad.

(iii) Subtipos emergentes:

- a. **Carcinoma renal oncocítico tras neuroblastoma:** Se ha observado que pacientes que hayan padecido un neuroblastoma con o sin quimioterapia tienen un mayor riesgo de sufrir CCR. Presentan una morfología similar a los TRCC de la familia MiT.
- b. **Carcinoma renal folicular similar a la tiroides:** Es un CCR especialmente raro, indolente y raramente genera metástasis. Normalmente los pacientes con este subtipo de CCR son mujeres.
- c. **Carcinoma renal asociado al reordenamiento de ALK:** Es un tipo de CCR que afecta tanto a niños como adultos, y comprende aproximadamente el 0,4% de todos los CCR. Los inhibidores de ALK han mostrado ser eficientes para su tratamiento.

- d. Carcinoma renal con estroma (angio)leiomiomatoso:** Esta tipología de tumor ocurre de manera esporádica y puede estar asociado con esclerosis tuberosa. Anteriormente se había clasificado como CCRCC o CCPRCC, y su asociación con mutaciones en TCEB1 cada vez es más clara.

3.3. Tratamiento

El carcinoma de células renales suele presentarse asintomático o con síntomas vagos, por lo que diagnosticarlo cuando aún es una enfermedad localizada es todo un desafío (Huang & Hsieh, 2020). Cuando se consigue actuar en estas circunstancias, la resección quirúrgica es la base del tratamiento (Chowdhury & Drake, 2020). Los pacientes suelen recibir una nefrectomía radical o parcial, según la extensión de la enfermedad (Huang & Hsieh, 2020). El 40% de estos pacientes, suelen desarrollar recurrencia de la enfermedad (Chowdhury & Drake, 2020; Yang & Chen, 2020). Cuando la enfermedad se encuentra en su estado metastásico, la cirugía ya no es una opción. Históricamente, los tratamientos sistémicos se basaron en interferón- α (IFN α) e interleuquina2 (IL-2), pero sus efectos tóxicos y la escasa supervivencia (10-20% de los pacientes) tras su uso han llevado al desarrollo de terapias alternativas (Huang & Hsieh, 2020; Yang & Chen, 2020):

- **Inhibidores angiogénicos:** Dado que las mutaciones en el gen VHL, responsables de la activación de factores proangiogénicos como el VEGF (*vascular endothelial growth factor*; factor de crecimiento del endotelio vascular), son muy frecuentes en CCR, el uso de inhibidores de la angiogénesis ha conseguido buenos resultados en la clínica (Huang & Hsieh, 2020). Entre ellos, los TKIs sorafenib, sunitinib, pazopanib, axitinib y cabozantinib, y el anticuerpo monoclonal bevacizumab, son utilizados para el tratamiento tanto de primera como segunda línea (Chowdhury & Drake, 2020; Huang & Hsieh, 2020; Yang & Chen, 2020). Por lo general, se sabe que la inhibición de VEGF promueve la normalización de la vasculatura tumoral, permitiendo una mejor infiltración de células inmunes y con ello una respuesta antitumoral (Huang & Hsieh, 2020).
- **Inhibidores de mTORC1:** Las mutaciones en la vía de mTORC1 también suelen ser muy comunes en CCR, por lo que el uso de inhibidores análogos de la rapamicina,

como temsirolimus y everolimus, han ofrecido en muchos casos una ventaja terapéutica (Huang & Hsieh, 2020).

- **Inhibidores de puntos de control inmunológico (ICI):** Distintos estudios han demostrado que un tercio de las muestras de CCR expresan el ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1), y que más del 50% de las células inmunitarias infiltradas en estos tumores son positivas para su receptor PD-1. Este hecho produce una regulación negativa de la inmunidad antitumoral (Huang & Hsieh, 2020). Por este motivo, las terapias actuales se han centrado en inhibidores de estos puntos de control inmunológico, como son los anticuerpos monoclonales nivolumab (anti-PD-1), ipilimumab (anti-CTLA-4), pembrolizumab (anti-PD-1) y avelumab (anti-PD-L1) (Chowdhury & Drake, 2020; Huang & Hsieh, 2020). Su uso en combinación con inhibidores antiangiogénicos y de mTORC1 en primera línea ha supuesto una mejora significativa, respecto a los tratamientos convencionales (Chowdhury & Drake, 2020).

4. CÁNCER DE PÁNCREAS

4.1. Epidemiología

El cáncer de páncreas (CP) es una de las principales causas de mortalidad por cáncer en los países desarrollados y una de las neoplasias malignas más letales en todo el mundo (Ilic & Ilic, 2016). Según el Observatorio Mundial del Cáncer (GLOBOCAN), en 2020 el cáncer de páncreas causó casi tantas muertes ($n = 466.003$) como número de pacientes se diagnosticaron ($n = 495.773$), situándolo en el séptimo lugar entre todos los tumores malignos (Cai et al., 2021; Yang et al., 2021). Ocupa constantemente el último lugar entre todos los cánceres en términos de pronóstico, y se prevé que se convierta en la segunda causa de muerte por cáncer en el año 2030 (Hu et al., 2021; Lai et al., 2019). El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), es el tipo de cáncer de páncreas más común. Su tasa de supervivencia general a los 5 años no supera el 7%, debido a que más del 80% de los pacientes presentan una enfermedad avanzada en el momento del diagnóstico (Lai et al., 2019).

En España, la incidencia del cáncer de páncreas ha aumentado progresivamente durante las últimas 6 décadas, siendo el PDAC la patología que representa más del 80%

de todas las neoplasias pancreáticas en nuestro país (Marra-Lopez Valenciano, 2022). Las causas de su aparición siguen siendo desconocidas (Hidalgo, 2010), aunque varios factores como el tabaquismo, obesidad, diabetes mellitus e inactividad física son responsables del aumento de su tasa de incidencia (Khalaf et al., 2021). Por ejemplo, el riesgo de padecer cáncer de páncreas en personas fumadoras es de 2,5 a 3,6 veces mayor que en personas no fumadoras (Hidalgo, 2010).

4.2. Clasificación

En términos histológicos, las neoplasias pancreáticas se clasifican generalmente en dos tipos: exocrinas y endocrinas. Los cánceres de páncreas exocrinos comprenden más del 95% de los casos, siendo el adenocarcinoma ductal pancreático el subtipo más predominante (entre el 85-90% de los CP) (Hu et al., 2021; Pokrzywa et al., 2019). Entre los otros subtipos exocrinos menos comunes, tendríamos el carcinoma adenoescamoso, el carcinoma de células gigantes, de células acinares y el de células pequeñas (Hu et al., 2021). Aunque son pocos los estudios que han explorado los tumores de origen endocrino, éstos se suelen clasificar según la célula de origen y las hormonas que secretan: insulinomas, glucagonomas y gastrinomas (Grant, Hua, & Singh, 2016). Finalmente, varios estudios de secuenciación genética y epigenética han conseguido definir cuatro subtipos moleculares de PDAC, los cuales presentan comportamientos biológicos distintos (Grant, Hua, & Singh, 2016; Lai et al., 2019; Torres & Grippo, 2018):

- a. **Subtipo escamoso:** Presenta una incidencia del 31% y se caracteriza por una gran variedad de alteraciones en genes implicados con la inflamación, respuesta a la hipoxia, reprogramación metabólica, autofagia y la activación de distintas vías de señalización, como la de TGFβ, WNT y MYC. Además, son muy frecuentes las mutaciones en el gen supresor tumoral p53. Es el subtipo con peor pronóstico de todos, seguramente debido a la gran cantidad de sistemas que se ven afectados en él.
- b. **Subtipo progenitor pancreático:** Presenta una incidencia del 19%, y se caracteriza por presentar alteraciones en factores de transcripción relacionados con el desarrollo pancreático, como son PDX1 y KRAS. Además, se encuentran alterados varios tipos de procesos celulares, como son la oxidación de ácidos

grasos, biosíntesis de hormonas esteroides, metabolismo de fármacos y la glicosilación de mucinas. Curiosamente, este tipo de tumores son más sensibles al TKI de EGFR erlotinib.

- c. **Endocrino exocrino aberrantemente diferenciado (ADEX):** Con una incidencia del 21%, ADEX se caracteriza por la regulación positiva de redes transcripcionales involucradas en las últimas etapas del desarrollo, que definen la diferenciación de los linajes exocrino y endocrino del páncreas. Algunos de estos genes son NR5A2, MIST1 y RBPJL, y están asociados a la activación de KRAS.
- d. **Inmunogénico:** Presenta una incidencia del 29%, y se caracteriza por un aumento notable en la infiltración de células B y T, y una regulación positiva de la señalización de PD-1 y CTLA-4. En estos pacientes sería interesante restaurar las funciones críticas del sistema inmunológico, por lo que la utilización de inhibidores de puntos de control inmunitarios podría ofrecerles algún tipo de beneficio.

4.3. Tratamiento

Generalmente, los pacientes con PDAC son muy difíciles de tratar debido a que suelen ser asintomáticos y su diagnóstico se lleva a cabo cuando los tumores ya son metastásicos (Grant, Hua, & Singh, 2016). En estos casos, ya no se puede realizar la resección quirúrgica del tumor, que sería el único tratamiento curativo para la patología. En cuanto a la quimioterapia, los pacientes con PDAC suelen tratarse con una combinación de gemcitabina, nab-pacilitaxel y FOLFIRINOX (una combinación de fármacos que incluyen ácido folínico, fluorouracilo, irinotecán y oxaliplatino), que son inhibidores de la replicación del DNA (X. Chen et al., 2021; Grant, Hua, & Singh, 2016). Estos agentes citotóxicos se dirigen preferentemente a células en división, por lo que son muchos los efectos secundarios y las toxicidades asociadas a los mismos (Grant, Hua, & Singh, 2016). Debido a ello, y considerando la heterogeneidad de genes y vías de señalización asociados a esta enfermedad, se está investigando el uso de nuevas terapias alternativas (Lai et al., 2019):

- **Inhibidores de receptores transmembrana y proteínas involucradas en vías de señalización:** Diferentes ensayos han demostrado que el uso de distintos inhibidores

en monoterapia o en combinación de quimioterapia convencional mejoran la supervivencia de los pacientes. Entre ellos, los inhibidores de la quinasa MEK1/2 (trametinib y selumetinib), del receptor de IGF (ganitumab), de mTOR (everolimus y temsirolimus), de los receptores de la tropomiosina quinasa (TRK) (larotrectinib y entrectinib), de NOTCH (demcizumab y tarextumab), TGF β (galuniertinib), de Hh (IPI-926 y vismodegib) y CDK4/6 (palbociclib), son los que mejores resultados han proporcionado hasta ahora.

- **Inhibidores de los factores de reparación del DNA:** Distintos estudios han demostrado que la utilización de inhibidores de PARP (*poly ADP-ribose polymerase*; poli ADP-ribosa polimerasa), como olaparib, rucaparib y veliparib, mejoran el pronóstico y la supervivencia de aquellos pacientes de PDAC con mutaciones en BRCA1/2, PALB2 o ATM.
- **Inhibidores de la matriz extracelular:** De entre los inhibidores evaluados, solo la hialuronidasa humana recombinante pegilada (PEGPH20) y pamrevlumab, en combinación con gemcitabina y nab-paclitaxel, han mostrados resultados preclínicos alentadores.
- **Inhibidores de células madre tumorales (CSC; *cancer stem cells*):** La evidencia preclínica ha mostrado que la naphbucinasasa, un inhibidor de STAT3, es capaz de sensibilizar las células tumorales de PDAC a los tratamientos de la quimioterapia convencional.
- **Inmunoterapia:** A pesar de la importancia que parece ejercer el sistema inmune en el desarrollo de la enfermedad, la inmunoterapia no ha demostrado hasta ahora una mejora en la supervivencia de los pacientes con PDAC. Actualmente, se están investigando inhibidores contra CTLA4 y PD-1 en combinación con la quimioterapia convencional, a la espera que los resultados muestren una mejora en la eficacia de la misma.

5. CÁNCER DE MAMA

5.1. Epidemiología

El cáncer de mama es el tumor maligno más común en mujeres en todo el mundo (Fares et al., 2019; Smolarz, Nowak, & Romanowicz, 2022), con 2,26 millones de nuevos casos diagnosticados cada año (Lukasiewicz et al., 2021; Siegel et al., 2023). En los últimos años, el índice de mortalidad por cáncer de mama ha descendido debido a los programas de diagnóstico precoz y a la mejora en los tratamientos (Cleries et al., 2022). Aun así, la enfermedad es responsable del 15,5% de las muertes anuales por cáncer en mujeres (Siegel et al., 2023). En España, el cáncer de mama es la segunda causa de muerte relacionada con el cáncer entre las mujeres españolas. Aunque los avances en las distintas terapias hayan dado mejoras en la supervivencia a 5 años, una pequeña porción de las mujeres que sobreviven a esta enfermedad más allá de este tiempo presentan una alta probabilidad de muerte dentro de los 10 años siguientes (Cleries et al., 2022).

Se han identificado múltiples factores que pueden influir en el desarrollo del cáncer de mama. Entre ellos, se incluirían el género, la edad, factores ambientales, hormonales, hereditarios, mutaciones genéticas, estilo de vida, tiempo de exposición a estrógenos o número de hijos (Lukasiewicz et al., 2021; Siegel et al., 2023; Smolarz, Nowak, & Romanowicz, 2022). Se estima que aproximadamente el 30% de los casos de cáncer de mama se atribuyen a factores de riesgo que pueden modificarse (Giaquinto et al., 2022). El cáncer de mama, además, es una enfermedad muy heterogénea en cuanto a términos histológicos, respuesta a terapias, patrones de diseminación y resultados en las pacientes (Prat & Perou, 2011). Por ello, se han realizado grandes esfuerzos para establecer un sistema de clasificación en función de patrones de expresión genética o histológicos, que permitan una mejora en el pronóstico o predicción de estos tumores en la práctica clínica (Parker et al., 2009; Perou et al., 2000).

5.2. Clasificación

(i) Clasificación según el perfil molecular

En el año 2000, Perou y colaboradores analizaron por primera vez los perfiles de expresión genética del cáncer de mama mediante el uso de *microarrays*, que permitió identificar cuatro subtipos moleculares: luminal, *HER2-enriched*, *basal-like* y *normal breast-like* (Johnson et al., 2019; Perou et al., 2000). Las investigaciones realizadas en los últimos años han demostrado una mayor heterogeneidad molecular del cáncer de mama, lo que ha permitido establecer una clasificación final compuesta por seis subtipos: luminal A, luminal B, *HER2-enriched*, *basal-like*, *normal breast-like* y *claudin-low* (Johnson et al., 2019; Lukasiewicz et al., 2021). Todos ellos con notables diferencias en cuanto a la incidencia, respuesta al tratamiento, progresión y supervivencia a la enfermedad (Johnson et al., 2019).

a. Luminal A y luminal B

Los tumores de tipo luminal son el subtipo más común en cáncer de mama y representan entre el 60-70% de todos los tumores (Johnson et al., 2019; Lukasiewicz et al., 2021). Los tumores luminales A se caracterizan por la presencia del receptor de estrógeno (ER) y/o el receptor de la progesterona (PR), y suelen carecer de expresión de HER2. En este subtipo, los factores de transcripción del ER activan genes cuya expresión es característica del epitelio luminal que recubre los conductos mamarios. También presentan una baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular, y un índice bajo de la proteína Ki67 (antígeno nuclear de células proliferativas) en inmunohistoquímica (IHQ). Clínicamente son de bajo grado, de crecimiento lento y la tasa de recaída es significativamente menor que en otros subtipos (Eroles et al., 2012; Johnson et al., 2019; Lukasiewicz et al., 2021; Yersal & Barutca, 2014). A diferencia de estos, los tumores de subtipo luminal B son de mayor grado, presentan un fenotipo más agresivo, mayor índice proliferativo (alto índice de Ki67 en IHQ), y un peor pronóstico general. Además, expresan el receptor de estrógeno de manera similar al subtipo A, y pueden ser PR negativos y/o HER2 positivos (Eroles et al., 2012; Lukasiewicz et al., 2021; Yersal & Barutca, 2014).

b. HER-2-enriched (HER2-E)

Los tumores enriquecidos en HER2 representan entre el 15-20% de todos los cánceres de mama (Eroles et al., 2012; Malhotra et al., 2010). Se caracterizan por sobreexpresar a HER2, carecen de expresión de ER y PR y poseen un índice de Ki67 alto (Johnson et al., 2019; Lukasiewicz et al., 2021; Malhotra et al., 2010). Además, más del 40% de estos tumores presentan mutaciones en p53 (Eroles et al., 2012). La amplificación del gen y la consecuente sobreexpresión de HER2 se relaciona con tumores de mayor grado histológico, con gran capacidad proliferativa y de generar metástasis, lo que conlleva a una baja supervivencia y peor pronóstico de la enfermedad en comparación a otros subtipos (Malhotra et al., 2010). Afortunadamente, la introducción de nuevas terapias dirigidas ha producido un cambio en el panorama clínico, ya que son tumores que responden muy bien a agentes bloqueantes de HER2 (Lukasiewicz et al., 2021; Malhotra et al., 2010).

c. Basal-like

Los tumores de subtipo basal representan entre el 10-20% de todos los carcinomas de mama (Eroles et al., 2012). Su denominación se debe a que estos tumores expresan genes característicos de las células tanto mioepiteliales como basales del tejido sano de la mama, como son las citoqueratinas 5, 14 y 17 (Eroles et al., 2012; Yersal & Barutca, 2014). Su característica principal es la ausencia de expresión de los receptores ER, PR y HER2. Por este motivo, suelen denominarse histológicamente como tumores “triple negativo”, aunque ambos términos no son completamente sinónimos (Eroles et al., 2012). Se asocian con un alto grado histológico, un comportamiento agresivo, un alto índice de Ki67 y una gran capacidad de generar metástasis (Yersal & Barutca, 2014). Los tumores de tipo basal tienen peor pronóstico que los de tipo luminal, aunque suelen presentar una mejor respuesta a la quimioterapia (Eroles et al., 2012). Se caracterizan por su aparición a edades tempranas, y su alta agresividad y mal pronóstico podrían explicarse debido a la alta tasa de mutaciones en p53 (Eroles et al., 2012; Yersal & Barutca, 2014). Esta característica también podría deberse a la baja expresión de genes implicados tanto en las uniones estrechas como adherentes entre células, y la alta expresión de genes involucrados en la transición epitelio-mesénquima (EMT) (Yersal & Barutca, 2014). Además, son muy frecuentes las mutaciones en BRCA1,

por lo que estos tumores presentan defectos en los procesos de reparación de roturas de doble cadena en el DNA (Eroles et al., 2012; Yersal & Barutca, 2014).

d. Normal breast-like

Este subtipo de tumores representa alrededor del 5-10% de todos los carcinomas de mama (Yersal & Barutca, 2014). Expresan genes característicos del tejido adiposo, y presentan un pronóstico intermedio entre los subtipos luminal y basal, y no suelen responder a la quimioterapia neoadyuvante (Eroles et al., 2012). Debido a la carencia de expresión de ER, PR y HER2, estos tumores también se clasifican como triple negativo, pero no pueden considerarse de tipo basal debido a la falta de expresión de CK5 y EGFR (Eroles et al., 2012; Yersal & Barutca, 2014). La relevancia clínica de estos tumores aún está por determinar, y su existencia real a día de hoy está puesta en duda. Se cree incluso que su identificación fue debida a un artefacto técnico procedente de la contaminación con tejido normal en los *microarrays* (Eroles et al., 2012).

e. Claudin-low

Los tumores del subtipo *claudin-low* fueron los últimos en clasificarse y representan entre el 12-14% del total de carcinomas de mama (Eroles et al., 2012). Son tumores de mal pronóstico, y suelen tener una mala respuesta a la quimioterapia neoadyuvante, con valores intermedios entre los tumores basales y luminales. Son de alto grado histológico, con un índice de Ki67 bajo, y la mayoría carecen de expresión de los receptores ER, PR y HER2, por lo que suelen incluirse dentro del grupo histológico “triple negativo”. Se caracterizan, además, por una baja expresión de genes implicados tanto en las uniones estrechas como en la adhesión celular, incluyendo las claudinas 3/4/7, cingulina, ocludina y E-cadherina, dando lugar a su nombre (*claudin-low*; baja expresión de claudina). Además, este subtipo de tumores sobreexpresan una amplia variedad de genes relacionados con la respuesta inmune, la diferenciación mesenquimal y la transición epitelio-mesénquima (EMT), hecho que les hace genéticamente muy similares a las propias células madre (Eroles et al., 2012; Lukasiewicz et al., 2021).

(ii) Clasificación según el perfil histológico

Debido a los altos costes y compleja implementación que supone aplicar la clasificación molecular del cáncer de mama en la práctica clínica, ha sido necesario

identificar marcadores que permitan una clasificación histológica menos compleja (Tabla 2) (Viale, 2012). Este método de clasificación se basa en el perfil de expresión de los receptores ER, PR, HER2 y el índice de Ki67 (De Laurentiis et al., 2010; Viale, 2012). A partir de ellos, se pueden distinguir tres subtipos histológicos: hormonales, HER2 positivos y triple negativos (TNBC). Los tumores clasificados en el subtipo hormonal (luminal A y luminal B) expresan los receptores ER y/o PR, los tumores HER2+ se caracterizan por expresar al oncogén HER2, y los triple negativos, que incluyen los subtipos *basal-like*, *normal breast-like* y *claudin-low*, carecen de expresión de ER, PR y HER2. La clasificación basada en los valores de IHC se aproxima bastante a la clasificación molecular anteriormente vista, aunque con ligeras diferencias tanto en los subtipos luminal B como en los *basal-like* (Viale, 2012). El tratamiento que se aplicará a cada tumor dependerá en la clínica de esta clasificación. Por ejemplo, los carcinomas hormonales (luminal A y B), se tratan mediante terapia endocrina dirigiéndose a los receptores de estrógenos. Los tumores HER2+ se tratan con agentes dirigidos al bloqueo de HER2, y los tumores TNBC responden a quimioterapia e inmunoterapia. Estos últimos presentan un desafío importante a la hora de ser tratados en la práctica clínica, ya que las terapias dirigidas no pueden ser utilizadas en ellos debido a la falta de expresión de los tres receptores (Reddy, 2011).

Tabla 2. Clasificación y características de los subtipos moleculares e histológicos del cáncer de mama.

Subtipo histológico	Subtipo molecular	Bio-marcadores	Frecuencia de casos	Pronóstico	Terapia
Luminal	Luminal A	ER+ PR+ HER2- Ki67 bajo	50-60%	Bueno	Hormonal
	Luminal B	ER+ PR+ HER2- Ki67 alto	10-20%	Intermedio	Hormonal Quimioterapia
	HER2- <i>enriched</i>	ER- PR- HER2+ Ki67 alto	15-20%	Intermedio	Quimioterapia Terapia dirigida

HER2+	Luminal B HER2+	ER+ PR+ HER2+ Ki67 alto		Intermedio	Hormonal Quimioterapia Terapia dirigida
	<i>Basal-like</i>		10-20%		
Triple negativo	<i>Normal breast-like</i>	ER- PR- HER2- Ki67 variable	5-10%	Malo	Quimioterapia
	<i>Claudin-low</i>		12-14%		

5.3. Tratamiento

Una vez diagnosticado el cáncer de mama, el tratamiento a seguir va a depender de distintos factores, como son el subtipo tumoral, el estadio de la enfermedad, presencia de mutaciones en los genes *BRCA1* y *2*, el riesgo de recurrencia, la edad y el estado de menopausia de la paciente. En cada caso, el tratamiento a seguir será completamente individualizado (Ayala de la Pena et al., 2019; Moulder & Hortobagyi, 2008). El estadio de la enfermedad estará determinado por el tamaño del tumor, el número y ubicación de ganglios linfáticos afectados y la presencia de enfermedad metastásica (Moulder & Hortobagyi, 2008). Cuando el cáncer de mama se encuentra localmente avanzado y sin metástasis a distancia, la extirpación mediante cirugía es siempre la primera opción. En estos casos, tanto la quimioterapia neoadyuvante preoperatoria como la radioterapia adyuvante después de la cirugía serán buenos aliados para conseguir la completa eliminación del tumor y evitar recaídas (Ayala de la Pena et al., 2019; Shien & Iwata, 2020). Cuando el cáncer de mama sea inoperable y metastásico, el tratamiento sistémico será la única opción. En estos casos, la terapia endocrina, las distintas terapias dirigidas y la quimioterapia serán los encargados de mejorar la supervivencia de la paciente (Shien & Iwata, 2020).

- **Terapia hormonal:** La terapia hormonal está dirigida a aquellos tumores con expresión de los receptores ER y PR, por lo que solo los carcinomas de tipo luminal pueden beneficiarse de la misma (Tong et al., 2018). El tratamiento se basa en reducir tanto los niveles de estrógenos como bloquear que estos estimulen a las células tumorales. Los tratamientos utilizados actualmente incluyen: (i) tamoxifeno

o toremifeno, que son moduladores selectivos que bloquean la unión de estrógenos por parte del ER; (ii) inhibidores de la aromatasa (letrozol, anastrozol y exemestano), que reducen los niveles de estrógenos al suprimir su conversión a partir de los andrógenos; (iii) análogos de la hormona liberadora de hormona luteinizante (goserelina y leuprolida), que producen la supresión ovárica de la misma; y (iv) fulvestrant, un degradador selectivo del receptor de estrógeno (Lukasiewicz et al., 2021; Shien & Iwata, 2020; Tong et al., 2018). La utilización de tamoxifeno, que es la terapia hormonal más establecida, es capaz de reducir en un 40% el riesgo de recurrencia, tanto en pacientes premenopáusicas como posmenopáusicas (Ayala de la Pena et al., 2019).

- **Terapia dirigida:** La heterogeneidad genética de los tumores de cáncer de mama ha producido el desarrollo de múltiples terapias dirigidas contra distintas dianas moleculares, incluyendo los receptores hormonales. Para el cáncer de mama HER2+, se han aprobado varios agentes que bloquean específicamente la actividad del receptor, como son los anticuerpos monoclonales trastuzumab, pertuzumab y margetuximab, los anticuerpos conjugados a fármacos T-DM1, T-DXd y disitamab vedotin, y los inhibidores de la actividad tirosina quinasa lapatinib, neratinib y tucatinib (Lukasiewicz et al., 2021; Tong et al., 2018). Además, la utilización de inhibidores dirigidos a otros receptores de la familia HER mejoran el efecto anticancerígeno de las terapias anti-HER2. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-HER3 patritumab disminuye la dimerización entre ambos receptores (Tong et al., 2018). Entre las terapias emergentes, los inhibidores de CDK4/6 (palbociclib, ribociclib y abemaciclib), se han utilizado para el tratamiento de los tumores ER y/o PR positivos, debido a que entre el 14-29% de ellos presentan amplificación de la ciclina D1 y CDK4.

Además, numerosos estudios han demostrado que la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR se encuentra activa en más del 70% de los cánceres de mama. Por ello, se utilizan con frecuencia inhibidores de PI3K (alpelisib y taselisib), Akt (MK-2206 y capivasertib) y de mTOR (everolimus y temsirolimus) (Lukasiewicz et al., 2021; Obidiro, Battogtokh, & Akala, 2023; Tong et al., 2018).

En cuanto al tratamiento del cáncer de mama triple negativo, no se han podido desarrollar muchas terapias dirigidas eficaces debido a la falta de objetivos moleculares que causen la patología. Como excepción encontramos a TROP2, una glicoproteína transmembrana que participa en el control de la homeostasis del calcio, cuya expresión se ha detectado en más del 85% de los casos de TNBC (Bardia et al., 2019; de Nonneville et al., 2022; Schreiber, Andress, & Diamond, 2021). Sacituzumab govitecan (SG), un ADC contra TROP2, fue aprobado por la FDA en 2016 para el tratamiento de pacientes con TNBC (Nader-Marta et al., 2023; Obidiro, Battogtokh, & Akala, 2023; Tong et al., 2018). Las pacientes tratadas con este ADC han demostrado responder un 35% más en comparación a las tratadas con quimioterapia estándar (Schreiber, Andress, & Diamond, 2021). Actualmente, se han empezado a introducir inhibidores de la poli ADP-ribosa polimerasa (PARP) (olaparib, veliparib, niraparib, rucaparib y talazoparib), en el tratamiento del TNBC con mutaciones en *BRCA1/BRCA2* (Mandapati & Lukong, 2023; Obidiro, Battogtokh, & Akala, 2023; Tong et al., 2018). Debido a la alta expresión de PD-L1 en estos tumores, la utilización de inhibidores de puntos de control inmunológico (atezolizumab, durvalumab y avelumab) ha resultado ser eficiente para su tratamiento (Obidiro, Battogtokh, & Akala, 2023). La utilización de agentes antiangiogénicos, como el anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante (rhuMAb VEGF) o bevacizumab, también han mostrado una mejora en la tasa de respuesta general en el cáncer de mama (Lukasiewicz et al., 2021; Tong et al., 2018).

- **Quimioterapia:** La quimioterapia en el cáncer de mama consiste en un tratamiento sistémico que utiliza fármacos que evitan el crecimiento y división de las células tumorales. Puede ser utilizada de forma adyuvante antes de una cirugía para disminuir el tamaño del tumor y facilitar su extirpación. La quimioterapia neoadyuvante es utilizada mayoritariamente en aquellos subtipos moleculares de peor pronóstico (HER2 o TNBC), aunque aquellas pacientes que presenten cáncer de mama con metástasis en los ganglios linfáticos o con un alto riesgo de recurrencia también son candidatas a recibir el tratamiento. Actualmente, la quimioterapia se basa en el uso simultáneo de distintos fármacos: carboplatino, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo/capecitabina, taxanos (paclitaxel, docetaxel) y antraciclinas

(doxorrubicina, epirrubicina). La elección del tratamiento depende del subtipo molecular del tumor. Por ejemplo, los taxanos son especialmente efectivos en TNBC, donde la falta de expresión de dianas moleculares hace que sean tumores muy difíciles de tratar. A pesar de su eficacia, la quimioterapia suele producir varios efectos secundarios, por lo que su uso puede llevar a múltiples complicaciones en la salud del paciente (Lukasiewicz et al., 2021; Mandapati & Lukong, 2023; Shien & Iwata, 2020).

OBJETIVOS

La familia de receptores tirosina quinasa ErbB/HER y sus ligandos juegan un papel fundamental en las vías de señalización implicadas en la proliferación, migración y diferenciación celular. Cambios en la expresión de estas proteínas se relacionan frecuentemente con la aparición de múltiples enfermedades oncológicas, y su uso como dianas terapéuticas ha demostrado mejorar la supervivencia de pacientes con distintos tipos de cáncer. A pesar de ello, el desarrollo de vías de escape y la adquisición de mecanismos de resistencia a las terapias actuales está siendo un grave problema para el tratamiento de estas patologías. Por ejemplo, el carcinoma renal de células claras o el adenocarcinoma ductal pancreático se caracterizan por su alta tasa de recaída después de una respuesta a corto plazo a las terapias dirigidas. En el cáncer de mama HER2+, la resistencia primaria o adquirida a las terapias anti-HER2 es responsable de la mayoría de fracasos al tratamiento. Por ello, estudiar los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a cada patología es esencial para poder diseñar nuevas terapias dirigidas, que puedan ser eficientes para la cura de estas enfermedades.

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta estos antecedentes, los objetivos de la presente Tesis Doctoral son:

- I. Evaluar el potencial antitumoral de nuevas terapias dirigidas contra el carcinoma renal de células claras y el adenocarcinoma ductal pancreático.
- II. Identificar nuevas dianas terapéuticas capaces de revertir la resistencia a neratinib en modelos de cáncer de mama HER2+.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS Y ANTICUERPOS

1.1. Reactivos

Los medios de cultivo, el suero bovino fetal (FBS, *fetal bovine serum*), la tripsina-EDTA y los antibióticos (penicilina/estreptomicina) fueron adquiridos a través de Lonza (Basilea, Suiza). El material de plástico estéril utilizado en cultivos celulares fue obtenido de BD Biosciences (Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos) y Corning Incorporated (Corning, Nueva York, Estados Unidos).

Los fármacos trastuzumab, T-DM1 y T-DXd, de Hoffmann-La Roche (Basilea, Suiza), fueron adquiridos a través de una farmacia local o donados por Genentech (South San Francisco, CA, Estados Unidos). Cetuximab se obtuvo de Merck (Darmstadt, Alemania), y el anticuerpo policlonal anti-TGF α de R&D Systems (Mineápolis, Estados Unidos). Los anticuerpos monoclonales anti-TGF α fueron encargados a la empresa Biotem (Apprieu, Francia). El inhibidor erlotinib fue de Hoffmann-La Roche, gefitinib de AstraZeneca (Cambridge, Reino Unido), lapatinib, neratinib y tucatinib de Selleckchem (Houston, Estados Unidos). Dasatinib fue de LC Laboratories (Woburn, Estados Unidos) y Cl-amidine fue de Sigma-Aldrich (San Luís, Misuri, Estados Unidos). El TGF α humano recombinante utilizado para generar los anticuerpos monoclonales y estimular las células en cultivo fue de GenScript (Piscataway, Estados Unidos). La mertansina (DM1), Deruxtecan (DXd) y la monometil auristatina F (MMAF) fueron de MedChemExpress (Monmouth Junction, Estados Unidos).

Las enzimas de restricción, los tampones empleados en las digestiones de DNA, los dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates*), y la ligasa T4 de DNA con su tampón de reacción se obtuvieron de Fermentas Life Sciences (Burlington, Canadá). La enzima DNA polimerasa y su tampón de reacción se compraron en Biotools Biotechnological & Medical Laboratories (Madrid, España), y los oligonucleótidos se adquirieron de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Estados Unidos). La SMARTScribe™ Reverse Transcriptase fue de Clontech (San José, Canadá, Estados Unidos), y el *RNasin RNase Inhibitor* fue suministrado por Promega (Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

El reactivo jetPEI® y el NaCl empleados en las transfecciones celulares fue de Polyplus Transfection (Illkirch, Francia). Los vectores lentivirales y plásmidos utilizados

fueron suministrados por Cultek (Madrid, España), Addgene (Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos), GenScript, Thermo Fisher Scientific o Sigma-Aldrich. La puromicina utilizada para la selección fue de Sigma-Aldrich.

La proteína A-Sefarosa® y la GammaBind G-Sefarosa® fueron distribuidas por GE Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido). Las membranas de PVDF Immobilon® fueron compradas a Millipore Corporation (Billerica, Massachusetts, Estados Unidos) y las películas de autorradiografía, a Agfa-Gevaert (Mortsel, Bélgica). Los reactivos generales utilizados rutinariamente en el laboratorio fueron adquiridos a través Sigma-Aldrich, Roche Biochemicals (San Louis, MO, Estados Unidos), Merck y USB (Cleveland, Estados Unidos).

1.2. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este trabajo de investigación y su procedencia se encuentran detallados en la Tabla 3 (anticuerpos primarios) y Tabla 4 (anticuerpos secundarios). El procedimiento seguido para la obtención de anticuerpos tanto policlonales como monoclonales en el laboratorio se describe detalladamente en las secciones 1.2.1 y 1.2.2.

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en inmunodetección.

Antígeno	Aplicación	Huésped	Casa comercial y referencia
BUBR1	WB, 1:2.500	Ratón	BD, #612503
Calnexina	WB, 1:40.000	Conejo	Stressgen Bioreagents, SPA-860-F
Calnexina (E-10)	WB, 1:20.000	Ratón	Santa Cruz, #sc-46669
CD3-ζ	WB, 1:1.000	Ratón	Santa Cruz, #sc-66275
DM1*	WB, 1:10.000	Conejo	Generado en nuestro laboratorio
DXd*	WB, 1:5.000	Conejo	Generado en nuestro laboratorio
EGFR (528)	IP, 1 µg	Conejo	(Sato et al., 1983)
EGFR*	WB, 1:10.000	Conejo	(Sanchez-Martin & Pandiella, 2012)
Flag	WB, 1:3.500	Ratón	Sigma-Aldrich, #F1804
GAPDH	WB, 1:10.000	Ratón	Santa Cruz, #sc-166574
HER2	IP, 1 µg	Humano	Roche, (trastuzumab)

HER2 (Ab3)	WB, 1:10.000 IF, 1:40	Ratón	Calbiochem, #OP15
HER3*	IP, 1 µg WB, 1:5.000	Conejo	(Sanchez-Martin & Pandiella, 2012)
LAMP-1	IF, 1:100	Conejo	Cell signaling, #9091
MMAF	WB, 1:5.000	Ratón	Invitrogen, #62538
PADI3	WB, 1:2.000	Ratón	Cell signaling, #393622
pHistona H3	WB, 1:6.000	Conejo	Millipore, #06-570
pro-TGFα (5F1 mAb)	IP, 1 µg	Ratón	BIOTEM
pro-TGFα (16B10 mAb)	IP, 1 µg	Ratón	BIOTEM
pro-TGFα (pAb)	IP, 1 µg	Cabra	R&D, #AF-239-NA
pro-TGFα (R163)*	WB, 1:5.000	Conejo	Generado en nuestro laboratorio
pTyr99	WB, 1:10.000	Ratón	Santa Cruz, #sc-7020
TGFα (Tail)*	IP, 1 µg WB, 1:5.000 IF, 1:3.000	Conejo	(Atanasio Pandiella & Joan Massague, 1991)
YES1	IP, 1 µg WB, 1:3.000	Conejo	Cell signaling, #3201

WB: Western Blot, **IP:** inmunoprecipitación, **IF:** inmunofluorescencia, *Anticuerpos generados en el laboratorio.

Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo de investigación.

Antígeno	Molécula Conjugada y Aplicación	Especie reconocida	Casa comercial y referencia
IgG (H+L)	HRP, WB, 1:20.000	Conejo	Bio-Rad, #170-6515
IgG (H+L)	HRP, WB, 1:10.000	Ratón	GE Healthcare, #NA931
Biotina	HRP, WB, 1:50.000	-	Thermo Fisher Scientific, #N100
IgG (H+L)	Cy TM 2, IF, 1:100	Ratón	GE Healthcare, #PA42002
IgG (H+L)	Cy TM 3, IF, 1:1.000	Conejo	Jackson IR, #111-165-003
IgG (H+L)	Cy TM 3, IF, SCS, 1:2.000	Humano	Jackson IR, #109-165-003
IgG (H+L)	Cy TM 3, SCS, 1:1.000	Cabra	Abcam, #ab6949

H: Cadena pesada de la IgG, **L:** cadena ligera de la IgG, **Cy:** Cianina, **HRP:** peroxidasa de rábano, **SCS:** Single-cell sorting.

1.2.1. Producción de anticuerpos policlonales

1.2.1.1. Acoplamiento de los péptidos

1.2.1.1.1. TGF α (Tail)

Para la producción de anticuerpos policlonales que reconocieran al ligando TGF α , se inmunizaron hembras de conejos de la raza *New Zealand*, distribuidos por la Granja San Bernardo (Tulebras, España), con el péptido sintético (GenScript) que reconocía una región del dominio intracelular de la proteína, acoplado a hemocianina de lapa (KLH, *Keyhole Limpet Hemocyanin*; Calbiochem, Darmstadt, Alemania). Para ello, se añadieron 50 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO, *dimethyl sulfoxide*; Merck) que contenían 1,5 mg de MBS, a 1 mL de KLH, diluida en PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) pH 6 a una concentración final de 10 mg/ml. Se agitó la mezcla durante 30 minutos y se pasó por una columna de Sephadex G-25 para recoger el complejo KLH-MBS. Se midió la absorbancia de las fracciones obtenidas a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro modelo SmartSpec™Plus (Bio-Rad Laboratories; Hercules, California, Estados Unidos), y se juntaron aquellas que mostraron un mayor valor. Paralelamente, se disolvieron 3 mg del péptido sintético en 500 μ l de H₂O milliQ estéril y 100 μ l de DMSO. El péptido disuelto se mezcló con la solución de KLH-MBS, y se mantuvo en agitación moderada durante 1 hora a temperatura ambiente para promover su acoplamiento.

1.2.1.2. Obtención de los antisueros

1.2.1.2.1. TGF α (Tail)

Para la primera inoculación, se mezcló 1 mg del péptido acoplado a KLH-MBS con un volumen equivalente de adyuvante completo de Freund (Pierce, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), añadido en fracciones de 200 μ l, mientras se agitaba vigorosamente. Se sonicó esta solución hasta conseguir una emulsión estable, con un sonicador Vibra-Cell™ (Sonics&Materials Inc.; Newton, Connecticut, Estados Unidos). La mezcla obtenida se inyectó en varios puntos de la región dorsal del conejo siguiendo un protocolo de inmunización intradérmica, por lo que se repartió la dosis de antígeno en varios puntos dorsales del animal. A los 21 días de la primera inoculación, se administró una dosis de recuerdo de 0,5 mg del péptido acoplado a KLH-MBS con adyuvante

incompleto de Freund (Sigma-Aldrich), emulsionándolo de igual manera, pero inyectándolo de forma subaxilar en las patas delanteras del animal. La extracción de sangre se realizó mediante canulación de la arteria central de la oreja 10 días después de la dosis de recuerdo y, a partir de ese momento, cada 15 días. La sangre se dejó coagular, y el suero fue clarificado mediante centrifugación a baja velocidad, conservándose finalmente a -20 °C hasta que se purificaron los anticuerpos por cromatografía de afinidad.

1.2.1.2.2. DXd

Para la obtención de anticuerpos policlonales que reconocieran al fármaco Deruxtecan (DXd), se mezclaron directamente 0,5 mg de T-DXd con un volumen equivalente de adyuvante completo de Freund, sin ser necesario el acoplamiento previo del fármaco a una proteína portadora. El procedimiento realizado para la inmunización del conejo fue exactamente el mismo que para TGF α , realizando una dosis de recuerdo de 0,25 mg de T-DXd 21 días después de la primera inoculación.

1.2.2. Producción de anticuerpos monoclonales

Para la producción propia de los mAb, se cultivaron los hibridomas cedidos por la empresa BIOTEM en Flasks de 75 cm², en medio completo DMEM suplementado con 10% de FBS, 1% de penicilina y estreptomina, y un 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA) (Thermo Fisher Scientific). Al cabo de dos días, las células en suspensión fueron recogidas, centrifugadas durante 3 minutos a 1200 rpm, y re-cultivadas en *hybridoma-serum-free media* (Thermo Fisher Scientific). A los 3-4 días, se recogieron los medios de cultivo de los hibridomas, se clarificaron mediante centrifugación a baja velocidad, y se conservaron a -20°C hasta que se purificaron los anticuerpos por cromatografía de afinidad.

1.2.3. Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad

La purificación de anticuerpos policlonales se realizó mediante cromatografía de afinidad. Para preparar las columnas, se utilizó una matriz de Sefarosa® CL-4B activada con bromuro de cianógeno (CNBr, GE Healthcare) que se incubó con 1 mM HCl durante 15 minutos, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Transcurrido ese tiempo, se

equilibraron con tampón de acoplamiento (0,5 M NaCl; 0,1 M NaOH; pH 8,2) y se añadió el antígeno correspondiente (TGF α o DXd) acoplado a BSA (*bovine serum albumin*), siguiendo el mismo protocolo de acoplamiento que se detalla en el apartado 1.2.1.1. Esta mezcla se incubó toda la noche a 4°C en agitación. A continuación, se realizaron lavados nuevamente con tampón de acoplamiento y se bloquearon los sitios de unión libres de la resina durante 2 horas con 0,1 M Tris pH 8. Seguidamente, se realizaron tres ciclos alternativos de cambio de pH, haciendo pasar tampón acetato 0,1 M pH 4 y tampón Tris 0,1 M pH 8, conteniendo ambos tampones 0,5 M NaCl. Para terminar, se lavaron las columnas con PBS y se conservaron en este mismo tampón con un 0,05% de azida sódica hasta su uso.

Para purificar los anticuerpos, se incubaron los antisueros con su columna durante 2 horas a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C en agitación. Tras la incubación, se recogió el suero y se realizaron lavados consecutivos de la columna con Tris 10 mM pH 8, NaCl 0,5 M, hasta que la absorbancia a 280 nm fue inferior a 0,01. A partir de aquí, se realizó la elución del anticuerpo unido a la columna de afinidad con 1 mL de glicina 0,1 M a pH 2,6. Las fracciones recogidas se neutralizaron con 150 μ l de Tris-HCl pH 8 y se midió la absorbancia de cada una de ellas a 280 nm. Se juntaron las fracciones con mayor absorbancia y se midió la concentración final del anticuerpo mediante el espectofotómetro NanoDrop™.

La purificación de los anticuerpos monoclonales anti-TGF α se realizó mediante cromatografía con proteína A-Sefarosa®, ya que posee una alta capacidad de unión a las inmunoglobulinas de clase G. Se incubaron 100 mL del medio de cultivo de los hibridomas con 4 mL de proteína A-Sefarosa® diluida en PBS (relación 1:1) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, se recogieron los medios y se siguió el mismo procedimiento de lavado y elución de los anticuerpos detallado anteriormente. Se juntaron las fracciones con una absorbancia mayor a 0,2 a 280 nm, y se concentraron por ultrafiltración con un filtro *Amicon® Ultra-4* de 100K (Millipore).

1.2.4. Generación de anticuerpos conjugados a fármacos

1.2.4.1. Conjugación a SMCC-DM1

Para la generación de los anticuerpos conjugados a DM1, se utilizó el reactivo SET0101, de Levena Biopharma (San Diego, California, Estados Unidos). La conjugación del anticuerpo al citotóxico se realizó a través de los grupos NHS-éster del *linker* no procesable SMCC, y los grupos lisinas ubicadas en las cadenas laterales de los anticuerpos. Por esta razón, para asegurar que no había grupos amino que pudieran interferir en la química de conjugación, se cambió el tampón Tris-Glicina en el cual se encontraban eluidos los anticuerpos al *buffer* de conjugación 1 (50 mM KH_2PO_4 ; 50 mM NaCl; 2 mM EDTA; pH 6,5), utilizando un filtro *Amicon® Ultra-0.5* de 100K (Millipore). Paralelamente, se disolvió el reactivo SET0101 en dimetilacetamida (DMA, *dimethylacetamide*) a una concentración final de 10 mM, y se incubaron 7 unidades molares equivalentes de SET0101 a los diferentes anticuerpos. A continuación, se añadió un extra de DMA a la solución de conjugación para obtener un volumen final del disolvente de 10% v/v, y se dejó toda la noche incubando a temperatura ambiente sin agitación. Una vez hecho el acoplamiento, se añadió 1 ml del *buffer* de conjugación 2 (50 mM succinato de sodio; pH 5) a cada anticuerpo, y se quitó el exceso de DM1 libre realizando 4-5 lavados con este mismo *buffer* mediante un filtro *Amicon® Ultra-0.5* de 100K. Finalmente, se esterilizaron los diferentes ADCs mediante un filtro de nitrocelulosa de baja adsorción de 0,22 μm (Millipore), y se realizó la cuantificación final de cada ADC en el NanoDrop™.

1.2.4.2. Conjugación a DXd y MMAF

La conjugación de cetuximab y el anti-TGF α a los citotóxicos DXd y MMAF (MedChemExpress) se realizó a través de los grupos maleimida presentes en el *linker* procesable de ambos agentes citotóxicos, y los residuos de cisteína previamente reducidos de cada anticuerpo. Por este motivo, se cambió el tampón en el que se encontraban los anticuerpos (Tris-Glicina) por un tampón de reducción (100 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl pH 7, 1 mM EDTA), mediante un filtro *Amicon® Ultra-0.5* de 100K. Se calentaron ambos anticuerpos durante 10 min a 37°C, y seguidamente se añadieron 8 unidades molares equivalentes del agente reductor TCEP (*Tris (2-carboxyethyl)*

phosphine, Merck Millipore) a 50 nM, incubando esta mezcla durante 2h a 37°C. Paralelamente, se disolvieron ambos agentes citotóxicos en DMSO a una concentración final de 12 mM. Una vez pasadas las 2h, se añadieron 20 unidades molares equivalentes de cada citotóxico a los anticuerpos ya reducidos, y se dejaron incubar durante 1h a temperatura ambiente. Se bloquearon además los grupos cisteína libres de los anticuerpos mediante la adición posterior de 0,1 mM NEM (*N-ethylmaleimide*, Thermo Fisher) en DMSO durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó una PD10 (GE Healthcare) para eliminar cualquier reactivo de bajo peso molecular que hubiera quedado libre, y se esterilizaron los diferentes ADCs con un filtro de baja retención de proteínas de 0,22 micras. La concentración final de cada anticuerpo conjugado se volvió a medir en el espectrofotómetro NanoDrop™.

2. CULTIVOS CELULARES

2.1. Líneas celulares

Exceptuando los hibridomas y la línea celular CHO-TGF α , todas las líneas utilizadas en este trabajo son de origen humano, y fueron obtenidas en la ATCC (*American Type Culture Collection*). Los clones resistentes a neratinib, denominados BTRN, fueron generados previamente en el laboratorio a partir de la exposición prolongada de la línea celular BT474 a diferentes dosis del fármaco. Las principales características de cada una de ellas se encuentran detalladas en la Tabla 5.

Tabla 5. Líneas celulares utilizadas en este trabajo.

Línea celular	Tejido	Medio de cultivo
BT474	Carcinoma ductal de mama HER2+	DMEM 10% FBS
BTRN #5	Carcinoma ductal de mama HER2+	DMEM 10% FBS
BTRN #6	Carcinoma ductal de mama HER2+	DMEM 10% FBS
BTRN #24	Carcinoma ductal de mama HER2+	DMEM 10% FBS
A498	Adenocarcinoma renal de células claras (ccRCC)	DMEM 10% FBS
ACHN	Adenocarcinoma renal de células claras	DMEM 10% FBS
Caki-2	Adenocarcinoma renal de células claras	DMEM 10% FBS
786-O	Adenocarcinoma renal de células claras	RPMI 10% FBS
769-P	Adenocarcinoma renal de células claras	RPMI 10% FBS
Capan-1	Adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC)	DMEM 10% FBS
NP29	Adenocarcinoma ductal pancreático	DMEM 10% FBS
NP31	Adenocarcinoma ductal pancreático	DMEM 10% FBS

IMIM-PC1	Adenocarcinoma ductal pancreático	DMEM 10% FBS
IMIM-PC2	Adenocarcinoma ductal pancreático	DMEM 10% FBS
SKPC1	Adenocarcinoma ductal pancreático	DMEM 10% FBS
16B10-R2-2F1	Células de mieloma múltiple fusionadas con un linfocito B (Hibridomas)	DMEM 10% FBS 1% NEAA
16B10-R2-3D2	Células de mieloma múltiple fusionadas con un linfocito B	DMEM 10% FBS 1% NEAA
5F1-R3-3F6	Células de mieloma múltiple fusionadas con un linfocito B	DMEM 10% FBS 1% NEAA
HEK293T	Fibroblasto embrionario de riñón	DMEM 10% FBS
CHO-TGFα	Células de ovario de hámster chino transfectadas de manera estable con TGF α (Anklesaria et al., 1990)	DMEM 10% FBS

2.2. Condiciones de cultivo y mantenimiento

Las células utilizadas en este trabajo de investigación fueron cultivadas en placas estériles en un incubador a 37°C, con una atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Según la línea celular, se utilizó medio completo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) o RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) para su cultivo, ambos suplementados con un 10% de FBS, 10 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, y un 1% de NEAA en los casos que se requiriera. Para realizar su subcultivo, las células se lavaron con PBS estéril (2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 8 mM Na₂HPO₄) y se incubaron durante 5 minutos con una solución de 0,25% tripsina-EDTA, que se neutralizó con nuevo medio de cultivo cuando las células se despegaron de la placa. La suspensión celular se transfirió a nuevas placas de cultivo estériles, realizando la dilución apropiada en cada caso según la línea celular.

2.3. Preservación de líneas celulares

Para la conservación de las líneas celulares, las células se tripsinizaron cuando se encontraron en fase de crecimiento exponencial. La suspensión celular se centrifugó durante 3 minutos a 1.200 rpm, y se resuspendió en 1,5 mL de medio de congelación (DMEM o RPMI suplementado con un 10% de DMSO como agente crioprotector). Los crioviales se mantuvieron congelados durante 24h a -80°C, y posteriormente se almacenaron de forma indefinida en un tanque de nitrógeno líquido.

3. MODIFICACIONES GENÉTICAS

3.1. Transfección con plásmidos

Los experimentos de transfección para la expresión estable de proteínas se realizaron mediante el reactivo jetPEI®, siguiendo las indicaciones del fabricante. Por un lado, se mezclaron entre 10 y 20 µg del plásmido de interés con 250 µl de NaCl 150 mM. Por otro, se mezclaron 40 µl de jetPEI® con 250 µl de NaCl, y se adicionó esta mezcla a la anterior. Los lipocomplejos se dejaron incubar durante 25-30 minutos, y pasado este tiempo se adicionaron cuidadosamente sobre el medio de cultivo de las células diana, que se encontraban a un 50-60% de confluencia. A las 24 horas post-transfección, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco, para evitar posibles efectos tóxicos del reactivo de transfección.

3.2. Transducción con lentivirus y retrovirus

Los plásmidos que se utilizaron para la producción de lentivirus en las HEK293T fueron los siguientes:

- **Vector lentiviral** (8 µg): pLKO.1-puro (control negativo, diseñado para no reconocer ningún gen humano) o pLKO.1-shRNA (diseñado para reconocer el gen específico que queremos silenciar).
- **pMDG-VSV-G** (4 µg): Contiene el gen *vsv-g*, encargado de la formación de la envuelta del virus.
- **pRSV-Rev** (4 µg): Contiene el gen *rev*, encargado de la exportación del RNA mensajero del núcleo al citoplasma.
- **pMDL-RRE** (4 µg): Contiene los genes *gag* y *pol*, que codifican para las proteínas estructurales de la partícula viral y las enzimas retrovirales necesarias para el ciclo infectivo del virus. Además, el plásmido contiene la secuencia RRE, que sirve de sitio de unión para la proteína Rev.

Plásmidos utilizados para la producción de retrovirus:

- **Vector retroviral** (6 µg): pLZR_hTGFα (vector que codifica por la proteína humana TGFα).
- **pMDG-VSV-G** (5 µg).
- **pNGVL-MLV-gag-pol** (10 µg): Codifica el cDNA del virus de la leucemia murina. (MLV), concretamente de los genes *gal* y *pol* descritos anteriormente.

A las 24 horas post-transfección, se reemplazó el medio de las células HEK293T por medio fresco. 24 horas después, se recogió el medio de cultivo y se filtró con filtros de PVDF de 0,45 µm, para así retener las posibles células en suspensión. Para aumentar la eficiencia de infección, se añadieron 6 µg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich) al medio filtrado, y éste se utilizó para infectar las células diana. Pasadas unas 8h, se realizó una segunda infección con nuevo medio. 24 horas post-infección, se reemplazó el medio con los virus por medio fresco, y a las 48-72 horas se añadió la concentración de puomicina necesaria para la selección de las células.

3.3. Modificación génica mediante shRNA

Para los experimentos de silenciamiento génico, se probaron hasta 5 vectores lentivirales para cada uno de los mRNA diana del estudio. Aquellos vectores que produjeron un mayor silenciamiento génico de la proteína fueron utilizados finalmente para los experimentos de proliferación celular. Las secuencias de shRNA utilizadas en este trabajo se encuentran detalladas en la Tabla 6.

Tabla 6. Secuencias de los shRNA's utilizados.

Gen	Referencia del clon	Secuencia antisentido (5'-3')
EGFR	TRCN0000039635	TAA TTC CTT GAT AGC GAC GGG
	TRCN0000121070	TTG TCC AGG CTA ATT TGG TGG
TGFA	TRCN0000006375	AAC ACA ATA CCC AGA GCG AAC
	TRCN0000006377	AGC ACA CAT GTG ATG ATA AGG
HER2	TRCN0000010342	ATG TAT AGG TAA CCT GTG AT
	TRCN0000039878	TAC AAA GCC TGG ATA CTG ACA
YES1	TRCN0000001607	ACC ACG AAA GTA GCA ATC AAA
	TRCN0000001611	ACC ACG AAA GTA GCA ATC AAA
PADI3	TRCN0000001636	TGG CAA GGA AGA ACA TGG TTT
	TRCN0000001637	CCA GTA TAA GAG GGA CAA GTT

3.4. Modificación génica mediante CRISPR/Cas9

Para poder eliminar completamente y de forma estable la expresión de los genes *EGFR* y *TGFA*, se editaron de manera irreversible las líneas celulares de ccRCC y PDAC mediante a la tecnología CRISPR/Cas9. Para ello, se co-transfectaron los plásmidos lentivirales necesarios para la formación de los virus, tal y como se detalla en el apartado 3.1, con los plásmidos encargados de la edición genética. Para *EGFR*, se emplearon los vectores pLentiCRISPRv2_EGFR_crRNA1 y pLentiCRISPRv2_EGFR_crRNA2 (GenScript), y para *TGFA* los vectores pLentiCRISPRv2_TGFA_crRNA1, pLentiCRISPRv2_TGFA_crRNA2 y pLentiCRISPRv2_TGFA_crRNA3 (GenScript) (Tabla 7). Los plásmidos encargados de la edición de un mismo gen se transfectaron conjuntamente, siguiendo una relación 1:1 entre ellos. Todos los plásmidos CRISPR son codificadores de una secuencia guía (sgRNA) diferente y complementaria a la secuencia de DNA de interés, la endonucleasa Cas9, que se encarga de cortar la secuencia diana cuando es reconocida por el sgRNA, y el gen de resistencia a la puromicina. En todos los casos, las células fueron seleccionadas a las 72h post-transfección con 3-6 µg/ml de puromicina (según la línea celular), y se separaron los clones potencialmente positivos mediante *single-cell sorting*, tal y como se detalla en el apartado 4.1.

Tabla 7: Plásmidos utilizados para el *knockout* de *EGFR* y *TGFA*.

Gen diana	Plásmido	Secuencia diana del sgRNA
<i>EGFR</i>	pLentiCRISPRv2_EGFR_crRNA1*	TGA GCT TGT TAC TCG TGC CT
	pLentiCRISPRv2_EGFR_crRNA2*	ATA GTT AGA TAA GAC TGC TA
<i>TGFA</i>	pLentiCRISPRv2_TGFA_crRNA1*	CGT ACG TAC CCA GAG CGA AC
	pLentiCRISPRv2_TGFA_crRNA2*	CGC CCG TAA AAT GGT CCC CT
	pLentiCRISPRv2_TGFA_crRNA3*	GTG CAC CAA CGT ACC CAG AA

3.5. Reconstitución génica de *EGFR* y *TGFA* en clones CRISPR

Con el fin de reestablecer la expresión tanto de *EGFR* como de *TGFA* en los diferentes clones CRISPR, se transfectaron ambas proteínas para intentar reconstituir su expresión génica. Para *EGFR*, se transfectaron los diferentes clones con el plásmido pBABE_EGFR-WT (ID 11011, Addgene), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.1. Para *TGFA*, la reconstitución génica se realizó a través de retrovirus con el plásmido pLZR_hTGFA, siguiendo el protocolo descrito el apartado 3.2. Este plásmido fue construido

en el laboratorio, y el procedimiento seguido se encuentra detallado en el apartado 5.1. En todos los casos, los clones derivados fueron separados también por *single-cell sorting*, tal y como se describe en el apartado 4.1.

3.6. Ensayos de proliferación celular

Para poder estudiar la viabilidad, citotoxicidad y capacidad proliferativa de las células, se emplearon dos metodologías diferentes: ensayo por reducción del MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) o contaje celular directo.

3.6.1. Metabolización de MTT

Para realizar este ensayo, las células se sembraron por triplicado en placas de 24 pocillos a una densidad de entre 1.000 y 20.000 células por pocillo, dejando que se asentaran durante 24 horas antes de realizar los tratamientos oportunos. Una vez transcurrido el tiempo de cada tratamiento, se añadió el compuesto MTT al medio de cultivo de cada pocillo, a una concentración final de 5 mg/ml, y se dejó incubar durante 1 hora a 37°C. Tras ese tiempo, el medio de los pocillos se retiró y se añadieron 500 µl de DMSO para disolver los cristales de formazán. Las placas se agitaron durante 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente para disolver los cristales de MTT-formazán y, acto seguido, se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas automático ULTRA Evolution (Tecan; Männedorf, Suiza).

3.6.2. Contaje celular

En los ensayos de proliferación mediante contaje, se sembraron en placas de 6 pocillos entre 3.000 y 25.000 células por pocillo, según la línea celular utilizada, y se trataron de la misma manera que en los ensayos de MTT hasta el día del contaje. Para contar el número de células al final del experimento, el medio de cultivo se retiró de cada placa, se lavaron las células con PBS, se tripsinizaron, y se resuspendieron en medio nuevo para diluirlas posteriormente en ISOTON® (Beckman Coulter, Brea, California, Estados Unidos). El recuento de células se realizó con el contador de partículas Z1 Coulter Particle Counter (Beckman Coulter), y el resultado final se multiplicó por el factor de dilución realizado y el volumen final de cada suspensión celular.

Los resultados obtenidos en ambos ensayos se representaron como la media \pm la desviación estándar (d.e.) de los triplicados de un experimento representativo, y los valores de IC_{50} se calcularon usando la versión 8.0 del programa *GraphPad Prism* (software GraphPad, La Jolla, CA, Estados Unidos).

4. CITOMETRIA DE FLUJO

4.1. *Single-cell sorting*

Con el fin de establecer nuevas líneas celulares con la expresión de *EGFR* o *TGFA* modificada, se aislaron clones puros de las células transfectadas o infectadas con los plásmidos descritos en los apartados 3.4 y 3.5. Para ello, los *pool's* procedentes del *knockout* o reconstitución de *EGFR* se incubaron con 10 nM de cetuximab, y los de *TGFA* con 10 nM del anticuerpo policlonal anti-TGF α (R&D, #AF-239-NA), durante 20 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron, y se resuspendieron en 0,5 mL de PBS suplementado con un 2% de BSA. La suspensión celular se incubó durante 30 minutos en agitación con el anticuerpo secundario fluorescente que correspondiera (anti-human-Cy3 para *EGFR* y anti-Goat-Cy3 para TGF α) y, a continuación, se centrifugaron y resuspendieron las células en PBS estéril. Los diferentes clones se aislaron mediante el equipo FACSAria™ III Cell Sorter (BD Biosciences), que depositó las células en pocillos distintos de placas multipocillos (96 pocillos). La selección se realizó según si eran o no Cy3 positivas, dependiendo de si se buscaba la reconstitución o eliminación de la proteína.

5. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN

5.1. Construcción del vector retroviral pLZR_hTGF α y vectores CAR

Con el fin de reconstituir la expresión de TGF α en los diferentes clones CRISPR, se clonó el gen *TGFA* del vector pCDNA_hTGF α (plásmido producido previamente en el laboratorio, a partir de la clonación del *TGFA* de la línea celular A498 en el vector de expresión pCDNA3.1 (Invitrogen)), en el vector retroviral pLZR-IRES/gfp, cedido por el Dr. Antonio Bernard (Centro Nacional de Biotecnología, Universidad Autónoma de Madrid). Este cambio se realizó en vistas a mejorar la baja eficiencia de transfección que se había obtenido tras varios intentos de utilizar el vector pCDNA_hTGF α .

Para construir el vector EGFR-CAR, se clonó el *EGFR* humano contenido en el vector pBABE_EGFR-WT descrito en el apartado 3.5 en el vector pT2-HB_hNRG1 α _CAR-Sh4-1BB. Este plásmido deriva del vector pT2-HB_CD19_CAR-Sh4-1BB (Cedido por la Dra. Almudena Navarro Bailón, Unidad de Hematología y Hemoterapia, Hospital de Salamanca), al cual se le había clonado anteriormente en el laboratorio la forma humana de la *NRG1 α* .

Para la construcción del vector anti-TGF α -CAR, se clonaron las regiones variables V_H y V_L del anticuerpo monoclonal anti-TGF α , producido por la empresa BIOTEM, en el vector pT2-HB_hNRG1 α _CAR-Sh4-1BB descrito anteriormente. Ambas regiones se encontraban clonadas en el vector TOPO™ TA™ Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific), tal y como se describe al final del apartado 6.

5.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa

Para poder clonar el gen de interés dentro del nuevo vector, fue necesario amplificar en primer lugar los diferentes insertos (*TGFA* del vector pCDNA_hTGF α , *EGFR* del vector pBABE_EGFR-WT, y las regiones V_H y V_L del anti-TGF α mAb clonadas en el plásmido pCR™2.1-TOPO-TA®), mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos utilizados en cada caso se encuentran descritos en la Tabla 8, y los componentes de la reacción se encuentran detallados a continuación:

- Tampón comercial (MgCl₂ 20 mM, Tris-HCl 750 mM pH 9, KCl 500 mM y (NH₄)₂SO₄ 200 mM).
- Mezcla de nucleótidos (dNTPs): 0,2 mM.
- Oligonucleótido sentido: 0,2 μ M.
- Oligonucleótido antisentido: 0,2 μ M.
- Molde de cDNA: 0,5 μ g.
- Taq DNA polimerasa *High-Fidelity*: 1 U.
- H₂O miliQ hasta llegar a un volumen final de 20 μ L.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (PerkinElmer; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), y las condiciones variaron según el gen que se quiso amplificar. El programa utilizado se encontraba constituido por las siguientes etapas:

- **Desnaturalización inicial:** 94°C durante 1-5 minutos.
- **Reacción cíclica:** 25, 35 o 40 ciclos de:
 - o 15-30 segundos a 94°C (etapa de desnaturalización).
 - o 30 segundos a 55-72°C (etapa de anillamiento de los oligonucleótidos).
 - o 1 minuto/kb a 68-72°C (etapa de extensión).
- **Extensión final:** 7 minutos a 68-72°C.

Concretamente, se realizaron 25 ciclos de la reacción cíclica para las regiones V_H y V_L del anti-TGF α mAb, 35 para el gen de *EGFR* pBABE_EGFR-WT, y 40 para el gen de *TGFA* del vector pCDNA_hTGF α .

El análisis del producto de PCR se realizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8-1% con 3 μ g/mL de SYBR Green (NZYTech, Lisboa, Portugal), en tampón TAE 1x. La banda correspondiente al fragmento amplificado se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (GELDoc 2000, BioRad), y su tamaño fue verificado mediante el marcador de peso molecular DNA ladder de 100 pb (Invitrogen). La banda obtenida se recortó con un bisturí, y se purificó del gel de agarosa mediante el kit comercial Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones recomendadas del fabricante.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para PCR.

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')
TGFA	Sentido	GAA GCC ACA AAG CCG GTA AA
	Antisentido	ATA CTT ACC GAG GGC TCA CG
EGFR	Sentido	CCA TCG ATC TGG AGG AAA AGA AAG TTT GC
	Antisentido	CAG GGC GGT CCG TAC TTA GAT TCC GGG ATC TTAG GCC CAT T
TGFA (V_H+V_L)	Sentido	GCT CAT CGA TGA TGT GCA GCT TTC AGG AGT CG
	Antisentido	CCC TGC GGT CCG TAC TTA GAT TCT TTT TAT TTC CCA GCT T

TGFA	Sentido	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA G
Mouse IgG Kappa light chain¹	Antisentido	ACA TTG ATG TCT TTG GGG TAG AAG
TGFA	Sentido	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA G
Mouse IgG heavy chain¹	Antisentido	GGG ATC CAG AGT TCC AGG TC
TGFA	Sentido	GCT CAT CGA TGA TGT GCA GCT TCA GGA GTC G
Clal-V_H^{2,3}		
TGFA	Antisentido	GCC GCT GCC AGG CTT GCC GCT GCC GGA GGT GCT GCC TGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT
V_H-Linker²		
TGFA	Sentido	AAG CCT GGC AGC GGC GAG GGC AGC ACC AAG GGC GAT GTC CAG ATG ACA
Linker-V_L²		
TGFA	Antisentido	CCC TGC GGT CCG TAC TTA GAT TCT TTT ATT TCC AGC TT
VL-StartIgG4-RsrII^{2,3}		

¹: Oligonucleótidos utilizados para amplificar *de novo* las cadenas ligera y pesada del anti-TGF α mAb.

²: Oligonucleótidos utilizados para amplificar las regiones V_H y V_L clonadas en el vector pCR™ 2.1-TOPO-TA®.

³: Oligonucleótidos utilizados en la PCR híbrida.

5.1.2. Digestión mediante enzimas de restricción y ligación

A continuación, se digirieron 2 μ g de cada vector de expresión y 20 μ L del inserto de DNA ya purificado correspondiente, utilizando las enzimas de restricción que se encuentran detalladas en la Tabla 9. La reacción se dejó incubar un mínimo de 2 horas a 37°C, y las digestiones obtenidas se corrieron en un gel de agarosa al 0,8%-1%. Las bandas que se obtuvieron en cada caso se purificaron con el kit descrito anteriormente. Se ligaron los insertos con su vector correspondiente mediante la ligasa de DNA T4 (1 unidad por reacción), durante un mínimo de 2 horas a temperatura ambiente. La ligación se transformó en bacterias competentes *E. coli* DH5 α por transformación lenta, y todos los vectores de expresión se mandaron a secuenciar al Servicio de Genómica del CIC. Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de cada vector se encuentran descritos en la Tabla 8.

Tabla 9. Enzimas de restricción utilizadas para digerir los diferentes insertos y vectores de expresión.

Inserto/plásmido	Enzimas de restricción	Sitio de corte (5'-3')
TGFA	BamHI	G/GATCC
pLZR-IRES/gfp	XhoI	C/TCGAG
EGFR	Cla I	AT/CGAT
pBABE_EGFR-WT	Rsr II	CG/GACCG

$V_H + V_L$	Cla I	AT/CGAT
pT2-HB_CD19_CAR-Sh4-1BB	Rsr II	CG/GACCG
pCR™2.1-TOPO-TA®	EcoRI	G/AATTC

6. SECUENCIACIÓN *DE NOVO* DE LAS REGIONES VARIABLES DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-TGF α

Para poder construir el vector anti-TGF α -CAR, fue necesario obtener en primer lugar las secuencias de las regiones variables de las cadenas tanto ligera como pesada del anticuerpo monoclonal, producido a partir del hibridoma 16B10-R2-3D2. Una vez obtenidas y clonadas en el plásmido pCR™2.1-TOPO-TA®, se procedió a clonarlas en el vector de expresión pT2-HB_hNRG1 α _CAR-Sh4-1BB, tal y como se detalla en el apartado 5.

6.1. Extracción y purificación de RNA

La extracción y purificación de RNA de las células se realizó siguiendo las instrucciones del kit *RNeasy mini Kit* de Qiagen (Hilden, Alemania). Las células se sembraron en placas de 100 mm hasta alcanzar una confluencia de entre el 60-80%. A continuación, se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron en 600 μ L de solución de lisis (proporcionada por el *kit*) suplementada con 10 μ L/mL de β -mercaptoetanol. Las células se recogieron con ayuda de un raspador y se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. A partir de aquí, se siguió el protocolo descrito por el fabricante, y el RNA purificado que se obtuvo se conservó a -80°C hasta su uso.

6.2. Síntesis de cDNA a partir de RNA: RT-PCR

Una vez obtenida la muestra de RNA del hibridoma, se procedió a la síntesis del cDNA de las regiones variables del anticuerpo monoclonal, siguiendo el protocolo de hibridación *de novo* de secuencias desconocidas descrito por Meyer (Meyer et al., 2019). Para ello, se realizó una RT-PCR modificada utilizando la tecnología SMART, basada en las propias características intrínsecas de la transcriptasa inversa MMLV-RT, pero con la particularidad de utilizar un cebador sentido con 3 riboguaninas (rGrGrG) en su extremo 3' (ver Tabla 10).

Para amplificar las regiones variables, se diseñaron los cebadores antisentido para la RT-PCR en una zona constante altamente conservada en los anticuerpos de ratón, tanto de la cadena ligera (tipo *kappa*) como de la pesada (IgG, H) del anticuerpo monoclonal. Al inicio de la transcripción, el cebador antisentido de cada cadena se unió a la región constante del RNA del hibridoma, lo que produjo el reconocimiento de la transcriptasa inversa por la zona y con ello el inicio de la transcripción. Cuando la MMLV llegó al extremo 5' durante la síntesis de la primera cadena, ésta agregó varios nucleótidos desoxicitosina (rC) al extremo 3' del cDNA, permitiendo la hibridación del cebador sentido que contenía las 3 riboguaninas. El apareamiento producido entre las rG del oligonucleótido y las rC del cDNA en síntesis produjo que la MMLV se uniera a la cadena de cDNA y continuara la polimerización, utilizando el cebador sentido como plantilla en lugar del RNA del hibridoma, hasta alcanzar el extremo 5'.

La síntesis de cada cDNA se realizó preparando una mezcla inicial que contenía: 1 µL del cebador sentido 10 µM, 2 µL de RNA a 50 ng/µL y 1 µL de dNTPs Mix 10 mM en un volumen final de 15 µL. Las muestras se calentaron durante 3 minutos a 37°C en el termociclador, y tras ese tiempo se añadió el resto de componentes de la reacción en el siguiente orden: 2 µl de tampón de reacción de la polimerasa SMARTScribe 5X (Clontech, San José, California, USA), 1 µl de 20 mM DTT (ditiotreitól), 0,3 µl del cebador antisentido, 0,25 µl de RNasin (*Recombinant Ribonuclease Inhibitor*, 40 U/µl) y en último lugar, 1 µl de la enzima transcriptasa reversa SMARTScribe-MMLV (100 U/ µl). La reacción de retrotranscripción se realizó durante 1 hora a 42°C, realizando una incubación extra al final de 5 minutos a 70°C para inactivar la enzima.

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para RT-PCR.

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')
Mouse IgG Kappa light chain	Sentido	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CAT GRGRGR*
	Antisentido	TTG TCG TTC ACT GCC ATC AAT C
Mouse IgG Kappa heavy chain	Sentido	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CAT GRGRGR*
	Antisentido	AGC TGG GAA GGT GTG CAC AC

*RG: Riboguaninas.

Una vez obtenido el cDNA, se amplificaron ambas regiones variables mediante PCR, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.1.1. Los productos de PCR

obtenidos se validaron mediante un gel de agarosa al 1%, y las bandas se recortaron y purificaron utilizando el kit comercial *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification*.

6.3. Clonación de las regiones variables en pCR™2.1-TOPO-TA®

Para poder secuenciar ambas regiones variables, los productos de PCR fueron clonados en el vector plasmídico pCR™2.1-TOPO-TA® (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. Seguidamente, se transformaron bacterias competentes DH5α para amplificar cada vector, y los plásmidos resultantes se validaron mediante su digestión con EcoRI. Aquellos que habían introducido correctamente el inserto se mandaron a secuenciar, utilizando los oligonucleótidos universales M13, proporcionados por el propio *kit*.

6.4. Alineamiento y análisis de datos

Para confirmar la identidad de cada secuencia, se secuenciaron un mínimo de 3 plásmidos de cada región variable, y se alinearon entre ellas mediante la herramienta web Clustal Omega (EMBL-EBI) (Sievers & Higgins, 2014). Una vez identificada la secuencia consenso de cada región, se transformó la secuencia de DNA a proteína mediante ExpAsy (Swiss Institute of Bioinformatics, SIB) (Artimo et al., 2012). A partir de aquí, se utilizó la base de datos IMGT® (*International ImMunoGeneTics information system*®) (Lefranc et al., 2009) para determinar el porcentaje de identidad de las regiones variables, a partir de su alineamiento con secuencias de referencia de otras inmunoglobulinas. Una vez se validó la obtención de las regiones variables del anticuerpo monoclonal anti-TGFα, se procedió a su unión para poderlas clonar posteriormente en el vector CAR.

6.5. PCR híbrida

Con el fin de tener las regiones variables del anticuerpo en un único inserto, y así poderlas clonar conjuntamente en el vector CAR, se fusionaron las regiones V_H y V_L contenidas en los plásmidos V_H_pCR™2.1-TOPO-TA® y V_L_pCR™2.1-TOPO-TA® mediante el método de PCR híbrida, descrito por Hilgarth (Hilgarth & Lanigan, 2020). Para ello, se amplificaron por PCR las regiones V_H y V_L de cada plásmido, utilizando los oligonucleótidos detallados en la Tabla 8. Los productos de PCR se corrieron en un gel

de agarosa al 1%, y las bandas obtenidas se cortaron y purificaron. A continuación, se realizaron dos PCRs consecutivas para hibridar los amplicones. En la primera PCR, se mezclaron en cantidades equimoleculares los dos amplicones sin añadir oligonucleótidos a la reacción. De esta manera, se facilitó la unión espontánea de los dos amplicones, sin la necesidad de ningún cebador. La segunda PCR se realizó para amplificar el DNA que se había unido (amplicón completo) en la PCR anterior. Para ello, se adicionaron a la reacción los oligonucleótidos sentido y antisentido de los extremos, detallados en la Tabla 8. El resultado de la PCR se corrió en un gel de agarosa al 1%, y la banda obtenida se recortó y purificó. El programa de PCR seguido fue el mismo en todos los casos (apartado 5.1.1.), y el procedimiento íntegro que se siguió se encuentra detallado en la Figura 48 de “Resultados”.

Una vez obtenido el inserto con la secuencia completa de las regiones V_H y V_L del anticuerpo, se clonó en el vector pT2-HB_hNRG1 α _CAR-Sh4-1BB, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.1.2.

7. MICROARRAYS DE RNA

7.1. Extracción y purificación del RNA

La extracción y purificación del RNA de la línea celular BT474 y los clones resistentes a neratinib se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.1. Se extrajo el RNA de las células en 3 días diferentes, para así tener 3 réplicas de cada línea celular a la hora de hibridar.

7.2. Cuantificación, análisis de calidad e hibridación del RNA

La cuantificación, así como el análisis de la calidad y pureza del RNA obtenido, se realizó mediante el equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies; Santa Clara, California, Estados Unidos). Una vez pasado el control de calidad, las muestras de RNA se marcaron con biotina, se sintetizó su cDNA, y se hibridó con el *Affymetrix GeneChip™ Human Gene 2.0 ST* (Affymetrix, Santa Clara, Estados Unidos). La intensidad de fluorescencia emitida tras la hibridación de los cDNA con los genes del chip se cuantificó mediante el *GenArray Scanner* (Hewlett-Packard; Palo Alto, California, Estados Unidos).

Todos los resultados de este apartado fueron proporcionados por el servicio de Genómica del CIC.

7.3. Análisis de datos

Los resultados en crudo de la hibridación se obtuvieron como archivos CEL. Para encontrar los genes que se encontraban diferencialmente expresados (DEGs) entre la línea BT474 y los clones resistentes a neratinib, se estableció una tasa de cambio en la intensidad de fluorescencia (*fold change*) de ≥ 2 ó ≤ -2 , y un *p*-valor en el estadístico ANOVA $\leq 0,01$. El programa utilizado para la identificación de los DEGs fue el *Transcription Analysis Console 4.0* (Affymetrix).

8. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

8.1. Preparación de lisados celulares

Para obtener los extractos proteicos de las diferentes líneas celulares, las células se lavaron dos veces con PBS frío, se incubaron durante 10 minutos en hielo con 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 μ M pepstatina, 1 μ g/ml aprotinina, 1 μ g/ml leupeptina) y fosfatasas (25 mM β -glicerol fosfato, 50 mM fluoruro sódico, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1 mM ortovanadato sódico). Tras ese tiempo, las células se recogieron en tubos eppendorf de 1,5 mL con la ayuda de un raspador, y se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C y 12.000 rpm, en una centrífuga refrigerada (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Los sobrenadantes se clarificaron en nuevos tubos eppendorf, y se cuantificó la cantidad de proteína de cada lisado celular mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA, *bicinchoninic acid*), utilizando el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante.

8.2. Inmunoprecipitación

Para realizar este proceso, se incubó la cantidad de extracto proteico necesario (0,25-2 mg, según la proteína a detectar) con el anticuerpo correspondiente y 40 μ l de proteína A-Sefarosa® o GammaBind G-Sefarosa®, en función del tipo de IgG. La mezcla se dejó a 4°C durante un mínimo 2 horas, y los inmunocomplejos se lavaron posteriormente 3 veces con 1 mL de tampón de lisis frío. Cada muestra se resuspendió

en 20 µl de tampón de carga 2x (2% SDS, 0,0125% azul de bromofenol, 10% glicerol, 1% β-mercaptoetanol, 50 mM Tris-HCl pH 6,8), y se guardaron a -20°C hasta su uso.

8.3. Inmunoprecipitación en superficie

Para inmunoprecipitar proteínas de la superficie celular, las células se cultivaron en placas de 100 mm, 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 2 horas a 4°C en 2 mL de KRH con 1,5 µg/mL de los anticuerpos anti-TGFα o trastuzumab. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS frío, y se lisaron y clarificaron las células siguiendo el protocolo descrito en el apartado 8.1. Una vez cuantificadas las muestras, los extractos celulares se precipitaron con proteína A-Sefarosa® o GammaBind G-Sefarosa® durante 30 minutos a 4°C. Pasado ese tiempo, se lavaron los inmunocomplejos y se procedió a detectar la proteína de interés mediante *Western Blot*.

8.4. Biotinilación de TGFα en la superficie celular

Con el objetivo de validar la cantidad de TGFα que se encontraba expuesto en la superficie celular, se biotinilaron las proteínas de la membrana de las células de ccRCC y PDAC mediante el reactivo *EZ-Link™ NHS-SS-Biotin* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello, las células se lavaron 2 veces en PBS frío, y se incubaron durante 30 minutos a 4°C con 5 mg/mL de NHS-SS-Biotina, diluida previamente en DMSO. Transcurrido ese tiempo, las células se volvieron a lavar en PBS, y se bloqueó la NHS-SS-Biotina no unida a proteínas con 50 mM de NH₄Cl durante 10 minutos a 4°C. Se realizó un tercer lavado en PBS frío y, finalmente, las células se lisaron con 500 µl de tampón de lisis, tal y como se describe en el apartado 8.1. Una vez cuantificadas las muestras, se inmunoprecipitó TGFα en 2 mg de extracto celular, y el TGFα expuesto en la membrana celular (y que por lo tanto se encontraba biotinilado) se inmunodetectó utilizando el reactivo Estreptavidina_HRP (GE Healthcare).

8.5. Detección de TGFα soluble en el medio de cultivo

Para analizar la cantidad de TGFα soluble que se liberaba en el medio de cultivo, se cultivaron entre 10-12 placas de 100 mm de cada línea celular en medio completo

hasta alcanzar la confluencia deseada. 24 horas antes de realizar el experimento, se cambió el medio de cultivo por medio DMEM o RPMI sin FBS, dejando que las células lo condicionaran. Los medios fueron recogidos, centrifugados a 1.200 rpm durante 3 minutos para eliminar los restos celulares, y concentrados mediante ultrafiltración con un filtro Amicon® Ultra de 3K (Merck Millipore), hasta conseguir un volumen final de 150 µL. Se añadió tampón de carga a los medios condicionados y las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10-15%. Las proteínas fueron separadas finalmente por SDS-PAGE, y se validó la cantidad de TGF α soluble en los diferentes medios concentrados mediante la técnica de *Western Blot*.

8.6. Electroforesis y *Western Blot*

La separación y posterior detección de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Para ello, las muestras de extracto proteico total o inmunoprecipitadas se hirvieron durante 7 minutos a 100°C. Las muestras se cargaron en el gel y se realizó la separación de proteínas mediante electroforesis en cubetas pequeñas Mini-PROTEAN®3 (BioRad) o grandes tipo *Sturdier*, a un determinado voltaje (150V para los geles pequeños o 200V para los geles grandes), en tampón de electroforesis (Tris-HCl 20 mM, Glicina 192 mM, y 1% de SDS). El porcentaje del gel realizado en cada caso varió en función del peso molecular de la proteína.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PDVF, siguiendo dos estrategias complementarias:

- **Sistema de transferencia húmeda:** Las proteínas se transfirieron a una membrana Inmobilon® de PVDF con un tamaño del poro de 0,45 µM, mediante el sistema *Trans-Blot*® de Bio-Rad. La transferencia se realizó a 500 mA constantes en tampón Tris 25 mM, Tris-Glicina 192 mM, durante el intervalo de tiempo requerido según el porcentaje del gel utilizado y sus dimensiones.
- **Sistema de transferencia semiseca:** Las proteínas se transfirieron de manera rápida a una membrana Trans Blot Turbo Mini de PVDF (Bio-Rad Laboratories) con el tamaño del poro de 0,2 µM, mediante el sistema TransBlot® Turbo™ Transfer System de la misma casa comercial. El voltaje, amperaje y tiempo

necesario para realizar la transferencia se establecieron según las indicaciones del fabricante.

Una vez transferidas las proteínas, las membranas se bloquearon durante al menos una hora con 1% de BSA en TBS-T (*Tris-buffered saline with Tween*, NaCl 140 mM, 0,05% Tween, Tris 10 mM pH 7,5) y, seguidamente, con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 3) durante mínimo 1 hora, en tampón TBS-T. Tras la unión antígeno-anticuerpo, las membranas se lavaron 3 veces durante 7 minutos en tampón de lavado, y se incubaron a continuación con el anticuerpo secundario que correspondiera en cada caso (Tabla 4), durante 30 minutos en TBS-T. Las membranas se volvieron a lavar 3 veces durante 7 minutos en tampón de lavado, y las diferentes proteínas se detectaron por autoradiografía mediante su incubación durante 1 minuto en solución de revelado normal (luminol 0,08%, *p*-yodofenol 0,02%, Tris-HCl 0,1 M pH 9,3) a la que se le añadió 0,44 mM de H₂O₂, o 5 minutos en tampón de revelado más potente (mezcla 1:1 de la **solución A**: 10 mM luminol, 6 mM PTZ-343, 1 mM Imidazol, 0,3 M Tris pH 8,9, y **solución B**: 50 mM de acetato sódico pH 5,8, 8 mM perborato sódico).

La detección de final de las proteínas se realizó con películas Agfa CP-BU NEW, o mediante el equipo ChemiDoc MP System (Bio-Rad Laboratories). La cuantificación de la intensidad de las bandas ofrecida por el equipo ChemiDoc se realizó mediante el programa *Image Lab™ Sowntware Version 6.0.1* (Bio-Rad Laboratories).

8.7. Arrays de proteínas

Con el fin de comparar el estado de fosforilación de proteínas y receptores tirosina quinasa activos en la línea celular BT474 y los clones resistentes a neratinib, se realizaron *arrays* de anticuerpos comerciales (*Human Phospho-Receptor Tyrosin Kinase Array Kit - Proteome Profiler™*; *Human Phospho-Kinase Array Kit – Proteome Profiler™*, R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos), siguiendo en cada caso las indicaciones del fabricante. La activación de los diferentes RTKs y TKs fue detectada por duplicado al hibridar 500 µg de lisado celular con las membranas de nitrocelulosa proporcionadas por el kit. Los anticuerpos de cada membrana se unieron a las proteínas diana de cada línea celular, y el estado de fosforilación de las mismas se detectó

utilizando anticuerpos también proporcionados en el *kit* comercial. Cada *kit* permitió detectar de manera simultánea la fosforilación relativa de 39 RTKs y TKs diferentes, y la intensidad de los píxeles relativos al estado de fosforilación de cada proteína se realizó mediante el programa *Image Lab™ Software Version 6.0.1* (Bio-Rad Laboratories).

9. INMUNOFLUORESCENCIA

9.1. Internalización del anti-TGF α -mAb y colocalización con LAMP-1

Para estudiar la capacidad de internalización y llegada a los lisosomas del anticuerpo anti-TGF α , se cultivaron las células sobre cubreobjetos en placas de 35 mm, y se trataron con 2,5 nM del anticuerpo durante toda la noche. Para favorecer la visualización del anticuerpo dentro de los lisosomas, se incubaron las células en paralelo con 50 μ M de cloroquina (CQ) (Sigma), un fármaco que impide la degradación lisosomal, 3 horas antes de ser tratadas con el anticuerpo.

Al día siguiente, las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con 1 mM CaCl₂ y 0,5 mM MgCl₂ (PBS⁺⁺), y se fijaron durante 30 minutos con paraformaldehído al 2% en la solución anterior. A continuación, las células se lavaron 2 veces durante 5 minutos en PBS⁺⁺, y se incubaron 10 minutos con NH₄Cl 50 nM para eliminar la posible autofluorescencia. Seguidamente, se permeabilizaron las membranas de las células con 0,1% de Tritón-X100 en PBS⁺⁺ durante 10 minutos, y se bloquearon las uniones inespecíficas durante 1 hora en PBS⁺⁺ y 0,2% de BSA. A partir de aquí, las células se incubaron con el anticuerpo primario encargado de reconocer la glicoproteína de membrana asociada a lisosomas 1 (LAMP1, *lysosomal-associated membrane protein 1*) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron seguidamente las células 3 veces durante 7 minutos en PBS⁺⁺ suplementado con 0,2% BSA, y se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-mouse_Cy3 y anti-rabbit_Cy2, encargados de reconocer los anticuerpos anti-TGF α y LAMP1, respectivamente. Se lavaron finalmente las células 3 veces durante 7 minutos en PBS⁺⁺ 0,2% BSA, y se tiñeron los núcleos durante 10-15 segundos con 1 μ g/mL de DAPI en H₂O MiliQ. Finalmente, se fijaron los cubreobjetos mediante Gelvatol (12% mowiol; 30% glicerol; 0,12 M Tris pH 8,5) en portaobjetos de vidrio, y se analizaron las inmunofluorescencias en el microscopio confocal Leica TCS SP5

(Leica Microsystems CMS, Wetzlar, Alemania) del servicio de microscopía confocal del CIC.

La colocalización entre ambas proteínas se analizó mediante el programa *Leica Application Suite Advanced Fluorescence* (LAS AF versión 2.7.3.9723, Leica Microsystems), que permitió estimar el porcentaje de colocalización entre ambas proteínas, en base al análisis de la dispersión de las señales de fluorescencia dentro de la región de interés (ROI) respecto a la fluorescencia total del campo estudiado.

10. ESTUDIOS *IN VITRO*

10.1. Activación del receptor de EGF

Con el fin de evaluar la capacidad de TGF α para activar el receptor de EGF, las distintas líneas celulares fueron cultivadas con medio completo hasta alcanzar la confluencia deseada. Doce horas antes del experimento, las células fueron serodeprivadas, sustituyendo el medio de cultivo por DMEM o RPMI (según la línea celular) sin suero. Al día siguiente, se estimularon las células durante 10 minutos a 37°C con 10 nM de la forma soluble de TGF α (proteína recombinante), utilizando como control células sin estimular. Tras ese tiempo, las células se lisaron siguiendo el protocolo estándar y se analizó el estado de fosforilación del receptor de EGF tras inmunoprecipitar la proteína por *Western Blot*, utilizando el anticuerpo anti-pTyr99 descrito en la Tabla 3.

10.2. Capacidad bloqueante de los anticuerpos anti-TGF α

Para analizar si el anticuerpo anti-TGF α tenía la capacidad de bloquear la activación de EGFR, se cultivó la línea celular ACHN de ccRCC en medio completo hasta alcanzar un 60-70% de confluencia. Se cambió el medio de las células por medio sin FBS y se dejó incubar toda la noche previa al experimento. Al día siguiente, se incubaron las células durante 10 minutos a 37°C con 3 condiciones diferentes: (1) medio sin FBS (condición control), (2) medio sin FBS con 10 nM de TGF α soluble, y (3) medio sin suero con 10 nM de TGF α soluble y 2,5 nM de los anticuerpos anti-TGF α , habiéndolos competido previamente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Acto seguido, las células se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron siguiendo el protocolo

convencional. Se inmunoprecipitó EGFR de cada extracto celular y se analizó su estado de fosforilación, tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

11. ESTUDIOS *IN VIVO*

11.1. Cepas de ratón y mantenimiento de los animales

Para el estudio *in vivo*, se utilizaron hembras de ratón BALB/cOlaHsd-Foxn1n de seis semanas de edad y con un peso de aproximadamente 20 gramos, obtenidas a partir del proveedor de animales de laboratorio Envigo.

El mantenimiento y manipulación de los animales se realizó en una zona libre de patógenos dentro de 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 de animales utilizados para fines científicos.

11.2. Producción de xenoinjertos

Para estudiar el efecto tanto del anticuerpo anti-TGF α como del ADC anti-TGF α -MMAF en modelos experimentales *in vivo*, se inyectaron las células NP29 de PDAC en los ratones previamente descritos. Para ello, se resuspendieron un total de 5×10^6 células por ratón en 50 μ l de DMEM y 50 μ l de Matrigel (BD Biosciences), y se inyectaron subcutáneamente en el lomo de los ratones cuando alcanzaron las 8 semanas de edad. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de entre 150-200 mm³, los ratones se randomizaron según el tamaño de la masa tumoral en tres grupos (n=6), y se trataron intraperitonealmente una vez a la semana con anti-TGF α y anti-TGF α -MMAF (3,33 mg/kg). El tamaño de los tumores se midió dos veces por semana mediante un pie de rey, y el peso de los ratones se controló esos mismos días para asegurarnos que no existían efectos tóxicos en el animal. El volumen tumoral obtenido en cada medición se calculó y representó aplicando la siguiente fórmula: volumen = ancho² x longitud/2. Los ratones finalmente se sacrificaron el día 21 de tratamiento.

12. ESTUDIOS *IN SILICO*

El análisis de la expresión de *EGFR* y *TGFA* en las líneas celulares de cáncer se llevó a cabo a partir de datos genómicos de acceso público disponibles en *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) (Ghandi et al., 2019).

Los análisis comparativos de la expresión génica de *EGFR*, *TGFA*, *MGP*, *PADI3* y *SERPINB5* en tejido normal y tumoral a partir de datos de RNA-Seq se realizaron con la herramienta web TNMplot (Bartha & Gyórfy, 2021).

El diseño de oligonucleótidos para PCR y RT-PCR se realizó con el programa Primer3 (Untergasser et al., 2012).

Las secuencias de proteína de la región variable tanto de la cadena ligera como pesada del anticuerpo monoclonal anti-TGF α , se obtuvieron mediante el servidor web ExPASy (Artimo et al., 2012), a partir de sus correspondientes secuencias de DNA.

El análisis y comparación de las regiones variables del anticuerpo monoclonal anti-TGF α con otras inmglobulinas de ratón se realizó mediante la base de datos IMGT (Lefranc et al., 2009).

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico de los datos experimentales de este trabajo se realizó con el programa GraphPad Prism 8 (San Diego, Estados Unidos). La prueba de *Shapiro-Wilk* se utilizó para contrastar la normalidad del conjunto de datos, y la prueba de *Levene* para evaluar la igualdad de varianzas de los grupos comparados. Según el resultado obtenido en estas pruebas, se aplicó el test *t* de *Student* de dos colas o el test U de Mann-Whitney para la comparación de variables continuas entre dos grupos. En todos los casos, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el *p-valor* fue inferior a 0,05.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdollahpour-Alitappeh, M., Lotfinia, M., Gharibi, T., Mardaneh, J., Farhadhosseinabadi, B., Larki, P., Faghfourian, B., Sepehr, K. S., Abbaszadeh-Goudarzi, K., Abbaszadeh-Goudarzi, G., Johari, B., Zali, M. R., & Bagheri, N. (2019). Antibody-drug conjugates (ADCs) for cancer therapy: Strategies, challenges, and successes. *J Cell Physiol*, 234(5), 5628-5642. <https://doi.org/10.1002/jcp.27419>
- Abou-Jawde, R., Choueiri, T., Alemany, C., & Mekhail, T. (2003). An overview of targeted treatments in cancer. *Clin Ther*, 25(8), 2121-2137. [https://doi.org/10.1016/s0149-2918\(03\)80209-6](https://doi.org/10.1016/s0149-2918(03)80209-6)
- Abuhelwa, Z., Alloghbi, A., & Nagasaka, M. (2022). A comprehensive review on antibody-drug conjugates (ADCs) in the treatment landscape of non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cancer Treat Rev*, 106, 102393. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2022.102393>
- Adem, Y. T., Schwarz, K. A., Duenas, E., Patapoff, T. W., Galush, W. J., & Esue, O. (2014). Auristatin antibody drug conjugate physical instability and the role of drug payload. *Bioconjug Chem*, 25(4), 656-664. <https://doi.org/10.1021/bc400439x>
- Ahmed, D., Puthussery, H., Basnett, P., Knowles, J. C., Lange, S., & Roy, I. (2021). Controlled Delivery of Pan-PAD-Inhibitor Cl-Amidine Using Poly(3-Hydroxybutyrate) Microspheres. *Int J Mol Sci*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312852>
- Al-Ejeh, F., Pajic, M., Shi, W., Kalimutho, M., Miranda, M., Nagrial, A. M., Chou, A., Biankin, A. V., Grimmond, S. M., Australian Pancreatic Cancer Genome, I., Brown, M. P., & Khanna, K. K. (2014). Gemcitabine and CHK1 inhibition potentiate EGFR-directed radioimmunotherapy against pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 20(12), 3187-3197. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0048>
- Anklesaria, P., Teixido, J., Laiho, M., Pierce, J. H., Greenberger, J. S., & Massague, J. (1990). Cell-cell adhesion mediated by binding of membrane-anchored transforming growth factor alpha to epidermal growth factor receptors promotes cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(9), 3289-3293.
- Appert-Collin, A., Hubert, P., Cremel, G., & Bennisroune, A. (2015). Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Front Pharmacol*, 6, 283. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00283>
- Arora, A., & Scholar, E. M. (2005). Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther*, 315(3), 971-979. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.084145>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.025>
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., De Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., & Gasteiger, E. (2012). EXPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic acids research*, 40(W1), W597-W603.
- Awada, A., Dirix, L., Manso Sanchez, L., Xu, B., Luu, T., Dieras, V., Hershman, D. L., Agrapart, V., Ananthakrishnan, R., & Staroslawska, E. (2013). Safety and efficacy of neratinib (HKI-272) plus vinorelbine in the treatment of patients with ErbB2-positive metastatic breast cancer pretreated with anti-HER2 therapy. *Ann Oncol*, 24(1), 109-116. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds284>
- Ayala de la Pena, F., Andres, R., Garcia-Saenz, J. A., Manso, L., Margeli, 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. <https://doi.org/10.1007/s12094-018-1973-6>
- Baah, S., Laws, M., & Rahman, K. M. (2021). Antibody-Drug Conjugates-A Tutorial Review. *Molecules*, 26(10). <https://doi.org/10.3390/molecules26102943>
- Bardia, A., Mayer, I. A., Vahdat, L. T., Tolaney, S. M., Isakoff, S. J., Diamond, J. R., O'Shaughnessy, J., Moroosse, R. L., Santin, A. D., Abramson, V. G., Shah, N. C., Rugo, H. S., Goldenberg, D. M., Sweidan, A. M., Iannone, R., Washkowitz, S., Sharkey, R. M., Wegener, W. A., &

- Kalinsky, K. (2019). Sacituzumab Govitecan-hziy in Refractory Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*, 380(8), 741-751. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1814213>
- Bargh, J. D., Walsh, S. J., Isidro-Llobet, A., Omarjee, S., Carroll, J. S., & Spring, D. R. (2020). Sulfatase-cleavable linkers for antibody-drug conjugates. *Chem Sci*, 11(9), 2375-2380. <https://doi.org/10.1039/c9sc06410a>
- Bartha, Á., & Györfy, B. (2021). TNMplot.com: a web tool for the comparison of gene expression in normal, tumor and metastatic tissues. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2622.
- Beidler, C. B., Petrovan, R. J., Conner, E. M., Boyles, J. S., Yang, D. D., Harlan, S. M., Chu, S., Ellis, B., Datta-Mannan, A., Johnson, R. L., Stauber, A., Witcher, D. R., Breyer, M. D., & Heuer, J. G. (2014). Generation and activity of a humanized monoclonal antibody that selectively neutralizes the epidermal growth factor receptor ligands transforming growth factor-alpha and epiregulin. *J Pharmacol Exp Ther*, 349(2), 330-343. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.210765>
- Bonanno, L., Jirillo, A., & Favaretto, A. (2011). Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and new therapeutic perspectives in non small cell lung cancer. *Curr Drug Targets*, 12(6), 922-933. <https://doi.org/10.2174/138945011795528958>
- Bose, R., Kavuri, S. M., Searleman, A. C., Shen, W., Shen, D., Koboldt, D. C., Monsey, J., Goel, N., Aronson, A. B., Li, S., Ma, C. X., Ding, L., Mardis, E. R., & Ellis, M. J. (2013). Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. *Cancer Discov*, 3(2), 224-237. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0349>
- Bosenberg, M. W., Pandiella, A., & Massague, J. (1993). Activated release of membrane-anchored TGF-alpha in the absence of cytosol. *J Cell Biol*, 122(1), 95-101. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.1.95>
- Bourillon, L., Bourgier, C., Gaborit, N., Garambois, V., Lles, E., Zampieri, A., Ogier, C., Jarlier, M., Radosevic-Robin, N., Orsetti, B., Delpech, H., Theillet, C., Colombo, P. E., Azria, D., Pelegrin, A., Larbouret, C., & Chardes, T. (2019). An auristatin-based antibody-drug conjugate targeting HER3 enhances the radiation response in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 145(7), 1838-1851. <https://doi.org/10.1002/ijc.32273>
- Brachmann, R., Lindquist, P. B., Nagashima, M., Kohr, W., Lipari, T., Napier, M., & Derynck, R. (1989). Transmembrane TGF-alpha precursors activate EGF/TGF-alpha receptors. *Cell*, 56(4), 691-700. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90591-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90591-6)
- Branella, G. M., & Spencer, H. T. (2021). Natural Receptor- and Ligand-Based Chimeric Antigen Receptors: Strategies Using Natural Ligands and Receptors for Targeted Cell Killing. *Cells*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/cells11010021>
- Breslin, S., Lowry, M. C., & O'Driscoll, L. (2017). Neratinib resistance and cross-resistance to other HER2-targeted drugs due to increased activity of metabolism enzyme cytochrome P4503A4. *Br J Cancer*, 116(5), 620-625. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.445>
- Burger, J. A., Ghia, P., Rosenwald, A., & Caligaris-Cappio, F. (2009). The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood*, 114(16), 3367-3375. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-225326>
- 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. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00350-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00350-2)
- Burstein, H. J., Sun, Y., Dirix, L. Y., Jiang, Z., Paridaens, R., Tan, A. R., Awada, A., Ranade, A., Jiao, S., Schwartz, G., Abbas, R., Powell, C., Turnbull, K., Vermette, J., Zacharchuk, C., & Badwe, R. (2010). Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer. *J Clin Oncol*, 28(8), 1301-1307. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.8707>

- Cadilha, B. L., Benmebarek, M. R., Dorman, K., Oner, A., Lorenzini, T., Obeck, H., Vanttinen, M., Di Pilato, M., Pruessmann, J. N., Stoiber, S., Huynh, D., Markl, F., Seifert, M., Manske, K., Suarez-Gosalvez, J., Zeng, Y., Lesch, S., Karches, C. H., Heise, C., . . . Kobold, S. (2021). Combined tumor-directed recruitment and protection from immune suppression enable CAR T cell efficacy in solid tumors. *Sci Adv*, 7(24). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abi5781>
- Cai, J., Chen, H., Lu, M., Zhang, Y., Lu, B., You, L., Zhang, T., Dai, M., & Zhao, Y. (2021). Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: Trends, risk factors, screening, and prognosis. *Cancer Lett*, 520, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.06.027>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.03.016>
- Carreón, O. Z., Mendiola, A. V., Steider, B. W., & Cruz, I. S. (2012). El receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y su relación con el cáncer. *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 15(1), 15-25.
- Castelli, M. S., McGonigle, P., & Hornby, P. J. (2019). The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacol Res Perspect*, 7(6), e00535. <https://doi.org/10.1002/prp2.535>
- Chai, Z., Wang, L., Zheng, Y., Liang, N., Wang, X., Zheng, Y., Zhang, Z., Zhao, C., Zhu, T., & Liu, C. (2019). PADI3 plays an antitumor role via the Hsp90/CKS1 pathway in colon cancer. *Cancer Cell Int*, 19, 277. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0999-3>
- Chan, A. (2016). Neratinib in HER-2-positive breast cancer: results to date and clinical usefulness. *Ther Adv Med Oncol*, 8(5), 339-350. <https://doi.org/10.1177/1758834016656494>
- Chang, X., Chai, Z., Zou, J., Wang, H., Wang, Y., Zheng, Y., Wu, H., & Liu, C. (2019). PADI3 induces cell cycle arrest via the Sirt2/AKT/p21 pathway and acts as a tumor suppressor gene in colon cancer. *Cancer Biol Med*, 16(4), 729-742. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0065>
- Chang, X., & Fang, K. (2010). PADI4 and tumourigenesis. *Cancer Cell Int*, 10, 7. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-10-7>
- Chen, D., Ye, Y., Guo, S., & Yao, K. (2021). Progress in the Research and Targeted Therapy of ErbB/HER Receptors in Urothelial Bladder Cancer. *Front Mol Biosci*, 8, 800945. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.800945>
- Chen, X., Zeh, H. J., Kang, R., Kroemer, G., & Tang, D. (2021). Cell death in pancreatic cancer: from pathogenesis to therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 18(11), 804-823. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00486-6>
- Chen, Z., Kankala, R. K., Yang, Z., Li, W., Xie, S., Li, H., Chen, A. Z., & Zou, L. (2022). Antibody-based drug delivery systems for cancer therapy: Mechanisms, challenges, and prospects. *Theranostics*, 12(8), 3719-3746. <https://doi.org/10.7150/thno.72594>
- Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney, D. W., Jr., & Leahy, D. J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *nature*, 421(6924), 756-760. <https://doi.org/10.1038/nature01392>
- Chowdhury, N., & Drake, C. G. (2020). Kidney Cancer: An Overview of Current Therapeutic Approaches. *Urol Clin North Am*, 47(4), 419-431. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2020.07.009>
- Ciardiello, F., Kim, N., McGeady, M. L., Liscia, D. S., Saeki, T., Bianco, C., & Salomon, D. S. (1991). Expression of transforming growth factor alpha (TGF alpha) in breast cancer. *Ann Oncol*, 2(3), 169-182. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.annonc.a057897>
- Cismowski, M. J. (2006). Non-receptor activators of heterotrimeric G-protein signaling (AGS proteins). *Semin Cell Dev Biol*, 17(3), 334-344. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2006.03.003>

- Cleries, R., Ameijide, A., Buxo, M., Vilardell, M., Martinez, J. M., Font, R., Marcos-Gragera, R., Puigdemont, M., Vinas, G., Carulla, M., Espinas, J. A., Galceran, J., Izquierdo, A., & Borrás, J. M. (2022). Ten-Year Probabilities of Death Due to Cancer and Cardiovascular Disease among Breast Cancer Patients Diagnosed in North-Eastern Spain. *Int J Environ Res Public Health*, 20(1). <https://doi.org/10.3390/ijerph20010405>
- Cocco, E., Lopez, S., Santin, A. D., & Scaltriti, M. (2019). Prevalence and role of HER2 mutations in cancer. *Pharmacol Ther*, 199, 188-196. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.03.010>
- Connell, C. M., & Doherty, G. J. (2017). Activating HER2 mutations as emerging targets in multiple solid cancers. *ESMO Open*, 2(5), e000279. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2017-000279>
- Cossu-Rocca, P., Muroli, M. R., Sanges, F., Sotgiu, G., Asunis, A., Tanca, L., Onnis, D., Pira, G., Manca, A., Dore, S., Uras, M. G., Ena, S., & De Miglio, M. R. (2016). EGFR kinase-dependent and kinase-independent roles in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Cancer Res*, 6(1), 71-83. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27073724>
- Cremolini, C., Montagut, C., Ronga, P., Venturini, F., Yamaguchi, K., Stintzing, S., & Sobrero, A. (2022). Rechallenge with anti-EGFR therapy to extend the continuum of care in patients with metastatic colorectal cancer. *Front Oncol*, 12, 946850. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.946850>
- D'Amato, V., Raimondo, L., Formisano, L., Giuliano, M., De Placido, S., Rosa, R., & Bianco, R. (2015). Mechanisms of lapatinib resistance in HER2-driven breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 41(10), 877-883. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.08.001>
- D'Antonio, A., Losito, S., Pignata, S., Grassi, M., Perrone, F., De Luca, A., Tambaro, R., Bianco, C., Gullick, W. J., Johnson, G. R., Iaffaioli, V. R., Salomon, D. S., & Normanno, N. (2002). Transforming growth factor alpha, amphiregulin and cripto-1 are frequently expressed in advanced human ovarian carcinomas. *Int J Oncol*, 21(5), 941-948. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12370739>
- Dagogo-Jack, I., & Shaw, A. T. (2018). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*, 15(2), 81-94. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>
- Dassonville, O., Bozec, A., Fischel, J. L., & Milano, G. (2007). EGFR targeting therapies: monoclonal antibodies versus tyrosine kinase inhibitors: similarities and differences. *Critical reviews in oncology/hematology*, 62(1), 53-61.
- De Laurentiis, M., Cianniello, D., Caputo, R., Stanzione, B., Arpino, G., Cinieri, S., Lorusso, V., & De Placido, S. (2010). Treatment of triple negative breast cancer (TNBC): current options and future perspectives. *Cancer Treat Rev*, 36 Suppl 3, S80-86. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(10\)70025-6](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(10)70025-6)
- de Nonneville, A., Goncalves, A., Mamessier, E., & Bertucci, F. (2022). Sacituzumab govitecan in triple-negative breast cancer. *Ann Transl Med*, 10(11), 647. <https://doi.org/10.21037/atm-22-813>
- Deeks, E. D. (2017). Neratinib: First Global Approval. *Drugs*, 77(15), 1695-1704. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0811-4>
- Derynck, R. (1992). The physiology of transforming growth factor-alpha. *Adv Cancer Res*, 58, 27-52. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60289-4](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60289-4)
- Di Nicolantonio, F., Arena, S., Tabernero, J., Grosso, S., Molinari, F., Macarulla, T., Russo, M., Cancelliere, C., Zecchin, D., Mazzucchelli, L., Sasazuki, T., Shirasawa, S., Geuna, M., Frattini, M., Baselga, J., Gallicchio, M., Biffo, S., & Bardelli, A. (2010). Deregulation of the PI3K and KRAS signaling pathways in human cancer cells determines their response to everolimus. *J Clin Invest*, 120(8), 2858-2866. <https://doi.org/10.1172/JCI37539>
- Diamantis, N., & Banerji, U. (2016). Antibody-drug conjugates--an emerging class of cancer treatment. *Br J Cancer*, 114(4), 362-367. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.435>
- Dordevic, G., Matusan Ilijas, K., Hadzisejdic, I., Maricic, A., Grahovac, B., & Jonjic, N. (2012). EGFR protein overexpression correlates with chromosome 7 polysomy and poor prognostic

- parameters in clear cell renal cell carcinoma. *J Biomed Sci*, 19(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-40>
- Doronina, S. O., Bovee, T. D., Meyer, D. W., Miyamoto, J. B., Anderson, M. E., Morris-Tilden, C. A., & Senter, P. D. (2008). Novel peptide linkers for highly potent antibody-auristatin conjugate. *Bioconjug Chem*, 19(10), 1960-1963. <https://doi.org/10.1021/bc800289a>
- Drago, J. Z., Ferraro, E., Abuhadra, N., & Modi, S. (2022). Beyond HER2: Targeting the ErbB receptor family in breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 109, 102436. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2022.102436>
- Du, X., Yang, B., An, Q., Assaraf, Y. G., Cao, X., & Xia, J. (2021). Acquired resistance to third-generation EGFR-TKIs and emerging next-generation EGFR inhibitors. *Innovation (Camb)*, 2(2), 100103. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100103>
- Eccles, S. A. (2011). The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *Int J Dev Biol*, 55(7-9), 685-696. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113396se>
- Eroles, P., Bosch, A., Perez-Fidalgo, J. A., & Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*, 38(6), 698-707. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>
- Fares, M. Y., Salhab, H. A., Khachfe, H. H., & Khachfe, H. M. (2019). Breast Cancer Epidemiology among Lebanese Women: An 11-Year Analysis. *Medicina (Kaunas)*, 55(8). <https://doi.org/10.3390/medicina55080463>
- Feldinger, K., & Kong, A. (2015). Profile of neratinib and its potential in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 7, 147-162. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S54414>
- Flynn, J. F., Wong, C., & Wu, J. M. (2009). Anti-EGFR Therapy: Mechanism and Advances in Clinical Efficacy in Breast Cancer. *J Oncol*, 2009, 526963. <https://doi.org/10.1155/2009/526963>
- Fujihara, M., Shien, T., Shien, K., Suzawa, K., Takeda, T., Zhu, Y., Mamori, T., Otani, Y., Yoshioka, R., Uno, M., Suzuki, Y., Abe, Y., Hatono, M., Tsukioki, T., Takahashi, Y., Kochi, M., Iwamoto, T., Taira, N., Doihara, H., & Toyooka, S. (2021). YES1 as a Therapeutic Target for HER2-Positive Breast Cancer after Trastuzumab and Trastuzumab-Emtansine (T-DM1) Resistance Development. *Int J Mol Sci*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312809>
- Fuller, S. J., Sivarajah, K., & Sugden, P. H. (2008). ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 44(5), 831-854. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.02.278>
- Funakoshi, Y., Wang, Y., Semba, T., Masuda, H., Hout, D., Ueno, N. T., & Wang, X. (2019). Comparison of molecular profile in triple-negative inflammatory and non-inflammatory breast cancer not of mesenchymal stem-like subtype. *PLoS one*, 14(9), e0222336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222336>
- Galluzzi, L., Vacchelli, E., Fridman, W. H., Galon, J., Sautes-Fridman, C., Tartour, E., Zucman-Rossi, J., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2012). Trial Watch: Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology*, 1(1), 28-37. <https://doi.org/10.4161/onci.1.1.17938>
- Gandullo-Sanchez, 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. <https://doi.org/10.15252/emmm.201911498>
- Garcia-Alonso, S., Ocana, A., & Pandiella, A. (2018). Resistance to Antibody-Drug Conjugates. *Cancer Res*, 78(9), 2159-2165. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3671>
- 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.

- Garmendia, I., Redin, E., Montuenga, L. M., & Calvo, A. (2022). YES1: A Novel Therapeutic Target and Biomarker in Cancer. *Mol Cancer Ther*, 21(9), 1371-1380. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-21-0958>
- Ghandi, M., Huang, F. W., Jané-Valbuena, J., Kryukov, G. V., Lo, C. C., McDonald III, E. R., Barretina, J., Gelfand, E. T., Bielski, C. M., & Li, H. (2019). Next-generation characterization of the cancer cell line encyclopedia. *nature*, 569(7757), 503-508.
- Giaquinto, A. N., Sung, H., Miller, K. D., Kramer, J. L., Newman, L. A., Minihan, A., Jemal, A., & Siegel, R. L. (2022). Breast Cancer Statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*, 72(6), 524-541. <https://doi.org/10.3322/caac.21754>
- Golubovskaya, V. (2022). CAR-T Cells Targeting Immune Checkpoint Pathway Players. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 27(4), 121. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2704121>
- Gomez-Palomo, F., Sanchez Gonzalez, J. V., Bernal Gomez, A., Perez Ardavin, J., & Ruiz Cerda, J. L. (2022). Impact of aging on the incidence and mortality of urological cancers: 20-year projection in Spain. *Actas Urol Esp (Engl Ed)*, 46(5), 268-274. <https://doi.org/10.1016/j.acuroe.2021.10.004>
- Goss, G. D., Vokes, E. E., Gordon, M. S., Gandhi, L., Papadopoulos, K. P., Rasco, D. W., Fischer, J. S., Chu, K. L., Ames, W. W., Mittapalli, R. K., Lee, H. J., Zeng, J., Roberts-Rapp, L. A., Loberg, L. I., Ansell, P. J., Reilly, E. B., Ocampo, C. J., Holen, K. D., & Tolcher, A. W. (2018). Efficacy and safety results of depatuxizumab mafodotin (ABT-414) in patients with advanced solid tumors likely to overexpress epidermal growth factor receptor. *Cancer*, 124(10), 2174-2183. <https://doi.org/10.1002/cncr.31304>
- Grant, T. J., Hua, K., & Singh, A. (2016). Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 144, 241-275. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.09.008>
- Han, L., Wang, Y., Huang, X., Liu, F., Ma, C., Feng, F., Zhang, J., Liu, W., Qu, W., Pang, H., & Xue, J. (2020). Specific-oxygen-supply functionalized core-shell nanoparticles for smart mutual-promotion between photodynamic therapy and gambogic acid-induced chemotherapy. *Biomaterials*, 257, 120228. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120228>
- Hanssens, H., Meeus, F., De Veirman, K., Breckpot, K., & Devoogdt, N. (2022). The antigen-binding moiety in the driver's seat of CARs. *Med Res Rev*, 42(1), 306-342. <https://doi.org/10.1002/med.21818>
- Haque, I., Kawsar, H. I., Motes, H., Sharma, M., Banerjee, S., Banerjee, S. K., Godwin, A. K., & Huang, C. H. (2020). Downregulation of miR-506-3p Facilitates EGFR-TKI Resistance through Induction of Sonic Hedgehog Signaling in Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci*, 21(23). <https://doi.org/10.3390/ijms21239307>
- Hartmann, J. T., Haap, M., Kopp, H. G., & Lipp, H. P. (2009). Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Curr Drug Metab*, 10(5), 470-481. <https://doi.org/10.2174/138920009788897975>
- Hedegger, K., Blutke, A., Hommel, T., Auer, K. E., Nataraj, N. B., Lindzen, M., Yarden, Y., & Dahlhoff, M. (2023). Trapping all ERBB ligands decreases pancreatic lesions in a murine model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Oncol*. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13473>
- Hidalgo, M. (2010). Pancreatic cancer. *N Engl J Med*, 362(17), 1605-1617. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0901557>
- Higgins, M. J., & Baselga, J. (2011). Targeted therapies for breast cancer. *J Clin Invest*, 121(10), 3797-3803. <https://doi.org/10.1172/JCI57152>
- Hilgarth, R. S., & Lanigan, T. M. (2020). Optimization of overlap extension PCR for efficient transgene construction. *MethodsX*, 7, 100759.
- Hingorani, D. V., Allevato, M. M., Camargo, M. F., Lesperance, J., Quraishi, M. A., Aguilera, J., Franiak-Pietryga, I., Scanderbeg, D. J., Wang, Z., Molinolo, A. A., Alvarado, D., Sharabi, A. B., Bui, J. D., Cohen, E. E. W., Adams, S. R., Gutkind, J. S., & Advani, S. J. (2022). Monomethyl auristatin antibody and peptide drug conjugates for trimodal cancer

- chemo-radio-immunotherapy. *Nat Commun*, 13(1), 3869. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31601-z>
- Horibata, S., Rogers, K. E., Sadegh, D., Anguish, L. J., McElwee, J. L., Shah, P., Thompson, P. R., & Coonrod, S. A. (2017). Role of peptidylarginine deiminase 2 (PAD2) in mammary carcinoma cell migration. *BMC Cancer*, 17(1), 378. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3354-x>
- Hu, J. X., Zhao, C. F., Chen, W. B., Liu, Q. C., Li, Q. W., Lin, Y. Y., & Gao, F. (2021). Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World J Gastroenterol*, 27(27), 4298-4321. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i27.4298>
- Huang, J., Leung, D. K., Chan, E. O., Lok, V., Leung, S., Wong, I., Lao, X. Q., Zheng, Z. J., Chiu, P. K., Ng, C. F., Wong, J. H., Volpe, A., Merseburger, A. S., Powles, T., Teoh, J. Y., & Wong, M. C. S. (2022). A Global Trend Analysis of Kidney Cancer Incidence and Mortality and Their Associations with Smoking, Alcohol Consumption, and Metabolic Syndrome. *Eur Urol Focus*, 8(1), 200-209. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2020.12.020>
- Huang, J. J., & Hsieh, J. J. (2020). The Therapeutic Landscape of Renal Cell Carcinoma: From the Dark Age to the Golden Age. *Semin Nephrol*, 40(1), 28-41. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2019.12.004>
- Humphreys, R. C., & Hennighausen, L. (2000). Transforming growth factor alpha and mouse models of human breast cancer. *Oncogene*, 19(8), 1085-1091. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203278>
- Hynes, N. E., & Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 5(5), 341-354. <https://doi.org/10.1038/nrc1609>
- Hynes, N. E., & MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 21(2), 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.12.010>
- Iancu, G., Serban, D., Badiu, C. D., Tanasescu, C., Tudosie, M. S., Tudor, C., Costea, D. O., Zgura, A., Iancu, R., & Vasile, D. (2022). Tyrosine kinase inhibitors in breast cancer (Review). *Exp Ther Med*, 23(2), 114. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.11037>
- Ilic, M., & Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 22(44), 9694-9705. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i44.9694>
- Ilio, K. Y., Sensibar, J. A., & Lee, C. (1995). Effect of TGF-beta 1, TGF-alpha, and EGF on cell proliferation and cell death in rat ventral prostatic epithelial cells in culture. *J Androl*, 16(6), 482-490. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8867596>
- Inamura, K. (2017). Renal Cell Tumors: Understanding Their Molecular Pathological Epidemiology and the 2016 WHO Classification. *Int J Mol Sci*, 18(10). <https://doi.org/10.3390/ijms18102195>
- Jamali, H., Khan, H. A., Tjin, C. C., & Ellman, J. A. (2016). Cellular Activity of New Small Molecule Protein Arginine Deiminase 3 (PAD3) Inhibitors. *ACS Med Chem Lett*, 7(9), 847-851. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00215>
- Janku, F. (2014). Tumor heterogeneity in the clinic: is it a real problem? *Ther Adv Med Oncol*, 6(2), 43-51. <https://doi.org/10.1177/1758834013517414>
- Jayaraman, J., Mellody, M. P., Hou, A. J., Desai, R. P., Fung, A. W., Pham, A. H. T., Chen, Y. Y., & Zhao, W. (2020). CAR-T design: Elements and their synergistic function. *EBioMedicine*, 58, 102931. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102931>
- Jhappan, C., Stahle, C., Harkins, R. N., Fausto, N., Smith, G. H., & Merlino, G. T. (1990). TGF alpha overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell*, 61(6), 1137-1146. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90076-q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90076-q)
- Johnson, K., Zackrisson, S., Rosso, A., Sartor, H., Saal, L. H., Andersson, I., & Lang, K. (2019). Tumor Characteristics and Molecular Subtypes in Breast Cancer Screening with Digital Breast Tomosynthesis: The Malmo Breast Tomosynthesis Screening Trial. *Radiology*, 293(2), 273-281. <https://doi.org/10.1148/radiol.2019190132>

- Jonasch, E., Walker, C. L., & Rathmell, W. K. (2021). Clear cell renal cell carcinoma ontogeny and mechanisms of lethality. *Nat Rev Nephrol*, 17(4), 245-261. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-00359-2>
- Junier, M. P., Couplier, M., Le Forestier, N., Cadusseau, J., Suzuki, F., Peschanski, M., & Dreyfus, P. A. (1994). Transforming growth factor alpha (TGF alpha) expression in degenerating motoneurons of the murine mutant wobbler: a neuronal signal for astrogliosis? *J Neurosci*, 14(7), 4206-4216. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-07-04206.1994>
- Kafatos, G., Dube, S., Burdon, P., Demonty, G., Flinois, A., Leclerc, M., Lowe, K., Feudjo-Tepie, M., & Segart, S. (2020). Management of EGFR Inhibitor-induced Skin Toxicity and Factors Impacting Patients' Adherence to Skin Toxicity Treatment: Health Care Provider and Patient Surveys in European Oncology Centers. *Clin Colorectal Cancer*, 19(2), 100-108 e109. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2020.01.001>
- Kataoka, H. (2009). EGFR ligands and their signaling scissors, ADAMs, as new molecular targets for anticancer treatments. *J Dermatol Sci*, 56(3), 148-153. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.10.002>
- Khalaf, N., El-Serag, H. B., Abrams, H. R., & Thrift, A. P. (2021). Burden of Pancreatic Cancer: From Epidemiology to Practice. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 19(5), 876-884. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.02.054>
- Khongorzul, P., Ling, C. J., Khan, F. U., Ihsan, A. U., & Zhang, J. (2020). Antibody-Drug Conjugates: A Comprehensive Review. *Mol Cancer Res*, 18(1), 3-19. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0582>
- Kohler, M., Bauknecht, T., Grimm, M., Birmelin, G., Kommoss, F., & Wagner, E. (1992). Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in human ovarian carcinomas. *Eur J Cancer*, 28A(8-9), 1432-1437. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(92\)90538-d](https://doi.org/10.1016/0959-8049(92)90538-d)
- Korc, M., Chandrasekar, B., Yamanaka, Y., Friess, H., Buchler, M., & Beger, H. G. (1992). Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Clin Invest*, 90(4), 1352-1360. <https://doi.org/10.1172/JCI116001>
- Kostova, V., Desos, P., Starck, J. B., & Kotschy, A. (2021). The Chemistry Behind ADCs. *Pharmaceuticals (Basel)*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/ph14050442>
- Kozuki, T. (2016). Skin problems and EGFR-tyrosine kinase inhibitor. *Jpn J Clin Oncol*, 46(4), 291-298. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyv207>
- Krop, I., & Winer, E. P. (2014). Trastuzumab emtansine: a novel antibody-drug conjugate for HER2-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*, 20(1), 15-20. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0541>
- Kumar, V., Bustin, S. A., & McKay, I. A. (1995). Transforming growth factor alpha. *Cell Biol Int*, 19(5), 373-388. <https://doi.org/10.1006/cbir.1995.1083>
- Kumari, S., Advani, D., Sharma, S., Ambasta, R. K., & Kumar, P. (2021). Combinatorial therapy in tumor microenvironment: Where do we stand? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1876(2), 188585. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188585>
- Labanieh, L., Majzner, R. G., Klysz, D., Sotillo, E., Fisher, C. J., Vilches-Moure, J. G., Pacheco, K. Z. B., Malipatlolla, M., Xu, P., Hui, J. H., Murty, T., Theruvath, J., Mehta, N., Yamada-Hunter, S. A., Weber, E. W., Heitzeneder, S., Parker, K. R., Satpathy, A. T., Chang, H. Y., . . . Mackall, C. L. (2022). Enhanced safety and efficacy of protease-regulated CAR-T cell receptors. *Cell*, 185(10), 1745-1763 e1722. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.03.041>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
- Lai, E., Puzzone, M., Ziranu, P., Pretta, A., Impera, V., Mariani, S., Liscia, N., Soro, P., Musio, F., Persano, M., Donisi, C., Tolu, S., Balconi, F., Pireddu, A., Demurtas, L., Pusceddu, V.,

- Camera, S., Sclafani, F., & Scartozzi, M. (2019). New therapeutic targets in pancreatic cancer. *Cancer Treat Rev*, 81, 101926. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101926>
- Laird, A. D., Brown, P. I., & Fausto, N. (1994). Inhibition of tumor growth in liver epithelial cells transfected with a transforming growth factor alpha antisense gene. *Cancer Res*, 54(15), 4224-4232. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8033155>
- Larson, R. C., & Maus, M. V. (2021). Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells. *Nat Rev Cancer*, 21(3), 145-161. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00323-z>
- Leahy, D. J. (2004). Structure and function of the epidermal growth factor (EGF/ErbB) family of receptors. *Adv Protein Chem*, 68, 1-27. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(04\)68001-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(04)68001-6)
- Ledet, M. M., Anderson, R., Harman, R., Muth, A., Thompson, P. R., Coonrod, S. A., & Van de Walle, G. R. (2018). BB-Cl-Amidine as a novel therapeutic for canine and feline mammary cancer via activation of the endoplasmic reticulum stress pathway. *BMC Cancer*, 18(1), 412. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4323-8>
- Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Jabado-Michaloud, J., Folch, G., Bellahcene, F., Wu, Y., Gemrot, E., Brochet, X., & Lane, J. m. (2009). IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®. *Nucleic acids research*, 37(suppl_1), D1006-D1012.
- Lei, F., Xi, X., Batra, S. K., & Bronich, T. K. (2019). Combination Therapies and Drug Delivery Platforms in Combating Pancreatic Cancer. *J Pharmacol Exp Ther*, 370(3), 682-694. <https://doi.org/10.1124/jpet.118.255786>
- Lemmon, M. A. (2009). Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp Cell Res*, 315(4), 638-648. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.10.024>
- Li, G., Hayward, I. N., Jenkins, B. R., Rothfuss, H. M., Young, C. H., Nevalainen, M. T., Muth, A., Thompson, P. R., Navratil, A. M., & Cherrington, B. D. (2016). Peptidylarginine Deiminase 3 (PAD3) Is Upregulated by Prolactin Stimulation of CID-9 Cells and Expressed in the Lactating Mouse Mammary Gland. *PloS one*, 11(1), e0147503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147503>
- Li, H., Muhetaer, G., Xie, Y., Yao, K., Ma, Q., Guan, H., Xing, S., Huang, X., & Zhou, J. (2022). Identification of super-enhancer-driven peptidyl arginine deiminases as potential biomarkers and therapeutic targets for osimertinib-resistant non-small cell lung cancer. *Front Pharmacol*, 13, 1071365. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1071365>
- Li, L., Wang, L., Liu, Q., Wu, Z., Zhang, Y., & Xia, R. (2022). Efficacy and safety of CD22-specific and CD19/CD22-bispecific CAR-T cell therapy in patients with hematologic malignancies: A systematic review and meta-analysis. *Front Oncol*, 12, 954345. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.954345>
- Li, S. G., & Li, L. (2013). Targeted therapy in HER2-positive breast cancer. *Biomed Rep*, 1(4), 499-505. <https://doi.org/10.3892/br.2013.95>
- Li, Y., Si, R., Wang, J., Hai, P., Zheng, Y., Zhang, Q., Pan, X., & Zhang, J. (2023). Discovery of novel antibody-drug conjugates bearing tissue protease specific linker with both anti-angiogenic and strong cytotoxic effects. *Bioorg Chem*, 137, 106575. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106575>
- Lindauer, M., & Hochhaus, A. (2014). Dasatinib. *Recent Results Cancer Res*, 201, 27-65. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54490-3_2
- Linehan, W. M., Schmidt, L. S., Crooks, D. R., Wei, D., Srinivasan, R., Lang, M., & Ricketts, C. J. (2019). The Metabolic Basis of Kidney Cancer. *Cancer Discov*, 9(8), 1006-1021. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1354>
- Linggi, B., & Carpenter, G. (2006). ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol*, 16(12), 649-656. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.10.008>

- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J*, 46(3), 258-268. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>
- Lisle, J. E., Mertens-Walker, I., Rutkowski, R., Herington, A. C., & Stephenson, S. A. (2013). Eph receptors and their ligands: promising molecular biomarkers and therapeutic targets in prostate cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1835(2), 243-257. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.01.003>
- Liu, D., Zhou, G., & Xu, M. (2023). Preclinical Evidence that Arctigenin Effectively and Selectively Targets Clear Cell Renal Cell Carcinoma Via Suppressing EGFR and RhoA. *Nutr Cancer*, 75(5), 1373-1381. <https://doi.org/10.1080/01635581.2023.2178920>
- Liu, Q., Yu, S., Zhao, W., Qin, S., Chu, Q., & Wu, K. (2018). EGFR-TKIs resistance via EGFR-independent signaling pathways. *Mol Cancer*, 17(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0793-1>
- Lovqvist, A., Lindstrom, A., & Carlsson, J. (1993). Binding, internalization and excretion of TGF alpha-dextran associated radioactivity in cultured human glioma cells. *Cancer Biother*, 8(4), 345-356. <https://doi.org/10.1089/cbr.1993.8.345>
- Lu, J., & Jiang, G. (2022). The journey of CAR-T therapy in hematological malignancies. *Mol Cancer*, 21(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01663-0>
- Lukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanislawek, A. (2021). Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers (Basel)*, 13(17). <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>
- Ma, S., Li, X., Wang, X., Cheng, L., Li, Z., Zhang, C., Ye, Z., & Qian, Q. (2019). Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors. *Int J Biol Sci*, 15(12), 2548-2560. <https://doi.org/10.7150/ijbs.34213>
- Ma, Y., Qi, Y., Wang, L., Zheng, Z., Zhang, Y., & Zheng, J. (2019). SIRT5-mediated SDHA desuccinylation promotes clear cell renal cell carcinoma tumorigenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 134, 458-467.
- Mahalingaiah, P. K., Ciurlionis, R., Durbin, K. R., Yeager, R. L., Philip, B. K., Bawa, B., Mantena, S. R., Enright, B. P., Liguori, M. J., & Van Vleet, T. R. (2019). Potential mechanisms of target-independent uptake and toxicity of antibody-drug conjugates. *Pharmacol Ther*, 200, 110-125. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.04.008>
- Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., & Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*, 10(10), 955-960. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.10.13879>
- Malki, L., Sarig, O., Romano, M. T., Mechin, M. C., Peled, A., Pavlovsky, M., Warshauer, E., Samuelov, L., Uwakwe, L., Briskin, V., Mohamad, J., Gat, A., Isakov, O., Rabinowitz, T., Shomron, N., Adir, N., Simon, M., McMichael, A., Dlova, N. C., . . . Sprecher, E. (2019). Variant PADI3 in Central Centrifugal Cicatricial Alopecia. *N Engl J Med*, 380(9), 833-841. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1816614>
- Mandapati, A., & Lukong, K. E. (2023). Triple negative breast cancer: approved treatment options and their mechanisms of action. *J Cancer Res Clin Oncol*, 149(7), 3701-3719. <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04189-6>
- Marei, H. E., Cenciarelli, C., & Hasan, A. (2022). Potential of antibody-drug conjugates (ADCs) for cancer therapy. *Cancer Cell Int*, 22(1), 255. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02679-8>
- Marmor, M. D., Skaria, K. B., & Yarden, Y. (2004). Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 58(3), 903-913. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.06.002>
- Marofi, F., Motavalli, R., Safonov, V. A., Thangavelu, L., Yumashev, A. V., Alexander, M., Shomali, N., Chartrand, M. S., Pathak, Y., Jarahian, M., Izadi, S., Hassanzadeh, A., Shirafkan, N., Tahmasebi, S., & Khiavi, F. M. (2021). CAR T cells in solid tumors: challenges and

- opportunities. *Stem Cell Res Ther*, 12(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02128-1>
- Marra-Lopez Valenciano, C. (2022). Factors associated with pancreatic cancer in Spain. What can we learn from epidemiological studies? *Rev Esp Enferm Dig*, 114(8), 445-447. <https://doi.org/10.17235/reed.2022.8927/2022>
- Martin, J., Zacholski, E., O'Cearbhaill, R., Matulonis, U., & Chen, L. (2023). Society of Gynecologic Oncology Journal Club: Controversial conversations in Gynecologic cancer - The ABCs of ADCs (Antibody drug Conjugates). *Gynecol Oncol Rep*, 45, 101141. <https://doi.org/10.1016/j.gore.2023.101141>
- Martin Monreal, M. T., Rebak, A. S., Massarenti, L., Mondal, S., Senolt, L., Odum, N., Nielsen, M. L., Thompson, P. R., Nielsen, C. H., & Damgaard, D. (2021). Applicability of Small-Molecule Inhibitors in the Study of Peptidyl Arginine Deiminase 2 (PAD2) and PAD4. *Front Immunol*, 12, 716250. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.716250>
- Massague, J., & Pandiella, A. (1993). Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem*, 62, 515-541. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.62.070193.002503>
- Mathur, R., & Weiner, G. J. (2013). Picking the optimal target for antibody-drug conjugates. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. https://doi.org/10.1200/EdBook_AM.2013.33.e103
- McElwee, J. L., Mohanan, S., Griffith, O. L., Breuer, H. C., Anguish, L. J., Cherrington, B. D., Palmer, A. M., Howe, L. R., Subramanian, V., Causey, C. P., Thompson, P. R., Gray, J. W., & Coonrod, S. A. (2012). Identification of PADI2 as a potential breast cancer biomarker and therapeutic target. *BMC Cancer*, 12, 500. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-500>
- McKertish, C. M., & Kayser, V. (2021). Advances and Limitations of Antibody Drug Conjugates for Cancer. *Biomedicines*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080872>
- Mehrabadi, A. Z., Ranjbar, R., Farzanehpour, M., Shahriary, A., Dorostkar, R., Hamidinejad, M. A., & Ghaleh, H. E. G. (2022). Therapeutic potential of CAR T cell in malignancies: A scoping review. *Biomed Pharmacother*, 146, 112512. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112512>
- Meyer, L., López, T., Espinosa, R., Arias, C. F., Vollmers, C., & DuBois, R. M. (2019). A simplified workflow for monoclonal antibody sequencing. *PloS one*, 14(6), e0218717.
- Moch, H. (2013). An overview of renal cell cancer: pathology and genetics. *Semin Cancer Biol*, 23(1), 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.06.006>
- Mohanan, S., Cherrington, B. D., Horibata, S., McElwee, J. L., Thompson, P. R., & Coonrod, S. A. (2012). Potential role of peptidylarginine deiminase enzymes and protein citrullination in cancer pathogenesis. *Biochem Res Int*, 2012, 895343. <https://doi.org/10.1155/2012/895343>
- Mohanty, R., Chowdhury, C. R., Arega, S., Sen, P., Ganguly, P., & Ganguly, N. (2019). CAR T cell therapy: A new era for cancer treatment (Review). *Oncol Rep*, 42(6), 2183-2195. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7335>
- Montero, J. C., Seoane, S., Ocana, A., & Pandiella, A. (2011). Inhibition of SRC family kinases and receptor tyrosine kinases by dasatinib: possible combinations in solid tumors. *Clin Cancer Res*, 17(17), 5546-5552. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2616>
- Moody, S. E., Schinzel, A. C., Singh, S., Izzo, F., Strickland, M. R., Luo, L., Thomas, S. R., Boehm, J. S., Kim, S. Y., & Wang, Z. C. (2015). PRKACA mediates resistance to HER2-targeted therapy in breast cancer cells and restores anti-apoptotic signaling. *Oncogene*, 34(16), 2061-2071.
- Moquist, P. N., Bovee, T. D., Waight, A. B., Mitchell, J. A., Miyamoto, J. B., Mason, M. L., Emmerton, K. K., Stevens, N., Balasubramanian, C., Simmons, J. K., Lyon, R. P., Senter, P. D., & Doronina, S. O. (2021). Novel Auristatins with High Bystander and Cytotoxic Activities in Drug Efflux-positive Tumor Models. *Mol Cancer Ther*, 20(2), 320-328. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0618>
- Moretto, R., Morano, F., Ongaro, E., Rossini, D., Pietrantonio, F., Casagrande, M., Antoniotti, C., Corallo, S., Marmorino, F., Cortiula, F., Nichetti, F., Borelli, B., Zucchelli, G., Boccaccino,

- A., Masi, G., de Braud, F., Falcone, A., & Cremolini, C. (2019). Lack of Benefit From Anti-EGFR Treatment in RAS and BRAF Wild-type Metastatic Colorectal Cancer With Mucinous Histology or Mucinous Component. *Clin Colorectal Cancer*, 18(2), 116-124. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2019.02.007>
- Morishige, K., Kurachi, H., Amemiya, K., Fujita, Y., Yamamoto, T., Miyake, A., & Tanizawa, O. (1991). Evidence for the involvement of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor autocrine growth mechanism in primary human ovarian cancers in vitro. *Cancer Res*, 51(19), 5322-5328. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1717146>
- Mosesson, Y., & Yarden, Y. (2004). Oncogenic growth factor receptors: implications for signal transduction therapy. *Semin Cancer Biol*, 14(4), 262-270. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2004.04.005>
- Motzer, R. J., Amato, R., Todd, M., Hwu, W. J., Cohen, R., Baselga, J., Muss, H., Cooper, M., Yu, R., Ginsberg, M. S., & Needle, M. (2003). Phase II trial of anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 in patients with advanced renal cell carcinoma. *Invest New Drugs*, 21(1), 99-101. <https://doi.org/10.1023/a:1022928612511>
- Moulder, S., & Hortobagyi, G. N. (2008). Advances in the treatment of breast cancer. *Clin Pharmacol Ther*, 83(1), 26-36. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100449>
- Murad, J. M., Graber, D. J., & Sentman, C. L. (2018). Advances in the use of natural receptor- or ligand-based chimeric antigen receptors (CARs) in haematologic malignancies. *Best Pract Res Clin Haematol*, 31(2), 176-183. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2018.03.003>
- Muth, A., Subramanian, V., Beaumont, E., Nagar, M., Kerry, P., McEwan, P., Srinath, H., Clancy, K., Parelkar, S., & Thompson, P. R. (2017). Development of a Selective Inhibitor of Protein Arginine Deiminase 2. *J Med Chem*, 60(7), 3198-3211. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00274>
- Nabi, S., Kessler, E. R., Bernard, B., Flaig, T. W., & Lam, E. T. (2018). Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology. *F1000Res*, 7, 307. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13179.1>
- Nader-Marta, G., Molinelli, C., Debieu, V., Martins-Branco, D., Aftimos, P., de Azambuja, E., & Awada, A. (2023). Antibody-drug conjugates: the evolving field of targeted chemotherapy for breast cancer treatment. *Ther Adv Med Oncol*, 15, 17588359231183679. <https://doi.org/10.1177/17588359231183679>
- Nicholson, R. I., Gee, J. M., & Harper, M. E. (2001). EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*, 37 Suppl 4, S9-15. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(01\)00231-3](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(01)00231-3)
- Normanno, N., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., De Luca, A., Caponigro, F., & Salomon, D. S. (2005). The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Curr Drug Targets*, 6(3), 243-257. <https://doi.org/10.2174/1389450053765879>
- Obidiro, O., Battogtokh, G., & Akala, E. O. (2023). Triple Negative Breast Cancer Treatment Options and Limitations: Future Outlook. *Pharmaceutics*, 15(7). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071796>
- Ocana, A., Gil-Martin, M., Antolin, S., Atienza, M., Montano, A., Ribelles, N., Urruticoechea, A., Falcon, A., Pernas, S., Orlando, J., Montero, J. C., Escudero, M. J., Benito, S., Caballero, R., Carrasco, E., Rojo, F., Pandiella, A., & Ruiz-Borrego, M. (2019). Efficacy and safety of dasatinib with trastuzumab and paclitaxel in first line HER2-positive metastatic breast cancer: results from the phase II GEICAM/2010-04 study. *Breast Cancer Res Treat*, 174(3), 693-701. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-05100-z>
- Ocaña, A., & Pandiella, A. (2013). Targeting HER receptors in cancer. *Current pharmaceutical design*, 19(5), 808-817.
- 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. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3159>

- Ortiz, M. A., Mikhailova, T., Li, X., Porter, B. A., Bah, A., & Kotula, L. (2021). Src family kinases, adaptor proteins and the actin cytoskeleton in epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Commun Signal*, 19(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00750-x>
- Padma, V. V. (2015). An overview of targeted cancer therapy. *Biomedicine (Taipei)*, 5(4), 19. <https://doi.org/10.7603/s40681-015-0019-4>
- Pandiella, A., & Massague, J. (1991). Cleavage of the membrane precursor for transforming growth factor alpha is a regulated process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(5), 1726-1730.
- Pandiella, A., & Massague, J. (1991). Multiple signals activate cleavage of the membrane transforming growth factor-alpha precursor. *J Biol Chem*, 266(9), 5769-5773. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2005114>
- Parker, J. S., Mullins, M., Cheang, M. C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., Quackenbush, J. F., Stijleman, I. J., Palazzo, J., Marron, J. S., Nobel, A. B., Mardis, E., Nielsen, T. O., Ellis, M. J., Perou, C. M., & Bernard, P. S. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*, 27(8), 1160-1167. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.1370>
- Peiro, G., Ortiz-Martinez, F., Gallardo, A., Perez-Balaguer, A., Sanchez-Paya, J., Ponce, J. J., Tibau, A., Lopez-Vilaro, L., Escuin, D., Adrover, E., Barnadas, A., & Lerma, E. (2014). Src, a potential target for overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast carcinoma. *Br J Cancer*, 111(4), 689-695. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.327>
- Pelletier, S., Tanguay, S., Lee, S., Gunaratnam, L., Arbour, N., & Lapointe, R. (2009). TGF-alpha as a candidate tumor antigen for renal cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother*, 58(8), 1207-1218. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0630-2>
- Perou, C. M., Sorlie, 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., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *nature*, 406(6797), 747-752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Phillips, A. C., Boghaert, E. R., Vaidya, K. S., Mitten, M. J., Norvell, S., Falls, H. D., DeVries, P. J., Cheng, D., Meulbroek, J. A., Buchanan, F. G., McKay, L. M., Goodwin, N. C., & Reilly, E. B. (2016). ABT-414, an Antibody-Drug Conjugate Targeting a Tumor-Selective EGFR Epitope. *Mol Cancer Ther*, 15(4), 661-669. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0901>
- Pokrzywa, C. J., Abbott, D. E., Matkowskyj, K. A., Ronnekleiv-Kelly, S. M., Winslow, E. R., Weber, S. M., & Fisher, A. V. (2019). Natural History and Treatment Trends in Pancreatic Cancer Subtypes. *J Gastrointest Surg*, 23(4), 768-778. <https://doi.org/10.1007/s11605-019-04113-3>
- Poteet, E., Liu, D., Liang, Z., Van Buren, G., Chen, C., & Yao, Q. (2019). Mesothelin and TGF- α predict pancreatic cancer cell sensitivity to EGFR inhibitors and effective combination treatment with trametinib. *PLoS one*, 14(3), e0213294.
- Prat, A., & Perou, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*, 5(1), 5-23. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.11.003>
- Qiu, M. Z., Zhang, Y., Guo, Y., Guo, W., Nian, W., Liao, W., Xu, Z., Zhang, W., Zhao, H. Y., Wei, X., Xue, L., Tang, W., Wu, Y., Ren, G., Wang, L., Xi, J., Jin, Y., Li, H., Hu, C., & Xu, R. H. (2022). Evaluation of Safety of Treatment With Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibody Drug Conjugate MRG003 in Patients With Advanced Solid Tumors: A Phase 1 Nonrandomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 8(7), 1042-1046. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2022.0503>
- Ramirez-Chacon, A., Betriu-Mendez, S., Bartolo-Ibars, A., Gonzalez, A., Marti, M., & Juan, M. (2022). Ligand-based CAR-T cell: Different strategies to drive T cells in future new treatments. *Front Immunol*, 13, 932559. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.932559>

- Reardon, D. A., Wen, P. Y., & Mellinghoff, I. K. (2014). Targeted molecular therapies against epidermal growth factor receptor: past experiences and challenges. *Neuro Oncol*, *16 Suppl 8*(Suppl 8), viii7-13. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou232>
- Reddy, K. B. (2011). Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options. *Curr Oncol*, *18*(4), e173-179. <https://doi.org/10.3747/co.v18i4.738>
- Rexer, B. N., Ham, A. J., Rinehart, C., Hill, S., Granja-Ingram Nde, M., Gonzalez-Angulo, A. M., Mills, G. B., Dave, B., Chang, J. C., Liebler, D. C., & Arteaga, C. L. (2011). Phosphoproteomic mass spectrometry profiling links Src family kinases to escape from HER2 tyrosine kinase inhibition. *Oncogene*, *30*(40), 4163-4174. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.130>
- Robert, J. (2011). [Tyrosine kinase inhibitors]. *Bull Cancer*, *98*(11), 1321-1334. <https://doi.org/10.1684/bdc.2011.1472> (Les inhibiteurs de tyrosine kinase.)
- Roelants, C., Pillet, C., Franquet, Q., Sarrazin, C., Peilleron, N., Giacosa, S., Guyon, L., Fontanell, A., Fiard, G., Long, J. A., Descotes, J. L., Cochet, C., & Filhol, O. (2020). Ex-Vivo Treatment of Tumor Tissue Slices as a Predictive Preclinical Method to Evaluate Targeted Therapies for Patients with Renal Carcinoma. *Cancers (Basel)*, *12*(1). <https://doi.org/10.3390/cancers12010232>
- Roodman, G. D., & Dougall, W. C. (2008). RANK ligand as a therapeutic target for bone metastases and multiple myeloma. *Cancer Treat Rev*, *34*(1), 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2007.09.002>
- Rosell, R., Karachaliou, N., Morales-Espinosa, D., Costa, C., Molina, M. A., Sansano, I., Gasco, A., Viteri, S., Massuti, B., Wei, J., Gonzalez Cao, M., & Martinez Bueno, A. (2013). Adaptive resistance to targeted therapies in cancer. *Transl Lung Cancer Res*, *2*(3), 152-159. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2012.12.08>
- Roskoski, R., Jr. (2004). The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, *319*(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.150>
- Roskoski, R., Jr. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res*, *79*, 34-74. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.002>
- Samantasinghar, A., Sunildutt, N. P., Ahmed, F., Soomro, A. M., Salih, A. R. C., Parihar, P., Memon, F. H., Kim, K. H., Kang, I. S., & Choi, K. H. (2023). A comprehensive review of key factors affecting the efficacy of antibody drug conjugate. *Biomed Pharmacother*, *161*, 114408. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114408>
- Sanchez-Martin, M., & Pandiella, A. (2012). Differential action of small molecule HER kinase inhibitors on receptor heterodimerization: therapeutic implications. *International journal of cancer*, *131*(1), 244-252.
- Sanchez, C., Dominguez, F., Galindo, H., Camus, M., Oddo, D., Villarroel, A., Razmilic, D., Navarro, M. E., Perez-Sepulveda, A., Medina, L., Lopez, V., & Acevedo, F. (2018). [Survival of patients with advanced HER2+ breast cancer. Analysis of a cancer center database]. *Rev Med Chil*, *146*(10), 1095-1101. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872018001001095> (Características clínicas y pronóstico de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo avanzado, en la era antes y después de terapias anti-HER2.)
- Sandgren, E. P., Luetkeke, N. C., Palmiter, R. D., Brinster, R. L., & Lee, D. C. (1990). Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell*, *61*(6), 1121-1135. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90075-p](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90075-p)
- Sato, J. D., Kawamoto, T., Le, A. D., Mendelsohn, J., Polikoff, J., & Sato, G. H. (1983). Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Med*, *1*(5), 511-529. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6094961>
- Scarfo, I., & Maus, M. V. (2017). Current approaches to increase CAR T cell potency in solid tumors: targeting the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer*, *5*, 28. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0230-9>

- Schirripa, M., & Lenz, H. J. (2016). Colorectal cancer: Overcoming resistance to anti-EGFR therapy - where do we stand? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 13(5), 258-259. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.52>
- Schlam, I., Tarantino, P., & Tolaney, S. M. (2022). Overcoming Resistance to HER2-Directed Therapies in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*, 14(16). <https://doi.org/10.3390/cancers14163996>
- Schreiber, A. R., Andress, M., & Diamond, J. R. (2021). Tackling metastatic triple-negative breast cancer with sacituzumab govitecan. *Expert Rev Anticancer Ther*, 21(12), 1303-1311. <https://doi.org/10.1080/14737140.2021.1993065>
- Scott, A. M., Allison, J. P., & Wolchok, J. D. (2012). Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immun*, 12, 14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22896759>
- Sesumi, Y., Suda, K., Mizuuchi, H., Kobayashi, Y., Sato, K., Chiba, M., Shimoji, M., Tomizawa, K., Takemoto, T., & Mitsudomi, T. (2017). Effect of dasatinib on EMT-mediated-mechanism of resistance against EGFR inhibitors in lung cancer cells. *Lung Cancer*, 104, 85-90. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.12.012>
- Shah, A., Rauth, S., Aithal, A., Kaur, S., Ganguly, K., Orzechowski, C., Varshney, G. C., Jain, M., & Batra, S. K. (2021). The Current Landscape of Antibody-based Therapies in Solid Malignancies. *Theranostics*, 11(3), 1493-1512. <https://doi.org/10.7150/thno.52614>
- Shah, N. N., & Fry, T. J. (2019). Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 16(6), 372-385. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0184-6>
- Shien, T., & Iwata, H. (2020). Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 50(3), 225-229. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyz213>
- Shuptrine, C. W., Surana, R., & Weiner, L. M. (2012). Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Semin Cancer Biol*, 22(1), 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.12.009>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*, 73(1), 17-48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Multiple sequence alignment methods*, 105-116.
- Sigismund, S., Avanzato, D., & Lanzetti, L. (2018). Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol*, 12(1), 3-20. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12155>
- Silvestris, N., Gnoni, A., Brunetti, A. E., Vincenti, L., Santini, D., Tonini, G., Merchionne, F., Maiello, E., Lorusso, V., Nardulli, P., Azzariti, A., & Reni, M. (2014). Target therapies in pancreatic carcinoma. *Curr Med Chem*, 21(8), 948-965. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990238>
- Singh, A. B., & Harris, R. C. (2005). Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal*, 17(10), 1183-1193. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.03.026>
- Singh, B., & Coffey, R. J. (2014). From wavy hair to naked proteins: the role of transforming growth factor alpha in health and disease. *Semin Cell Dev Biol*, 28, 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.003>
- Siveke, J. T., Einwachter, H., Sipos, B., Lubeseder-Martellato, C., Kloppel, G., & Schmid, R. M. (2007). Concomitant pancreatic activation of Kras(G12D) and Tgfa results in cystic papillary neoplasms reminiscent of human IPMN. *Cancer Cell*, 12(3), 266-279. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.08.002>
- Smolarz, B., Nowak, A. Z., & Romanowicz, H. (2022). Breast Cancer-Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers (Basel)*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/cancers14102569>
- Spear, P., Wu, M. R., Sentman, M. L., & Sentman, C. L. (2013). NKG2D ligands as therapeutic targets. *Cancer Immun*, 13, 8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23833565>
- Stoll, S. W., Johnson, J. L., Bhasin, A., Johnston, A., Gudjonsson, J. E., Rittie, L., & Elder, J. T. (2010). Metalloproteinase-mediated, context-dependent function of amphiregulin and HB-EGF

- in human keratinocytes and skin. *J Invest Dermatol*, 130(1), 295-304. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.211>
- Su, Y., Zhang, T., Lu, J., Qian, L., Fei, Y., Zhang, L., Fan, S., Zhou, J., Tang, J., Chen, H., & Liang, C. (2023). Identification and Validation of the Prognostic Panel in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Based on Resting Mast Cells for Prediction of Distant Metastasis and Immunotherapy Response. *Cells*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/cells12010180>
- Sun, Z., Shi, Y., Shen, Y., Cao, L., Zhang, W., & Guan, X. (2015). Analysis of different HER-2 mutations in breast cancer progression and drug resistance. *J Cell Mol Med*, 19(12), 2691-2701. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12662>
- Takeda, T., Yamamoto, H., Suzawa, K., Tomida, S., Miyauchi, S., Araki, K., Nakata, K., Miura, A., Namba, K., Shien, K., Soh, J., Shien, T., Kitamura, Y., Sendo, T., & Toyooka, S. (2020). YES1 activation induces acquired resistance to neratinib in HER2-amplified breast and lung cancers. *Cancer Sci*, 111(3), 849-856. <https://doi.org/10.1111/cas.14289>
- Tan, J., & Yu, Q. (2013). Molecular mechanisms of tumor resistance to PI3K-mTOR-targeted therapy. *Chin J Cancer*, 32(7), 376-379. <https://doi.org/10.5732/cjc.012.10287>
- Tang, H., Liu, Y., Yu, Z., Sun, M., Lin, L., Liu, W., Han, Q., Wei, M., & Jin, Y. (2019). The Analysis of Key Factors Related to ADCs Structural Design. *Front Pharmacol*, 10, 373. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00373>
- Tang, P., Steck, P. A., & Yung, W. K. (1997). The autocrine loop of TGF-alpha/EGFR and brain tumors. *J Neurooncol*, 35(3), 303-314. <https://doi.org/10.1023/a:1005824802617>
- Tang, Y., Tang, F., Yang, Y., Zhao, L., Zhou, H., Dong, J., & Huang, W. (2017). Real-Time Analysis on Drug-Antibody Ratio of Antibody-Drug Conjugates for Synthesis, Process Optimization, and Quality Control. *Sci Rep*, 7(1), 7763. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08151-2>
- Tao, J., Sun, D., & Hou, H. (2020). Role of YES1 amplification in EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer: Primary resistance to afatinib in a patient. *Thorac Cancer*, 11(9), 2736-2739. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13583>
- Tebbutt, N., Pedersen, M. W., & Johns, T. G. (2013). Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy. *Nature Reviews Cancer*, 13(9), 663-673.
- Tiwari, S. R., Mishra, P., & Abraham, J. (2016). Neratinib, A Novel HER2-Targeted Tyrosine Kinase Inhibitor. *Clin Breast Cancer*, 16(5), 344-348. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2016.05.016>
- Tong, C. W. S., Wu, M., Cho, W. C. S., & To, K. K. W. (2018). Recent Advances in the Treatment of Breast Cancer. *Front Oncol*, 8, 227. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00227>
- Torres, C., & Grippo, P. J. (2018). Pancreatic cancer subtypes: a roadmap for precision medicine. *Ann Med*, 50(4), 277-287. <https://doi.org/10.1080/07853890.2018.1453168>
- Tortora, G. (2011). Mechanisms of resistance to HER2 target therapy. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2011(43), 95-98. <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgr026>
- Trail, P. A., Dubowchik, G. M., & Lowinger, T. B. (2018). Antibody drug conjugates for treatment of breast cancer: Novel targets and diverse approaches in ADC design. *Pharmacol Ther*, 181, 126-142. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.07.013>
- Trenker, R., Diwanji, D., & Jura, N. (2021). Mutant HER2 needs mutant HER3 to be an effective oncogene. *Cell Rep Med*, 2(8), 100361. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100361>
- Tsuchikama, K., & An, Z. (2018). Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein Cell*, 9(1), 33-46. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0323-0>
- Tsujioka, H., Yotsumoto, F., Shirota, K., Horiuchi, S., Yoshizato, T., Kuroki, M., & Miyamoto, S. (2010). Emerging strategies for ErbB ligand-based targeted therapy for cancer. *Anticancer Res*, 30(8), 3107-3112. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20871027>
- Umut, O., Gottschlich, A., Endres, S., & Kobold, S. (2021). CAR T cell therapy in solid tumors: a short review. *Memo*, 14(2), 143-149. <https://doi.org/10.1007/s12254-021-00703-7>

- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, *40*(15), e115-e115.
- Uribe, M. L., Marrocco, I., & Yarden, Y. (2021). EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance. *Cancers (Basel)*, *13*(11). <https://doi.org/10.3390/cancers13112748>
- Uysal-Onganer, P., D'Alessio, S., Mortoglou, M., Kraev, I., & Lange, S. (2021). Peptidylarginine Deiminase Inhibitor Application, Using Cl-Amidine, PAD2, PAD3 and PAD4 Isozyme-Specific Inhibitors in Pancreatic Cancer Cells, Reveals Roles for PAD2 and PAD3 in Cancer Invasion and Modulation of Extracellular Vesicle Signatures. *Int J Mol Sci*, *22*(3). <https://doi.org/10.3390/ijms22031396>
- van den Bent, M., Gan, H. K., Lassman, A. B., Kumthekar, P., Merrell, R., Butowski, N., Lwin, Z., Mikkelsen, T., Nabors, L. B., Papadopoulos, K. P., Penas-Prado, M., Simes, J., Wheeler, H., Walbert, T., Scott, A. M., Gomez, E., Lee, H. J., Roberts-Rapp, L., Xiong, H., . . . Reardon, D. A. (2017). Efficacy of depatuzumab mafodotin (ABT-414) monotherapy in patients with EGFR-amplified, recurrent glioblastoma: results from a multi-center, international study. *Cancer Chemother Pharmacol*, *80*(6), 1209-1217. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3451-1>
- Vásquez Palacio, G., Ramírez, G. C., Muskus, C. E., Domingo Torres, J., & Aya, C. A. (2018). Detección de mutaciones en el dominio tirosina quinasa de BCR-ABL1 en pacientes colombianos con leucemia mieloide crónica LMC, resistentes al imatinib. *Revista Colombiana de Cancerología*, *22*(1), 8-17.
- Veeraraghavan, J., De Angelis, C., Reis-Filho, J. S., Pascual, T., Prat, A., Rimawi, M. F., Osborne, C. K., & Schiff, R. (2017). De-escalation of treatment in HER2-positive breast cancer: Determinants of response and mechanisms of resistance. *Breast*, *34 Suppl 1*(Suppl 1), S19-S26. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2017.06.022>
- Viale, G. (2012). The current state of breast cancer classification. *Ann Oncol*, *23 Suppl 10*, x207-210. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds326>
- Vivas-Pérez, J. I. A., Martín, R. B., & Romacho, J. U. (2022). Cáncer renal avanzado, perfiles para los nuevos tratamientos. *Medicina Clínica Práctica*, *5*(1), 100277.
- Voigtlaender, M., Schneider-Merck, T., & Trepel, M. (2018). Lapatinib. *Recent Results Cancer Res*, *211*, 19-44. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8_2
- Wander, S. A., Zhao, D., & Slingerland, J. M. (2011). p27: a barometer of signaling deregulation and potential predictor of response to targeted therapies. *Clin Cancer Res*, *17*(1), 12-18. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0752>
- Wang, C., Yuan, X., & Xue, J. (2023). Targeted therapy for rare lung cancers: Status, challenges, and prospects. *Mol Ther*, *31*(7), 1960-1978. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.05.007>
- Wang, J., & Xu, B. (2019). Targeted therapeutic options and future perspectives for HER2-positive breast cancer. *Signal Transduct Target Ther*, *4*, 34. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0069-2>
- Wang, J. J., Lei, K. F., & Han, F. (2018). Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *22*(12), 3855-3864. https://doi.org/10.26355/eurrev_201806_15270
- Wang, L., Wang, Q., Xu, P., Fu, L., Li, Y., Fu, H., Quan, H., & Lou, L. (2020). YES1 amplification confers trastuzumab-emtansine (T-DM1) resistance in HER2-positive cancer. *Br J Cancer*, *123*(6), 1000-1011. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0952-1>
- Wang, Q., Tang, H., Luo, X., Chen, J., Zhang, X., Li, X., Li, Y., Chen, Y., Xu, Y., & Han, S. (2022). Immune-Associated Gene Signatures Serve as a Promising Biomarker of Immunotherapeutic Prognosis for Renal Clear Cell Carcinoma. *Front Immunol*, *13*, 890150. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.890150>

- Wang, Y., Chen, R., Gan, Y., & Ying, S. (2021). The roles of PAD2- and PAD4-mediated protein citrullination catalysis in cancers. *Int J Cancer*, *148*(2), 267-276. <https://doi.org/10.1002/ijc.33205>
- Wang, Y., Liu, C., Zhang, N., Song, X., Song, Y., Cai, D., Fang, K., & Chang, X. (2022). Anti-PADI4 antibody suppresses breast cancer by repressing the citrullinated fibronectin in the tumor microenvironment. *Biomed Pharmacother*, *153*, 113289. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113289>
- Wang, Z. (2017). ErbB Receptors and Cancer. *Methods Mol Biol*, *1652*, 3-35. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7219-7_1
- Warren, A. Y., & Harrison, D. (2018). WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. *World J Urol*, *36*(12), 1913-1926. <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2447-8>
- Wei, J., Han, X., Bo, J., & Han, W. (2019). Target selection for CAR-T therapy. *J Hematol Oncol*, *12*(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0758-x>
- Wilks, S. T. (2015). Potential of overcoming resistance to HER2-targeted therapies through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Breast*, *24*(5), 548-555. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.06.002>
- Wu, Z., Wang, J., You, F., Li, X., & Xiao, C. (2023). The role of irreversible pan-HER tyrosine kinase inhibitors in the treatment of HER2-Positive metastatic breast cancer. *Front Pharmacol*, *14*, 1142087. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1142087>
- Yan, M., Parker, B. A., Schwab, R., & Kurzrock, R. (2014). HER2 aberrations in cancer: implications for therapy. *Cancer Treat Rev*, *40*(6), 770-780. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.02.008>
- Yang, C., Alam, A., Alhumaydhi, F. A., Khan, M. S., Alsagaby, S. A., Al Abdulmonem, W., Hassan, M. I., Shamsi, A., Bano, B., & Yadav, D. K. (2022). Bioactive Phytoconstituents as Potent Inhibitors of Tyrosine-Protein Kinase Yes (YES1): Implications in Anticancer Therapeutics. *Molecules*, *27*(10). <https://doi.org/10.3390/molecules27103060>
- Yang, D. C., & Chen, C. H. (2020). Potential New Therapeutic Approaches for Renal Cell Carcinoma. *Semin Nephrol*, *40*(1), 86-97. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2019.12.010>
- Yang, J., Xu, R., Wang, C., Qiu, J., Ren, B., & You, L. (2021). Early screening and diagnosis strategies of pancreatic cancer: a comprehensive review. *Cancer Commun (Lond)*, *41*(12), 1257-1274. <https://doi.org/10.1002/cac2.12204>
- Yarden, Y., & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *2*(2), 127-137. <https://doi.org/10.1038/35052073>
- Ye, Z., Zhang, Y., Liu, Y., Liu, Y., Tu, J., & Shen, Y. (2021). EGFR Targeted Cetuximab-Valine-Citrulline (vc)-Doxorubicin Immunoconjugates- Loaded Bovine Serum Albumin (BSA) Nanoparticles for Colorectal Tumor Therapy. *Int J Nanomedicine*, *16*, 2443-2459. <https://doi.org/10.2147/IJN.S289228>
- Yeh, J., & Yeh, Y. C. (1989). Transforming growth factor-alpha and human cancer. *Biomed Pharmacother*, *43*(9), 651-659. [https://doi.org/10.1016/0753-3322\(89\)90083-8](https://doi.org/10.1016/0753-3322(89)90083-8)
- Yeku, O. O., Purdon, T. J., Koneru, M., Spriggs, D., & Brentjens, R. J. (2017). Armored CAR T cells enhance antitumor efficacy and overcome the tumor microenvironment. *Sci Rep*, *7*(1), 10541. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10940-8>
- Yersal, O., & Barutca, S. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*, *5*(3), 412-424. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.412>
- Yin, F., Adhikari, D., Peay, M., Cortes, D., Garada, M., Shane Woolf, M., Ma, E., Lebarbenchon, D., Mylott, W., Dyszel, M., Harriman, S., & Pinkas, J. (2023). Development and validation of a hybrid immunoaffinity LC-MS/MS assay for quantitation of total antibody (TAB) from an antibody drug conjugate (ADC) PYX-201 in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, *1228*, 123844. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2023.123844>

- Yong, C. S. M., Dardalhon, V., Devaud, C., Taylor, N., Darcy, P. K., & Kershaw, M. H. (2017). CAR T-cell therapy of solid tumors. *Immunol Cell Biol*, 95(4), 356-363. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.128>
- Yu, J., Fang, T., Yun, C., Liu, X., & Cai, X. (2022). Antibody-Drug Conjugates Targeting the Human Epidermal Growth Factor Receptor Family in Cancers. *Front Mol Biosci*, 9, 847835. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.847835>
- Zaczek, A., Brandt, B., & Bielawski, K. P. (2005). The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches. *Histol Histopathol*, 20(3), 1005-1015. <https://doi.org/10.14670/HH-20.1005>
- Zahavi, D., & Weiner, L. (2020). Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies (Basel)*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/antib9030034>
- Zhang, C., Liu, J., Zhong, J. F., & Zhang, X. (2017). Engineering CAR-T cells. *Biomark Res*, 5, 22. <https://doi.org/10.1186/s40364-017-0102-y>
- Zhang, H., Yu, P., Tomar, V. S., Chen, X., Atherton, M. J., Lu, Z., Zhang, H. G., Li, S., Ortiz, A., Gui, J., Leu, N. A., Yan, F., Blanco, A., Meyer-Ficca, M. L., Meyer, R. G., Beiting, D. P., Li, J., Nunez-Cruz, S., O'Connor, R. S., . . . Fuchs, S. Y. (2022). Targeting PARP11 to avert immunosuppression and improve CAR T therapy in solid tumors. *Nat Cancer*, 3(7), 808-820. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00383-0>
- Zhang, S., & Yu, D. (2012). Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. *Trends Pharmacol Sci*, 33(3), 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.11.002>
- Zhou, J., Ji, Q., & Li, Q. (2021). Resistance to anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer: underlying mechanisms and reversal strategies. *J Exp Clin Cancer Res*, 40(1), 328. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02130-2>
- Zhou, Q. (2017). Site-Specific Antibody Conjugation for ADC and Beyond. *Biomedicines*, 5(4). <https://doi.org/10.3390/biomedicines5040064>
- Zhu, C., Liu, C., & Chai, Z. (2023). Role of the PADI family in inflammatory autoimmune diseases and cancers: A systematic review. *Front Immunol*, 14, 1115794. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1115794>
- Zimmermann, G. R., Lehar, J., & Keith, C. T. (2007). Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discov Today*, 12(1-2), 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.11.008>
- Zorbas, M. A., & Yeoman, L. C. (1993). Growth control in a human colon carcinoma cell line mediated by cell-associated transforming growth factor-alpha (TGF alpha). *Exp Cell Res*, 206(1), 49-57. <https://doi.org/10.1006/excr.1993.1119>

FINANCIACIÓN

El presente trabajo de Tesis doctoral titulado **“Nuevas estrategias frente a receptores de la familia ErbB/HER y sus ligandos en cáncer”** ha sido realizado por Inés Romero Pérez en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC), centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad de Salamanca (USAL).

La autora del trabajo ha sido beneficiaria de una beca predoctoral (EDU/556/2019) cofinanciada por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León y el Fondo social Europeo. Durante los últimos 5 meses, Inés Romero fue contratada a través de un proyecto de investigación financiado por la Fundación de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca (FICUS).

El trabajo desarrollado en el laboratorio del Dr. Atanasio Pandiella ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2015-71371-R y PID2020-115605RB-I00), por la Junta de Castilla y León (CSI146P20), el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) a través del Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer (CIBERONC), la Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer, la Fundación CRIS contra el Cáncer, la Asociación Leonesa de Mujeres Operadas de cáncer de Mama (ALMOM), la Asociación Ceutí de Mujeres Mastectomizadas (ACMUMA) y la Asociación Unidos contra el Cáncer Toro, y su Alfoz (UCCTA). Además, durante el desarrollo de la Tesis Doctoral, el laboratorio ha recibido el apoyo adicional de la Comunidad Europea a través del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

AGRADECIMIENTOS

Había leído muchos agradecimientos de tesis, pero no veía el día en que tendría que empezar a escribir los míos.

En primer lugar, quería darle las gracias a mi tutor de tesis, Atanasio Pandiella Alonso, por acogerme en su laboratorio y confiar tanto en mí como en mi trabajo día tras día. Gracias por haberme enseñado todo lo que sé, por ayudarme y acompañarme en el inicio de mi carrera científica. Espero que, aunque el tiempo pase, la ciencia nos siga uniendo.

A todos mis compañeros de laboratorio, a todos los que están y a todos los que han formado parte del L15/20. A Juan Carlos, por ayudarme y guiarme desde el primer día en que llegué a este laboratorio. Gracias por dedicar tu tiempo en mí siempre que lo he necesitado. Esta tesis, sin duda, también es tuya. A Elena, por estar siempre dispuesta a ayudar, sea cual sea el momento. Sois los grandes pilares de este laboratorio. A Azu, porque su sinceridad y ayuda siempre han sido claves para hacernos avanzar. A mi florecilla, Sofi, por estar desde el minuto uno en que llegué al laboratorio. No hay mayor regalo que el haberte conocido. A Sheila y Mónica, por ser las compañeras de trabajo que cualquiera desearía tener. A Maryam y Neda, I wish you that all your hard work has its reward. A las nuevas incorporaciones, Mamen y Ana, por hacer que cada día de trabajo fuera mejor que el anterior. Y a Adri, por ser el terremoto que no sabía que necesitaba. Te deseo lo mejor en este camino que acabas de empezar. Darle las gracias a todas aquellas personas que he conocido a lo largo de estos 5 años, sobre todo a Lucía, por haber alegrado el laboratorio cada uno de los días.

A todas las personas que forman parte de los Servicios del Centro de Investigación del Cáncer, por haber ayudado de una manera u otra a que esta Tesis Doctoral saliera a la luz. En especial a Celso, por hacer que los pasillos fueran siempre menos aburridos.

A todas aquellas personas con las que me he cruzado durante todos estos años. A mis antiguas compañeras de piso, a toda la gente del gimnasio... y en especial a la familia de Miguel, por haberme acogido siempre con tanto cariño. Han sido años de mucho aprendizaje, tanto personal como profesional, y os estaré eternamente agradecida por haber formado parte de ello.

A mi familia. En especial a Ana y Antonio, por hacerme sentir siempre en casa. Sois lo mejor. A Alba, mi mitad, aun recuerdo el día que volviendo a casa te dije que ya tenía fecha para venir aquí. Te quiero a mi lado siempre, gracias por esperarme todo este tiempo. Lo mejor, sin ninguna duda, está por venir. A Noelia, por ser la amiga que cualquiera desearía tener. Gracias por seguir ahí, siempre serás de lo más especial para mí.

A mis padres. Jamás pensé que echaría tanto de menos estar en casa. Gracias por cruzaros la península todas las veces que habéis podido para venir a verme. No hay palabras para agradeceros el apoyo, las palabras de ánimo, todas esas videollamadas... por cada abrazo en cada despedida y por esa gran sonrisa en cada uno de los reencuentros. El orgullo de teneros siempre será mío. Os quiero, no sabeis cuanto.

Y ahora sí... esta tesis va íntegramente dedicada a ti, Miguel. Has sido la sorpresa y el regalo más bonito que la vida jamás me dió. Has vivido esta tesis como si fuera tuya (lo siento y gracias a partes iguales). Gracias por apoyarme, entenderme, por haber hecho de esta experiencia una vivencia única. Nunca imaginé encontrarte, y ahora no imagino una vida sin ti. De la mano se que conseguiremos cualquier cosa, se que podremos llegar a cualquier sitio. Gracias por no soltarme, por todo lo que mas has dado durante estos 2 años sin pedir nunca nada a cambio. Por ser la alegría de cada uno de mis días. Te prometo que esto solo acaba de empezar. Eternamente, siempre serás tú.

No ha sido fácil, pero tampoco espero que ningún gran logro lo sea. Esta tesis también es vuestra. Muchas gracias a todos.