



**ANTICUERPOS CONJUGADOS A FÁRMACOS  
FRENTE A RECEPTORES ERBB:  
NUEVAS INDICACIONES Y MECANISMOS DE  
RESISTENCIA**

Tesis Doctoral  
Sara García Alonso  
Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer  
CSIC-Universidad de Salamanca  
Salamanca, marzo 2018



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

#### CERTIFICA

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Anticuerpos conjugados a fármacos frente a receptores ERBB: nuevas indicaciones y mecanismos de resistencia” presentada por la Licenciada Dña. Sara García Alonso ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, centro mixto CSIC-Universidad de Salamanca, 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 31 de enero de 2018.

Fdo: Atanasio Pandiella Alonso



*A Mario*

*A mis padres*



*“Daría todo lo que sé por la mitad de lo que ignoro”*

*René Descartes*





<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. SISTEMA DE RECEPTORES ERBB/HER Y SUS LIGANDOS.....	3
1.1. Miembros de la familia ERBB.....	4
1.2. Estructura y activación .....	4
1.3. Ligandos de la familia de EGF .....	6
1.3.1. <i>TGF<math>\alpha</math></i> .....	8
1.3.1.1. <i>Estructura y procesamiento</i> .....	8
1.3.1.2. <i>Papel en cáncer</i> .....	9
1.4. Internalización de receptores ERBB.....	10
1.5. Señalización por receptores ERBB.....	11
1.6. Papel en cáncer .....	11
1.6.1. <i>EGFR</i> .....	12
1.6.2. <i>HER2</i> .....	13
1.6.3. <i>HER3 y HER4</i> .....	13
1.6.4. <i>Ligandos de la familia de EGF</i> .....	14
1.6.5. <i>Componentes “aguas abajo” de los receptores ERBB</i> .....	15
1.7. Terapias dirigidas contra receptores ERBB .....	15
1.7.1. <i>Anticuerpos monoclonales</i> .....	16
1.7.2. <i>Inhibidores de la actividad tirosina quinasa</i> .....	18
2. ANTICUERPOS CONJUGADOS A FÁRMACOS (ADCs).....	19
2.1. Panorama clínico.....	19
2.2. Componentes de un ADC.....	20
2.2.1. <i>Anticuerpo monoclonal</i> .....	22
2.2.1.1. <i>Selección de la diana molecular</i> .....	22
2.2.1.2. <i>Isotipos</i> .....	22
2.2.1.3. <i>Química de conjugación</i> .....	23
2.2.2. <i>Agente citotóxico</i> .....	23
2.2.3. <i>Enlace o linker</i> .....	24
2.3. Ado-trastuzumab emtansina o T-DM1 .....	25
2.3.1. <i>Desarrollo y resultados clínicos</i> .....	25
2.3.2. <i>Mecanismo de acción</i> .....	26
2.3.3. <i>Mecanismos de resistencia</i> .....	27
2.3.3.1. <i>Unión de T-DM1 a HER2</i> .....	27

2.3.3.2.	<i>Expresión de neuregulina</i> .....	27
2.3.3.3.	<i>Defectos en las rutas de internalización y tráfico intracelular</i> .....	28
2.3.3.4.	<i>Defectos en el procesamiento lisosomal</i> .....	28
2.3.3.5.	<i>Bombas de expulsión de fármacos y alteraciones en la tubulina <math>\beta</math></i> .....	29
2.3.3.6.	<i>Papel de ciclina B1</i> .....	29
2.3.3.7.	<i>Adquisición de alteraciones moleculares</i> .....	30
3.	CÁNCER DE MAMA .....	32
3.1.	Epidemiología .....	32
3.2.	Clasificación .....	32
3.2.1.	<i>Clasificación según el perfil molecular</i> .....	32
3.2.1.1.	<i>Luminal A y B</i> .....	33
3.2.1.2.	<i>HER2</i> .....	33
3.2.1.3.	<i>Basal-like</i> .....	33
3.2.1.4.	<i>Normal breast-like o no clasificados</i> .....	34
3.2.2.	<i>Clasificación mediante inmunohistoquímica</i> .....	34
3.3.	Opciones terapéuticas .....	36
3.3.1.	<i>Quimioterapia</i> .....	37
3.3.2.	<i>Terapia hormonal</i> .....	37
3.3.3.	<i>Terapia dirigida</i> .....	37
4.	CÁNCER DE OVARIO .....	38
4.1.	Epidemiología .....	38
4.2.	Clasificación .....	39
4.2.1.	<i>Tumores epiteliales</i> .....	39
4.2.2.	<i>Tumores germinales</i> .....	39
4.3.	Opciones terapéuticas .....	40
4.3.1.	<i>Cirugía</i> .....	40
4.3.2.	<i>Quimioterapia</i> .....	40
4.3.3.	<i>Terapia dirigida</i> .....	41
4.3.3.1.	<i>Inhibidores de la angiogénesis</i> .....	42
4.3.3.2.	<i>Inhibidores de PARP</i> .....	42
4.3.3.3.	<i>Vía de MAPK</i> .....	42
4.3.3.4.	<i>Vía de PI3K/AKT</i> .....	43
4.3.3.5.	<i>Receptores ERBB</i> .....	43
4.3.4.	<i>Inmunoterapia</i> .....	44
5.	CÁNCER DE RIÑÓN .....	45

5.1.	Epidemiología .....	45
5.2.	Clasificación .....	45
5.2.1.	<i>Carcinoma de células renales</i> .....	45
5.2.2.	<i>Carcinoma de células transicionales</i> .....	46
5.2.3.	<i>Nfroblastoma o tumor de Wilms</i> .....	46
5.3.	Opciones terapéuticas.....	47
5.3.1.	<i>Inmunoterapia</i> .....	48
5.3.2.	<i>Terapia dirigida</i> .....	48
<b><u>OBJETIVOS</u></b> .....		<b>51</b>
<b><u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b> .....		<b>55</b>
1.	REACTIVOS Y ANTICUERPOS.....	57
1.1.	Reactivos .....	57
1.2.	Anticuerpos.....	58
1.3.	Producción de anticuerpos caseros.....	61
1.3.1.	<i>Acoplamiento de los péptidos</i> .....	61
1.3.1.1.	<i>TGF<math>\alpha</math></i> .....	61
1.3.1.2.	<i>DM1</i> .....	62
1.3.2.	<i>Obtención de antiseros</i> .....	62
1.3.2.1.	<i>TGF<math>\alpha</math></i> .....	62
1.3.2.2.	<i>DM1</i> .....	63
1.3.3.	<i>Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad</i> ....	63
1.4.	Conjugación de anticuerpos a SMCC-DM1 .....	64
2.	CULTIVOS CELULARES.....	65
2.1.	Condiciones de cultivo .....	65
2.2.	Preservación de líneas celulares.....	66
2.3.	Generación de modelos de resistencia .....	66
2.4.	Modificaciones genéticas .....	67
2.4.1.	<i>Transfección con plásmidos</i> .....	67
2.4.2.	<i>Infección con lentivirus</i> .....	67
2.5.	Ensayos de proliferación celular.....	68
2.5.1.	<i>Metabolización de MTT</i> .....	69
2.5.2.	<i>Contaje celular</i> .....	69
2.6.	Imagen por contraste de fases .....	70
3.	TRABAJO CON RNA Y DNA .....	70
3.1.	Extracción de RNA.....	70

3.2.	<i>Microarrays</i> de RNA .....	71
3.2.1.	<i>Purificación del RNA</i> .....	71
3.2.2.	<i>Cuantificación y análisis de la calidad del RNA</i> .....	71
3.2.3.	<i>Preparación de las muestras e hibridación</i> .....	71
3.2.4.	<i>Análisis de datos</i> .....	72
3.3.	Síntesis de cDNA.....	72
3.4.	PCR semicuantitativa.....	73
3.5.	PCR cuantitativa .....	75
4.	TÉCNICAS DE INMUNODETECCIÓN .....	76
4.1.	Western blot.....	76
4.1.1.	<i>Preparación de lisados celulares</i> .....	76
4.1.2.	<i>Preparación de lisados a partir de muestras de tumores</i> .....	77
4.1.3.	<i>Inmunoprecipitación</i> .....	77
4.1.4.	<i>Inmunoprecipitación en superficie</i> .....	78
4.1.5.	<i>Electroforesis y detección de proteínas</i> .....	78
4.1.6.	<i>Arrays de proteínas</i> .....	79
4.2.	Inmunofluorescencia.....	80
4.2.1.	<i>Epifluorescencia y microscopía confocal</i> .....	80
4.2.2.	<i>Time lapse</i> .....	81
5.	CITOMETRÍA DE FLUJO .....	82
5.1.	Ciclo celular .....	82
5.2.	Apoptosis.....	83
5.3.	Pérdida de potencial de membrana mitocondrial.....	83
5.4.	Marcaje en superficie.....	84
5.5.	pHrodo™ .....	84
6.	ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .....	85
6.1.	Marcaje con biotina e internalización de T-DM1 .....	85
6.2.	Actividad de catepsinas .....	86
7.	ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> CON MODELOS ANIMALES.....	87
7.1.	Cepas de ratón y mantenimiento de los animales.....	87
7.2.	Producción de xenoinjertos .....	87
8.	MUESTRAS DE PACIENTES Y MODELOS RESISTENTES DERIVADOS DE PDXs ( <i>PATIENT DERIVED XENOGRAFTS</i> ) .....	88
9.	ESTUDIOS <i>IN SILICO</i> .....	89
10.	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	90

**CAPÍTULO I: RESISTENCIA A T-DM1 EN CÁNCER DE MAMA..... 91**

1.	GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA CON RESISTENCIA ADQUIRIDA A T-DM1.....	93
1.1.	Efecto de T-DM1 en un panel de líneas celulares de cáncer de mama HER2+.....	93
1.2.	Generación y caracterización de clones resistentes a T-DM1 .....	94
1.3.	Estudio transcriptómico de los clones resistentes a T-DM1.....	98
1.4.	Estudios <i>in vivo</i> .....	102
2.	DETERMINACIÓN DE UN MECANISMO DE RESISTENCIA A T-DM1 EN BT474.....	105
2.1.	Análisis del papel de HER2 en la adquisición de resistencia a T-DM1 .....	105
2.1.1.	<i>Determinación de los niveles de HER2 total y HER2 en superficie.....</i>	105
2.1.2.	<i>Efecto del tratamiento con T-DM1 en los niveles de HER2 .....</i>	107
2.1.3.	<i>Efecto de la pérdida de HER2 en la resistencia a T-DM1 .....</i>	107
2.1.4.	<i>Estado de activación de las rutas de señalización reguladas por HER2 en los clones resistentes.....</i>	108
2.2.	Análisis del papel de la tubulina $\beta$ en la adquisición de resistencia a T-DM1 .....	109
2.2.1.	<i>Análisis de los husos mitóticos.....</i>	109
2.2.2.	<i>Análisis de mutaciones en tubulina <math>\beta</math> en los clones resistentes.....</i>	111
2.2.3.	<i>Efecto de otros fármacos antimicrotúbulos en los clones resistentes.....</i>	111
2.2.4.	<i>Expresión de bombas de expulsión de fármacos .....</i>	113
2.3.	Análisis de la internalización de T-DM1 .....	114
2.3.1.	<i>Análisis de enriquecimiento de los genes expresados diferencialmente en los clones resistentes.....</i>	114
2.3.2.	<i>Internalización de T-DM1 marcado con biotina .....</i>	115
2.3.3.	<i>Detección de T-DM1 por IF.....</i>	116
2.3.4.	<i>Seguimiento de T-DM1 a tiempos largos (time-lapse) .....</i>	118
2.3.5.	<i>Colocalización con marcadores de la ruta endocítica.....</i>	118
2.4.	Análisis de la degradación lisosomal de T-DM1 .....	120
2.4.1.	<i>Análisis del pH lisosomal .....</i>	120
2.4.2.	<i>Análisis de la actividad proteolítica lisosomal.....</i>	122
2.4.3.	<i>Análisis de la capacidad autofágica de los clones.....</i>	123
2.4.4.	<i>Manipulación del pH lisosomal para modular el efecto</i>	

	<i>de T-DM1</i> .....	125
2.5.	Validación del mecanismo de resistencia en un modelo de PDX.....	127
<b>CAPÍTULO II: POTENCIAL TERAPÉUTICO DE T-DM1 EN CÁNCER DE OVARIO HER2+ .....</b>		<b>131</b>
1.	IDENTIFICACIÓN DE HER2 COMO DIANA TERAPÉUTICA EN CÁNCER DE OVARIO .....	133
1.1.	Análisis del perfil de tirosina quinasas activas en muestras de pacientes con cáncer de ovario.....	133
1.2.	Análisis del potencial de HER2 como diana terapéutica en cáncer de ovario .....	137
1.2.1.	<i>Efecto del silenciamiento de HER2 en la proliferación de células de cáncer de ovario</i> .....	137
1.2.2.	<i>Efecto de la inhibición farmacológica de HER2 in vitro</i> .....	140
1.2.3.	<i>Efecto de la inhibición farmacológica de HER2 in vivo</i> .....	143
1.2.4.	<i>Efecto de la combinación de T-DM1 con fármacos standard of care</i> .....	146
2.	ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE T-DM1 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE OVARIO.....	147
2.1.	Efecto de T-DM1 sobre el ciclo celular de células de cáncer de ovario .....	147
2.2.	Efecto de T-DM1 sobre la muerte celular de células de cáncer de ovario .....	149
<b>CAPÍTULO III: DIANAS TERAPÉUTICAS PARA ADCs EN CCRC</b> .....		<b>153</b>
1.	IDENTIFICACIÓN DE EGFR Y SU LIGANDO TGF $\alpha$ COMO DIANAS TERAPÉUTICAS EN CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS (CCRC) .....	155
1.1.	Búsqueda de dianas terapéuticas en muestras tumorales de pacientes con ccRCC .....	155
1.1.1.	<i>Análisis del perfil de receptores tirosina quinasa activos</i> .....	155
1.1.2.	<i>Estudio in silico de la expresión de EGFR en muestras de pacientes</i> .....	158
1.1.3.	<i>Análisis de la expresión de los ligandos de EGFR</i> .....	160
1.1.4.	<i>Estudio in silico de la expresión de TGF<math>\alpha</math> en muestras de pacientes</i> .....	161
1.1.5.	<i>Análisis de los niveles proteicos de TGF<math>\alpha</math></i> .....	163
1.2.	Búsqueda de dianas terapéuticas en modelos celulares de ccRCC .....	166
1.2.1.	<i>Análisis del perfil de receptores tirosina quinasa activos</i> .....	167
1.2.2.	<i>Análisis de la expresión de los ligandos de EGFR</i> .....	167
1.2.3.	<i>Validación de la expresión de EGFR y sus ligandos a nivel</i>	

	<i>proteico</i> .....	168
1.2.4.	<i>Estudio in silico de la expresión de EGFR y TGF<math>\alpha</math> en líneas celulares tumorales</i> .....	169
2.	VALIDACIÓN DE TGF $\alpha$ COMO DIANA TERAPÉUTICA DE ADC EN CCRCC.....	171
2.1.	Efecto antiproliferativo de la inhibición del receptor de TGF $\alpha$ .....	171
2.1.1.	<i>Inhibición genética de EGFR</i> .....	171
2.1.2.	<i>Inhibición farmacológica de EGFR</i> .....	172
2.2.	Efecto antiproliferativo de la inhibición de TGF $\alpha$ .....	174
2.2.1.	<i>Inhibición genética de TGF<math>\alpha</math></i> .....	174
2.2.2.	<i>Inhibición de TGF<math>\alpha</math> con anticuerpos bloqueantes</i> .....	176
2.3.	Evaluación de un ADC para bloquear TGF $\alpha$ .....	176
2.3.1.	<i>Generación de ADCs con DM1 como agente citotóxico</i> .....	176
2.2.2.	<i>Efecto antiproliferativo de los diferentes mAb-DM1</i> .....	179
	<b><u>DISCUSIÓN</u></b> .....	<b>181</b>
	CAPÍTULO I: RESISTENCIA A T-DM1 EN CÁNCER DE MAMA.....	183
	CAPÍTULO II: POTENCIAL TERAPÉUTICO DE T-DM1 EN CÁNCER DE OVARIO HER2+.....	189
	CAPÍTULO III: DIANAS TERAPÉUTICAS PARA ADCs EN CCRCC.....	194
	<b><u>CONCLUSIONES</u></b> .....	<b>201</b>
	<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	<b>205</b>
	<b>FINANCIACIÓN</b> .....	<b>225</b>
	<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>229</b>





# **ABREVIATURAS**



## Abreviaturas

ABC	<i>ATP-binding cassette transporter</i> ; transportador del casete de unión a ATP
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i> ; desintegrina y metaloproteasa
ADC	<i>antibody-drug conjugate</i> ; anticuerpo conjugado a fármaco
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> ; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
AREG	<i>amphiregulin</i> ; anfiregulina
BAX	<i>BCL2 associated protein X</i> ; proteína X asociada a BCL2
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> ; ácido bicinconínico
BCL2	<i>B-cell lymphoma-2</i> ; linfoma 2 de células B
BRCA1	<i>breast cancer 1</i> ; cáncer de mama 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
BTC	<i>betacellulin</i> ; betacelulina
BV	<i>brentuximab vedotin</i> ; brentuximab vedotina
CAR-T cell	<i>chimeric antigen receptor-modified T cell</i> ; célula T modificada con un receptor de antígeno quimérico
CAV1	<i>caveolin-1</i> ; caveolina-1
CCLC	<i>Cancer Cell Line Encyclopedia</i>
ccRCC	<i>clear cell renal cell carcinoma</i> ; carcinoma de células renales de células claras
CME	<i>clathrin-mediated endocytosis</i> ; endocitosis mediada por clatrina
CNBr	<i>cyanogen bromide</i> ; bromuro de cianógeno
CSPG5	<i>chondroitin sulfate proteoglycan 5</i> ; proteoglicano 5 condroitín sulfato
DAR	<i>drug-antibody ratio</i> ; ratio fármaco-anticuerpo
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> ; medio de Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i> ; dimetil sulfóxido
dNTP	<i>deoxynucleotide triphosphate</i> ; deoxinucleótido trifosfato
EGF	<i>epidermal growth factor</i> ; factor de crecimiento epidérmico
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> ; receptor del factor de crecimiento epidérmico
EPGN	<i>epigen/epithelial mitogen</i> ; mitógeno epitelial
ER	<i>estrogen receptor</i> ; receptor de estrógenos

EREG	<i>epiregulin</i> ; epiregulina
FBS	<i>fetal bovine serum</i> ; suero bovino fetal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i> ; isotiocianato de fluoresceína
GMC	<i>giant multinucleated cells</i> ; células gigantes multinucleadas
GO	<i>gemtuzumab ozogamicin</i> ; gemtuzumab ozogamicina
GO	<i>gene ontology</i> , ontología génica
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
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> ; peroxidasa de rábano
IO	<i>inotuzumab ozogamicin</i> ; inotuzumab ozogamicina
IF	<i>immunofluorescence</i> ; inmunofluorescencia
IFN $\alpha$	<i>interferon alpha</i> ; interferón alfa
IgG	<i>immunoglobulin G</i> ; inmunoglobulina G
IL-2	<i>interleukin 2</i> ; interleucina 2
IP	<i>immunoprecipitation</i> ; inmunoprecipitación
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i> ; hemocianina de lapa
KRH	<i>Krebs-Ringer-HEPES buffer</i> ; tampón Krebs-Ringer-HEPES
NRG	<i>neuregulin</i> ; neuregulina
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
MMLV-RT	<i>Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase</i> ; transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney
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
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i> ; carcinoma de pulmón no microcítico
PARP	<i>poly-ADP ribose polymerase</i> ; poli-ADP-ribosa-polimerasa
PBD	<i>pyrrolobenzodiazepine</i> ; pirrolobenzodiacepina
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> ; tampón 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
PD-L1	<i>programmed death-ligand 1</i> ; ligando 1 de muerte programada
PDX	<i>patient derived xenograft</i> ; xenoinjerto derivado de paciente
PgP/MDR1	<i>P-glycoprotein 1/multidrug resistance protein 1</i> ; proteína de permeabilidad/ proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos
PI	<i>propidium iodide</i> ; yoduro de propidio
PI3K	<i>phosphatidyl inositol 3-kinase</i> ; fosfatidilinositol-3-quinasa
PLC	<i>phospholipase C</i> ; fosfolipasa C
PMFS	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> ; fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PR	<i>progesterone receptor</i> ; receptor de progesterona
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i> ; fosfatasa homóloga a la tensina
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i> ; difluoruro de polivinilideno
qRT-PCR	<i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i> ; reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTK	<i>receptor tyrosine kinase</i> ; receptor tirosina quinasa
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> ; electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
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
T-DM1	<i>ado-trastuzumab emtansine</i> ; ado-trastuzumab emtansina
TGF $\alpha$	<i>transforming growth factor alpha</i> ; factor de crecimiento y transformación de tipo alfa
TKI	<i>tyrosine kinase inhibitor</i> ; inhibidor de tirosina quinasas
TMRE	<i>tetramethylrhodamine, ethyl ester</i> ; tetrametilrodamina, etil ester
TNBC	<i>triple negative breast cancer</i> ; cáncer de mama triple negative
UAA	<i>unnatural aminoacids</i> ; aminoácidos no naturales
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> ; factor de crecimiento de endotelio vascular
v-erbB	<i>erythroblastic leukemia viral oncogene B</i> ; oncogén viral de la leucemia de eritroblastosis B
WB	<i>Western blot</i>



# **INTRODUCCIÓN**





## PROPÓSITO DE LA TESIS

La señalización aberrante a través de receptores ERBB está íntimamente ligada a distintos tipos de cáncer, lo que ha conducido al desarrollo de terapias dirigidas contra estas proteínas.

*En este trabajo se han intentado abordar algunos aspectos relacionados con los tratamientos dirigidos basados en anticuerpos conjugados a fármacos (ADCs), como la aparición de resistencias o la selección de dianas moleculares adecuadas.*

**(I)** Se ha descrito un **mecanismo de resistencia a un ADC** aprobado para el tratamiento del cáncer de mama HER2+ metastásico (T-DM1). **(II)** Por otro lado, se ha propuesto una **nueva indicación de T-DM1 en otras patologías** con sobreexpresión de HER2, como algunos carcinomas de ovario. **(III)** Finalmente se ha identificado al ligando de EGFR, **TGF $\alpha$  como una diana terapéutica** para un tratamiento basado en ADCs en carcinoma renal de células claras.

### 1. SISTEMA DE RECEPTORES ERBB/HER Y SUS LIGANDOS

Los miembros de la familia de receptores ERBB/HER pertenecen a la subclase I de la superfamilia de receptores tirosina quinasa (RTKs, *receptor tyrosine kinases*) y su denominación se basa en la homología que presentan con el producto del gen viral de la eritroblastosis aviar (*v-erbB*, *erythroblastic leukemia viral oncogene B*) (Downward *et al.* 1984, Yarden y Sliwkowski 2001).

Estos receptores se expresan en múltiples células de linaje epitelial, mesenquimal y neuronal, en las que juegan diversos papeles en el desarrollo, proliferación y diferenciación (Tebbutt *et al.* 2013). En condiciones fisiológicas, la activación de los receptores ERBB está controlada por la expresión de sus ligandos, que son miembros de la familia del EGF (*epidermal growth factor*; factor de crecimiento epidérmico) (Hynes y Lane 2005). La desregulación de estos receptores tiene una fuerte implicación en la oncogénesis y la progresión tumoral. En cáncer, se ha demostrado que la familia de receptores ERBB participa en la patofisiología de tumores de mama, gástricos, colorrectales, de páncreas, de

pulmón y de cabeza y cuello (Ocana y Pandiella 2013). Por ello, los componentes de esta familia constituyen importantes dianas terapéuticas (Riese *et al.* 2007, Ocana y Pandiella 2010).

### 1.1. Miembros de la familia ERBB

En mamíferos esta familia está compuesta por cuatro miembros (Figura 1):

- EGFR (*epidermal growth factor receptor*; receptor del factor de crecimiento epidérmico), ERBB1 o HER1 (*human epidermal growth factor receptor 1*; receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 1)
- Neu, ERBB2 o HER2
- ERBB3 o HER3
- ERBB4 o HER4

El primero en ser descubierto fue EGFR (Sato *et al.* 1983) y se identificó originalmente como un oncogén debido a su homología con v-erbB, una proteína retroviral que permitía al virus de la eritoblastosis aviar transformar células de pollo (Downward *et al.* 1984). Un año después, se describió la secuencia de un RTK que presentaba una gran homología con EGFR y que se denominó HER2 (Coussens *et al.* 1985). Posteriormente, se describieron los otros dos miembros de la familia, HER3 (Kraus *et al.* 1989) y HER4 (Plowman *et al.* 1993), ambos también implicados en procesos tumorales.

### 1.2. Estructura y activación

Los receptores ERBB son glicoproteínas transmembrana que presentan una región extracelular de unión a ligando, una región lipofílica transmembrana y una larga cola citoplasmática (Hynes y Lane 2005). La región extracelular contiene cuatro subdominios (Burgess *et al.* 2003): los subdominios I y III están involucrados en la unión al ligando; el subdominio II posee el brazo de dimerización que se expone tras la unión del ligando al receptor; y el subdominio IV interacciona con el subdominio II, bloqueando la exposición del brazo de

dimerización en la conformación cerrada inactiva. Tras la región transmembrana, aparece el dominio yuxtamembrana con capacidad reguladora que modula la dimerización, internalización u ordenamiento dentro de la membrana (Kil y Carlin 2000, He *et al.* 2002). Finalmente, existe una larga cola citoplasmática que posee un dominio con actividad tirosina quinasa y múltiples sitios potenciales de fosforilación.

Los cuatro miembros de la familia de receptores ERBB comparten esta estructura general, aunque existen dos particularidades importantes. Por un lado, el receptor HER3 no presenta actividad quinasa eficiente, por lo tanto, para la señalización depende de interacciones con otros receptores ERBB (Carraway *et al.* 1994). Por otro lado, no se ha descrito ningún ligando capaz de unirse con alta afinidad al receptor HER2, sin embargo, al estar permanentemente en una conformación abierta o activa, funciona como correceptor de los otros tres miembros (Hynes y Lane 2005, Linggi y Carpenter 2006).

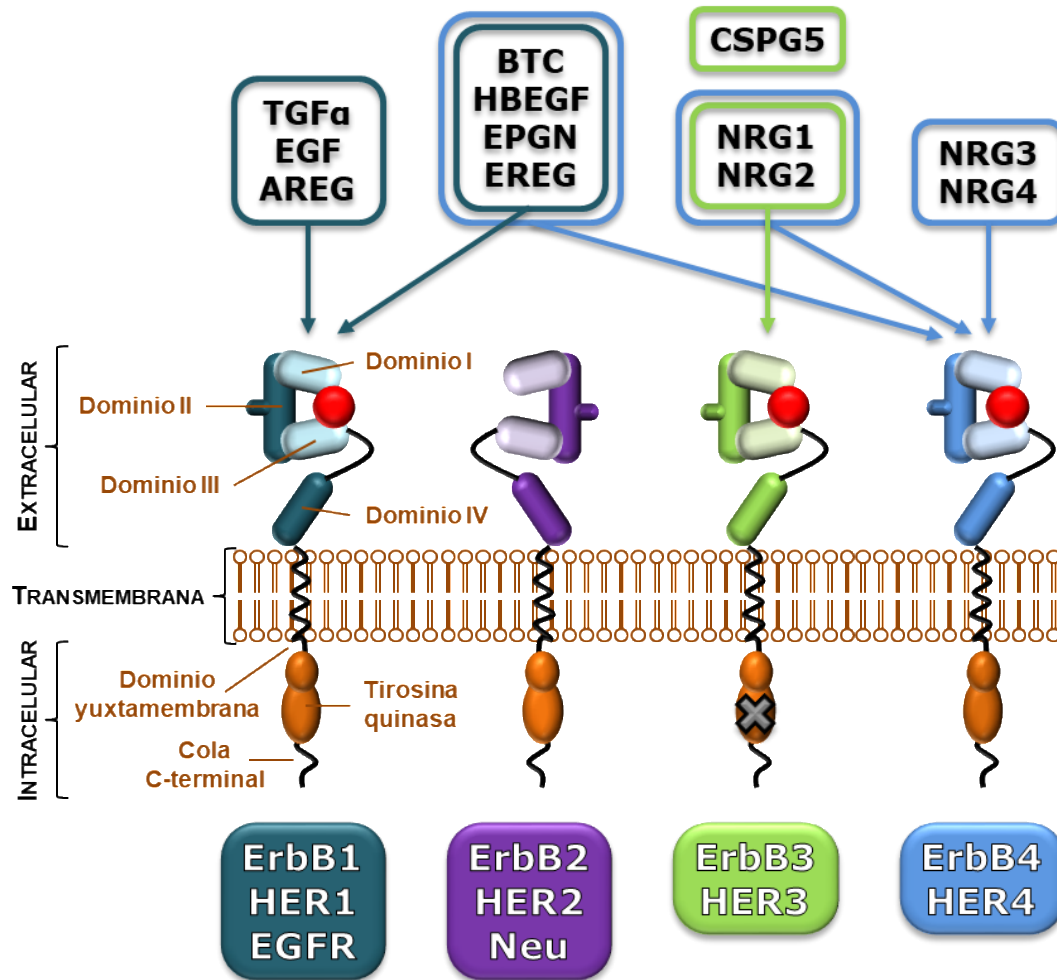
A excepción de los mutantes constitutivamente activos, la activación de los receptores ERBB tiene lugar por dimerización, provocada tras la unión del ligando o por la sobreexpresión del receptor. La dimerización puede darse entre dos receptores idénticos (homodimerización) o entre diferentes miembros de la familia (heterodimerización), particularmente EGFR, HER3 y HER4 con HER2 (Linggi y Carpenter 2006). La unión de los ligandos al ectodominio del receptor induce un cambio conformacional que conduce a la exposición del brazo de dimerización, promoviendo así la asociación de receptores, seguida de la activación del dominio quinasa intracelular y la fosforilación de los residuos de tirosina en el extremo C-terminal (Hynes y Lane 2005, Linggi y Carpenter 2006). A continuación, se produce la transfosforilación de los receptores y la subsiguiente activación de rutas de señalización que dirigen las respuestas celulares (Hynes y Lane 2005). La identidad del ligando y los receptores que componen el dímero van a determinar qué sitios se fosforilan y, por tanto, qué proteínas de señalización se asocian (Olayioye *et al.* 2000, Yarden y Sliwkowski 2001).

### 1.3. Ligandos de la familia de EGF

Los ligandos de los receptores ERBB pertenecen a la familia de EGF dado que todos poseen al menos un dominio EGF en su estructura (Massague y Pandiella 1993). Dicho dominio está constituido por unos 40-50 aminoácidos, que incluyen 6 cisteínas entre las que se establecen 3 puentes disulfuro.

En la actualidad, se conocen hasta 40 ligandos de la familia EGF en mamíferos, que pueden clasificarse en tres grupos en función de su afinidad por los distintos receptores ERBB (Figura 1) (Eccles 2011):

- EGF, TGF $\alpha$  (*transforming growth factor alpha*; factor de crecimiento y transformación de tipo alfa) y AREG (*amphiregulin*; anfiregulina) se unen específicamente a EGFR.
- 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) muestran afinidad dual por EGFR y HER4.
- NRG1 (*neuregulin 1*; neuregulina 1) y NRG2 tienen capacidad de unión a HER3 y HER4; NRG3 y NRG4, a HER4; y CSPG5 (*chondroitin sulfate proteoglycan 5*; proteoglicano 5 condroitín sulfato) o caleb, a HER3.



**Figura 1. Ligandos de EGF y receptores ERBB con los que interaccionan.**

Todas estas proteínas existen como precursores anclados a la membrana plasmática que son posteriormente procesados por metaloproteasas, principalmente ADAMs (*a disintegrin and metalloprotease*; desintegrina y metaloproteasa), conduciendo a la liberación de factores solubles (Massague y Pandiella 1993). De este modo, los ligandos de la familia de EGF son capaces de estimular la señalización celular tanto en su forma soluble como en su forma unida a membrana (Hynes y Lane 2005).

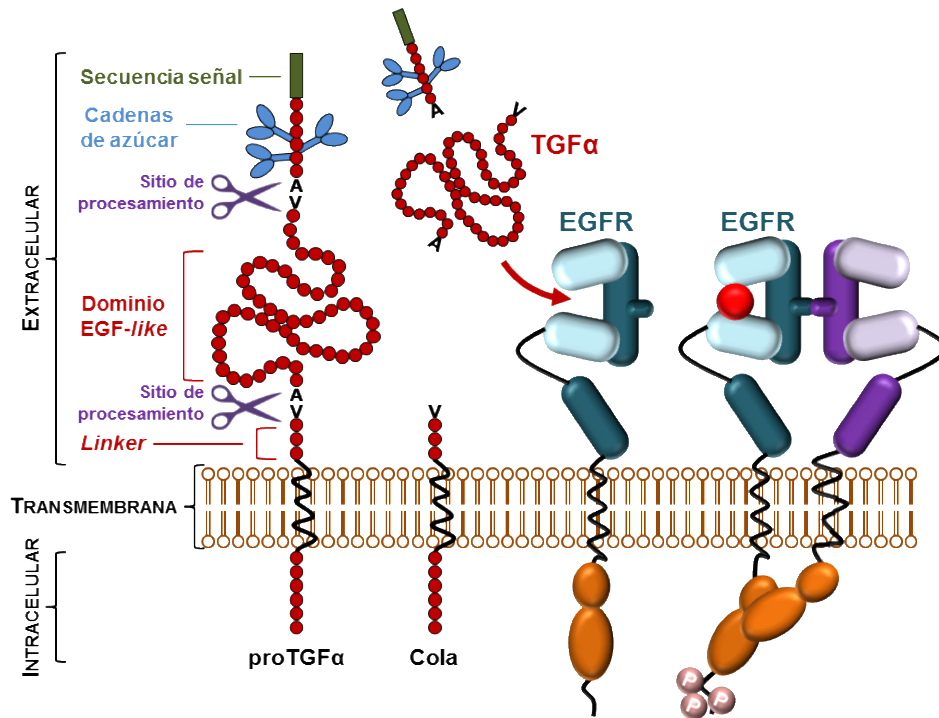
Los distintos ligandos van a promover patrones específicos de fosforilación de los receptores ERBB, lo que a su vez dicta la duración de la señalización y las respuestas celulares (Hobbs *et al.* 2002, Hynes y Lane 2005, Eccles 2011). Por ejemplo, la activación de EGFR por TGFα y AREG induce motilidad e invasión a

consecuencia de la activación sostenida de las vías de PLC (*phospholipase C*; fosfolipasa C) y MAPK (*mitogen-activated protein kinase*; proteína quinasa activada por mitógeno); sin embargo, la estimulación del receptor por EGF promueve ubiquitinación y degradación de EGFR (Eccles 2011).

### **1.3.1. TGF $\alpha$**

#### *1.3.1.1. Estructura y procesamiento*

El TGF $\alpha$  humano se localiza en el brazo corto del cromosoma 2 (2p13) y da lugar a un péptido de 160 aminoácidos (Brissenden *et al.* 1985). Este péptido pre-proTGF $\alpha$  comienza con una secuencia señal de 23 aminoácidos en la región N-terminal que se elimina cotraduccionalmente durante la translocación al lumen del retículo endoplásmico. Este péptido emergente de 17-18 kDa se convierte rápidamente en una forma glicosilada de 30 kDa durante la transición del retículo al aparato de Golgi. Una vez en la superficie celular, proTGF $\alpha$  sufre otros dos procesamientos por metaloproteasas en los sitios distal y proximal del dominio EGF, permitiendo así la liberación al medio de la forma madura soluble, de 6 kDa (Figura 2) (Pandiella y Massague 1991). Como resultado, queda una forma truncada anclada a membrana, de 15 kDa, constituida por los dominios yuxtamembrana, transmembrana y citoplasmático (Figura 2). Cabe mencionar que proTGF $\alpha$  no se procesa para generar la forma activa del factor de crecimiento, sino que varía entre dos formas activas, una anclada a membrana y otra soluble, cada una de las cuales es capaz de mediar de distinta forma la estimulación celular. El procesamiento que determina cuál de las dos formas se produce es un proceso regulado (Pandiella y Massague 1991).



**Figura 2. Procesamiento de TGFα y estimulación de EGFR.**

### 1.3.1.2. Papel en cáncer

Los estudios en ratones *knock out* y sobreexpresores de TGFα, encaminados a determinar su papel en la fisiología de los organismos, demostraron un papel del factor de crecimiento en el desarrollo de la epidermis, el pelo o los ojos. También parece estar involucrado en el desarrollo de la mama, del páncreas y del hígado (Singh y Coffey 2014).

La desregulación de TGFα podría tener un papel causal o fisiológico en varios tipos de cáncer epitelial (Giricz *et al.* 2013), donde actúa como un mitógeno específico de epitelio o modulando el microambiente tumoral (Sasaki *et al.* 2008). Por ejemplo, se ha descrito su expresión en cáncer de próstata independiente de andrógenos en estado avanzado; en cáncer de páncreas, donde se correlaciona con mayor tamaño tumoral y baja supervivencia; en cáncer de ovario, pulmón y colon, donde se expresa junto a EGFR activándolo de forma autocrina y se correlaciona con mal pronóstico (Holbro *et al.* 2003).

## 1.4. Internalización de receptores ERBB

En condiciones basales, los receptores se endocitan y reciclan a un ritmo constante, estando presentes en la membrana plasmática en un 80-90% de su cantidad total. La adición de ligandos o anticuerpos contra los receptores modifica sustancialmente estos procesos y puede derivarlos a su degradación, especialmente en el caso de EGFR (Wiley 2003).

Cuando el EGFR es activado por ligando sufre un proceso de endocitosis, principalmente mediada por vesículas de clatrina (CME, *clatrin-mediated endocytosis*; endocitosis mediada por clatrina) (Sorkin y Goh 2008). La activación del receptor conduce a su fosforilación en el residuo Y<sup>1045</sup>, en el extremo C-terminal, lo que posibilita su interacción con la proteína CBL. Esta enzima ubiquitín ligasa es responsable de ubiquitinar a EGFR, lo que conduce a su transporte a lisosomas y posterior degradación (Duan *et al.* 2003, Grovdal *et al.* 2004). Sin embargo, los distintos ligandos pueden abocar al receptor a diferentes destinos intracelulares. El resto de receptores ERBB no interaccionan con la proteína CBL, lo que repercute en una tasa de internalización mediada por ligando mucho más lenta e ineficiente. En el caso de HER2, la cantidad de receptor presente en la superficie celular es dinámica, teniendo lugar una endocitosis basal combinada con un reciclaje rápido y eficiente (Austin *et al.* 2004). Además, mientras que otros receptores disminuyen sus niveles de manera constitutiva o tras la unión con el ligando, HER2 es resistente a esta regulación y es capaz de bloquear también la regulación negativa de sus correceptores tras la formación del heterodímero (Bertelsen y Stang 2014). Los receptores HER3 y HER4, a pesar de ser endocitados con una menor eficiencia que EGFR, sufren ubiquitinación que los marca para su degradación en los lisosomas (Zhou y Carpenter 2000).



## 1.5. Señalización por receptores ERBB

La activación de los receptores ERBB estimula múltiples rutas de señalización intracelular. Sin embargo, aunque comparten algunas vías, cada receptor está acoplado a un grupo distinto de proteínas efectoras de señalización (Yarden y Sliwkowski 2001).

Las dos rutas de señalización principales activadas por todos los receptores ERBB son la vía de PI3K (*phosphatidyl inositol 3-kinase*; fosfatidilinositol 3-quinasa) y las vías de MAPKs (Yarden y Sliwkowski 2001, Schlessinger 2004). Otras vías importantes relacionadas con la señalización por estos receptores incluyen las proteínas STAT (*signal transducer and activator of transcription*; transductor de señales y activador de transcripción) (Grandis *et al.* 2000, Yu y Jove 2004), las cuales se han asociado con la activación de EGFR en cáncer; la tirosina quinasa SRC (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase sarcoma*; proto-oncogén de la proteína-tirosina quinasa de sarcoma), cuya actividad se ve incrementada a través de la señalización por EGFR o HER2 (Ishizawa y Parsons 2004); o la serina/treonina quinasa mTOR (*mammalian target of rapamycin*; diana de la rapamicina en mamíferos), que se encuentra “aguas abajo” en la vía de PI3K/AKT, de la cual HER3 es un fuerte activador (Hobbs *et al.* 2002, Eccles 2011).

La estimulación de las distintas rutas de señalización conlleva la activación en el núcleo de distintos programas transcripcionales, cuyo resultado final es la inducción de la migración, invasión, angiogénesis duplicación o supervivencia celular.

## 1.6. Papel en cáncer

Los receptores ERBB y sus vías de señalización tienen un papel crucial en el desarrollo de los organismos. Por ello, la alteración de alguno de los componentes de estas rutas tiene como consecuencia la aparición de patologías, como la oncogénesis y progresión tumoral. En la actualidad, esta red de señalización y sus

posibles alteraciones constituyen un amplio campo de estudio para lograr comprender en mayor profundidad las bases moleculares del cáncer y, de este modo, facilitar el desarrollo de nuevas terapias, así como la identificación de nuevos marcadores predictivos y de pronóstico para esta compleja enfermedad (Cai *et al.* 2010).

### **1.6.1. EGFR**

La amplificación del gen EGFR se ha descrito en un amplio rango de carcinomas, donde la inhibición de la señalización iniciada por el receptor puede bloquear el crecimiento de las células cancerígenas (Kawamoto *et al.* 1983). Sin embargo, también se han encontrado mutaciones oncogénicas en cánceres con niveles normales de EGFR. Un ejemplo es la delección de los exones 2-7 en el ectodominio, denominada EGFRvIII, que aparece en el 40% de los gliomas de alto grado (Sugawa *et al.* 1990) y también se ha encontrado en algunos tumores de mama, pulmón, cabeza y cuello, ovario y próstata (Moscatello *et al.* 1995). Dado que la expresión de EGFRvIII está restringida al tejido tumoral, se considera una buena diana terapéutica contra la que dirigir anticuerpos específicos y vacunas. Otra variante muy común de EGFR es EGFRc958, que carece de los aminoácidos 521–603 y se ha observado en alrededor del 20% de los tumores de glioblastoma multiforme (Frederick *et al.* 2000). El papel de EGFR en la oncogénesis quedó patente cuando se encontraron mutaciones somáticas activadoras en un conjunto de cánceres de pulmón no microcítico (NSCLC, *non-small cell lung cancer*) (Paez *et al.* 2004), que responden muy bien a inhibidores del receptor (Sequist *et al.* 2013). Estas mutaciones en EGFR se localizan principalmente en el dominio quinasa (Pao y Chmielecki 2010). Finalmente, se ha descrito que EGFR es importante para el crecimiento de algunos cánceres colorrectales y de cabeza y cuello, aunque las alteraciones genéticas en estos casos aún no han sido identificadas de manera consistente (Arteaga y Engelman 2014).

### 1.6.2. **HER2**

HER2 se encuentra típicamente amplificado en cánceres humanos, como cáncer de mama, gástrico y esofágico (Arteaga y Engelman 2014). En el caso del cáncer de mama, HER2 está amplificado en aproximadamente el 20% de los tumores y se asocia a un mal pronóstico (Slamon *et al.* 1987). Sin embargo, esta relación de HER2 con la progresión del cáncer también ha repercutido en la mejora de la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama HER2+ en estadios tempranos cuando son tratadas con terapias dirigidas contra el receptor, como trastuzumab (Lin y Rugo 2007). Por otro lado, no todos los tumores del subtipo que expresa HER2 tienen amplificación del gen. Algunos cánceres de mama solo presentan una copia de *HER2*, pero muestran dependencia del receptor y, por ello, podrían beneficiarse de la terapia anti-HER2 (Paik *et al.* 2008).

También se han descrito mutaciones somáticas de HER2 en varios cánceres humanos. La mayoría son mutaciones sin sentido en los dominios tirosina quinasa y extracelular, o duplicaciones/inserciones en una porción del exón 20. Estas mutaciones se han observado casi exclusivamente en cánceres sin amplificación del gen *HER2*. Varios de estos mutantes muestran una señalización incrementada y están asociados a adenocarcinoma de pulmón y cáncer de mama lobular, de vejiga, gástrico y de endometrio (Arteaga y Engelman 2014).

### 1.6.3. **HER3 y HER4**

HER3 se asocia a cáncer debido principalmente a su papel al promover la señalización a través de HER2 y EGFR en cánceres “adictos” a estos últimos receptores. HER3 actúa como principal receptor para la heterodimerización debido a su capacidad de activar la vía de PI3K/AKT a través de seis sitios de anclaje para la subunidad reguladora P85 de PI3K (Arteaga y Engelman 2014). Sin embargo, se han identificado mutaciones somáticas en el gen, que afectan sobre todo al dominio extracelular, en un conjunto de cánceres de mama y gástricos (Jaiswal *et al.* 2013). Además, la sobreexpresión de HER3 se asocia a un mal pronóstico en cáncer de mama, de pulmón y de ovario (Witton *et al.* 2003, Ocana *et al.* 2013). De

manera similar, se han identificado mutaciones en HER4 en melanoma (Prickett *et al.* 2009), adenocarcinoma de pulmón (Ding *et al.* 2008) y meduloblastoma (Gilbertson *et al.* 2001). Curiosamente, en cáncer de mama, la expresión de HER4 está asociada a una reducción de la proliferación celular y se correlaciona con buen pronóstico (Barros *et al.* 2010).

#### **1.6.4. Ligandos de la familia de EGF**

La sobreproducción de ligandos es uno de los mecanismos por los que los tumores activan de manera aberrante los receptores ERBB. La fuente de estos ligandos puede ser las propias células tumorales o las células del estroma. Por ejemplo, se ha observado una co-sobreexpresión de TGF $\alpha$  y EGFR en carcinomas de pulmón, colorrectal, de ovario, y de cabeza y cuello escamosos, que se asocia con un mal pronóstico de los pacientes (Rubin Grandis *et al.* 1998, Yarden y Sliwkowski 2001).

Por otro lado, además de la sobreexpresión, el tráfico incorrecto o la señalización “extracrina” (a través de exosomas dirigidos al receptor) por parte de los ligandos de receptores ERBB podrían contribuir a la transformación de células epiteliales (Singh y Coffey 2014). Como ejemplo, se ha observado que el tráfico alterado de EREG a la superficie de células apicales conduce a una mayor fosforilación por EGFR, lo que conlleva mayor proliferación y capacidad invasiva de los tumores (Singh *et al.* 2013).

Otros roles de los ligandos de receptores ERBB están relacionados con la sensibilidad a tratamientos. Se ha descrito un *loop* autocrino en células de cáncer de ovario que sobreexpresan NRG1 y HER3, donde el bloqueo del receptor con anticuerpos inhibió el crecimiento de los tumores (Sheng *et al.* 2010). Un *loop* similar entre NRG1 y HER3 se ha observado también en células de cáncer de cabeza y cuello sin amplificación de HER2, las cuales son particularmente sensibles a la inhibición de EGFR/HER2 con lapatinib (Wilson *et al.* 2011). Finalmente, se han encontrado altos niveles de NRG1 y HER4 en células tumorales residuales de NSCLC que permanecieron tras el tratamiento con quimioterapia. En estos casos, la

inhibición de la señalización a través de HER3/HER4 con un anticuerpo bloqueante de NRG1 incrementó la magnitud y duración de la respuesta en modelos *in vivo* (Hegde *et al.* 2013).

#### **1.6.5. Componentes “aguas abajo” de los receptores ERBB**

Además de las alteraciones oncogénicas en los receptores ERBB y en sus ligandos, también se ha observado persistencia o reactivación de las vías de señalización activadas por estos receptores, ya sea por amplificación de otros RTKs alternativos, como por mutaciones en moléculas de la vía. Por ejemplo, es frecuente la aparición de mutaciones activadoras de PI3K o mutaciones que causan la pérdida de función de PTEN (*phosphatase and tensin homolog*; fosfatasa homóloga a la tensina), una molécula que regula negativamente la vía de PI3K/AKT. Este tipo de mutaciones suelen estar relacionadas con la aparición de resistencias a terapias anti-ERBB (Brunner-Kubath *et al.* 2011, Arteaga y Engelman 2014).

### **1.7. Terapias dirigidas contra receptores ERBB**

La familia ERBB se ha convertido en una diana terapéutica muy importante en oncología, donde los tratamientos dirigidos contra estos receptores han demostrado ser una estrategia poderosa a la hora de manejar distintos tipos de cáncer, mejorando tanto el pronóstico como la calidad de vida de los pacientes (Cai *et al.* 2010). Actualmente, existe un número bastante amplio de medicamentos diseñados contra los receptores de esta familia, que se resumen en la tabla 1.

La mayoría de estos fármacos pertenecen a dos categorías: anticuerpos monoclonales (mAb, *monoclonal antibody*) y moléculas pequeñas inhibidoras de la actividad tirosina quinasa (TKI, *tyrosine kinase inhibitor*). Una tercera categoría que deriva de los anticuerpos monoclonales son los anticuerpos conjugados a fármacos (ADC, *antibody-drug conjugate*), sobre los que se profundizará en la sección 2.

**Tabla 1. Medicamentos aprobados por la FDA contra receptores ERBB.**

Nombre genérico	Nombre comercial	Diana	Clase	Uso
Gefitinib	Iressa	EGFR	TKI reversible	NSCLC
Erlotinib	Tarceva	EGFR	TKI reversible	NSCLC metastásico con delección del exón 19 de EGFR o mutación L858R Cáncer de páncreas metastásico/localmente avanzado o no extirpable
Lapatinib	Tykerb	EGFR/ HER2	TKI reversible	Cáncer de mama HER2+ metastásico
Neratinib	Nerlynx	EGFR/ HER2	TKI irreversible	Cáncer de mama HER2+
Osimertinib	Tagrisso	EGFR	TKI	NSCLC con mutación T790M en EGFR
Vandetanib	Caprelsa	EGFR	TKI	Cáncer de tiroides metastásico/localmente avanzado o no extirpable
Necitumumab	Portrazza	EGFR	mAb	NSCLC escamoso metastásico
Cetuximab	Erbitux	EGFR	mAb	Carcinoma de cabeza y cuello escamoso Cáncer colorrectal EGFR+ sin mutación en K-Ras
Panitumumab	Vectibix	EGFR	mAb	Cáncer colorrectal metastásico
Trastuzumab	Herceptin	HER2	mAb	Cáncer de mama HER2+
Pertuzumab	Perjeta	HER2	mAb	Cáncer de mama HER2+ metastásico
Trastuzumab emtansina	Kadcyla	HER2	ADC	Cáncer de mama HER2+ metastásico

### 1.7.1 Anticuerpos monoclonales

Son anticuerpos dirigidos contra epítomos presentes en el ectodominio de los receptores ERBB. Desde hace décadas, el uso de anticuerpos ha posibilitado el estudio de estos receptores, permitiendo ahondar en su mecanismo de acción. A principios de los años 80, se comenzaron a desarrollar anticuerpos dirigidos contra el ectodominio de EGFR, algunos de los cuales demostraron capacidad de alterar la actividad del receptor, bien estimulándola o inhibiéndola (Kawamoto *et*

al. 1983). En esta misma década, investigadores de la empresa *Genentech* generaron una serie de anticuerpos contra el dominio extracelular del receptor HER2, con el objetivo de bloquear su activación, dado el papel que esta proteína desempeña en varios tipos de cáncer, como el cáncer de mama (Gullick 1990).

Se ha avanzado mucho desde los primeros anticuerpos monoclonales, con moléculas terapéuticas cada vez más sofisticadas.

Los mecanismos a través de los cuales los mAbs pueden desarrollar su acción antitumoral incluyen:

- Bloqueo de la activación de los receptores debido a (i) la estabilización de la conformación cerrada del dominio extracelular del receptor, impidiendo de esta forma tanto la unión del ligando como la dimerización de receptores; (ii) el bloqueo directo de la unión del ligando al receptor; o (iii) el bloqueo de la dimerización de receptores.
- Parada del ciclo celular. Se ha visto que el tratamiento con trastuzumab induce la parada de las células tratadas en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, al reducir la expresión de proteínas secuestradoras de P27KIP1 (Lane *et al.* 2000), un inhibidor de ciclinas dependientes de quinasas. De manera similar, cetuximab también provoca esta parada en la fase G<sub>1</sub> mediante el aumento de P27KIP1 (Wu *et al.* 1996).
- Inducción de apoptosis. Cetuximab provoca la inactivación de proteínas antiapoptóticas, como BCL2 (*B-cell lymphoma-2*; linfoma 2 de células B), y favorece la expresión de proteínas proapoptóticas, como BAX (*BCL2 associated protein X*; proteína X asociada a BCL2) y caspasa 3, caspasa 8 o caspasa 9 (Grunwald y Hidalgo 2003).
- Estimulación de la acción del sistema inmune sobre las células tumorales por mecanismos de ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos).
- Inhibición de la angiogénesis.

### **1.7.2. Inhibidores de la actividad tirosina quinasa**

Estos inhibidores son pequeñas moléculas sintéticas que cruzan la membrana celular y son capaces de competir con el ATP por su sitio de unión en el dominio intracelular de los receptores ERBB (Levitzki y Gazit 1995). De esta forma, causan la inhibición de su actividad tirosina quinasa, reprimiendo las señales que inician las rutas intracelulares que controlan los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Anderson y Ahmad 2002, Fry 2003). Existen inhibidores de quinasa altamente específicos y otros con baja especificidad de diana, capaces de inhibir simultáneamente a receptores ERBB y quinasa de otras familias.

Los TKIs que actúan específicamente sobre receptores ERBB son derivados de la quinazolina y se unen al bolsillo de unión a ATP en el dominio quinasa (Denny 2001, Fry 2003). Estos fármacos pueden ser reversibles e irreversibles.

Es necesario mencionar que aunque los resultados con las terapias dirigidas son prometedores y han mejorado sustancialmente el pronóstico de los pacientes con distintos tipos de cáncer, aún es necesario ahondar en el conocimiento y desarrollo de estas terapias, dado que con mucha frecuencia los pacientes no responden a los tratamientos (resistencia primaria) o, tras una respuesta inicial, dejan de ser efectivos (resistencia adquirida). Los mecanismos por los cuales estos agentes terapéuticos ejercen su actividad, así como las múltiples vías que conducen a la aparición de resistencias a las terapias dirigidas aún no están completamente definidos.



## 2. ANTICUERPOS CONJUGADOS A FÁRMACOS (ADCs)

### 2.1. Panorama clínico

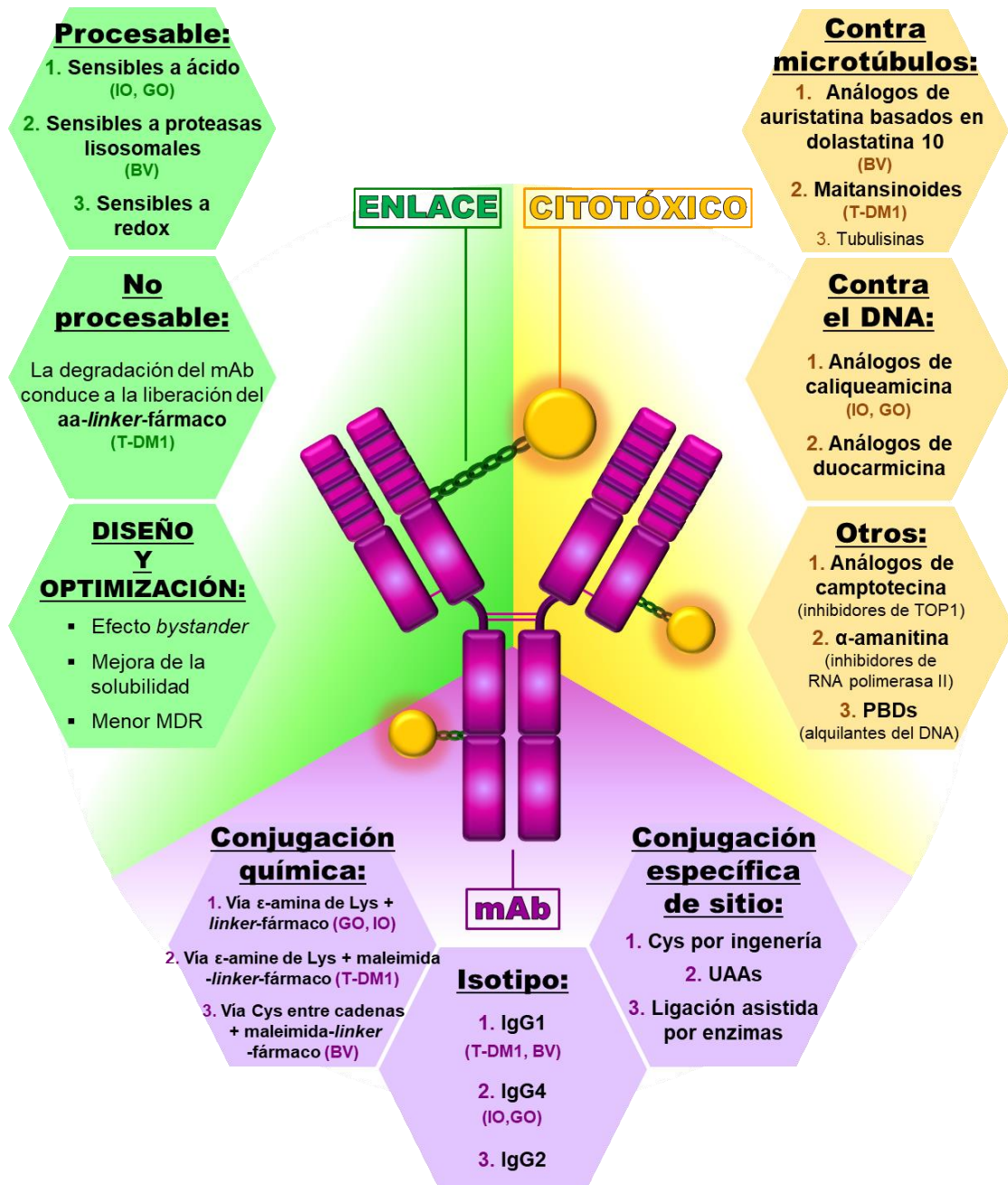
Una de las estrategias que más éxito está teniendo dentro de las terapias dirigidas es el uso de anticuerpos conjugados a fármacos (ADCs). Esta clase de terapéuticos oncológicos ha emergido gracias a su habilidad para conducir agentes citotóxicos muy potentes de manera específica a las células tumorales diana (Vezina *et al.* 2017). Un ADC está formado por un anticuerpo monoclonal (mAb) recombinante que se encuentra covalentemente unido a un compuesto citotóxico (quimioterápico o toxina), a través de un enlace o *linker* sintético. Para ejercer su acción antitumoral, un ADC tiene que alcanzar y unirse a una célula que exprese el antígeno reconocido por el mAb. A continuación, requiere la internalización y el procesamiento lisosomal para liberar el fármaco, que difunde a través de la membrana del lisosoma para acceder a su diana molecular, induciendo en última instancia la muerte celular.

Por el momento existen solamente cuatro ADCs aprobados para su uso comercial, aunque actualmente hay más de 60 en ensayos clínicos (Beck *et al.* 2017). En 2011, la FDA aprobó Adcetris® (brentuximab vedotina, BV), desarrollado por *Seattle genetic*, para el tratamiento del linfoma de Hodgkin, tras fallo de trasplante autólogo de células troncales, y para el linfoma anaplásico de células grandes, tras fallo de quimioterapia con múltiples agentes (Senter y Sievers 2012). Este compuesto está dirigido contra CD30 y contiene el derivado de auristatina MMAE, unido mediante un enlace procesable por proteasas. En 2013, Kadcyra® (trastuzumab-emtansina, T-DM1), desarrollado por *Genentech*, consiguió la aprobación de la FDA para el tratamiento del cáncer de mama HER2+ metastásico (Amiri-Kordestani *et al.* 2014). T-DM1 combina el anticuerpo humanizado contra HER2, trastuzumab, con un potente agente antimicrotúbulos, el derivado de la maintansina DM1, (Lambert y Chari 2014). En 2017, dos ADCs más han recibido la aprobación de la FDA; ambos fueron desarrollados por *Pfizer* e incluyen un agente

citotóxico de la familia de las caliqueamicinas. Besponsa<sup>®</sup> (inotuzumab ozogamicina, IO) está dirigido contra CD22 y se desarrolló para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda recurrente o refractaria (Kantarjian *et al.* 2016). Mylotarg<sup>®</sup> (gemtuzumab ozogamicina, GO) está dirigido contra CD33 y se aprobó para el tratamiento de leucemia mieloide aguda positiva para CD33 en pacientes adultos con enfermedad recién diagnosticada y en pacientes de dos años o más cuya enfermedad no mejoró con otros tratamientos o recidivó. Cabe destacar que Mylotarg<sup>®</sup> recibió originalmente la aprobación acelerada por la FDA en mayo de 2000, pero se retiró voluntariamente del mercado después de que los ensayos fallasen a la hora de demostrar beneficio clínico y de que presentase problemas de toxicidad. La aprobación actual incluye una dosis recomendada más baja, diferente régimen de administración y un grupo de pacientes distinto (Appelbaum y Bernstein 2017, Guest *et al.* 2017).

## 2.2. Componentes de un ADC

Los ADCs son medicamentos complejos en los que cada paso necesario para ejercer su función resulta un desafío, desde la estabilidad en la circulación plasmática hasta la correcta liberación del agente citotóxico. Por ello, el diseño adecuado de los tres componentes que conforman un ADC resulta crucial para su éxito en clínica (Figura 3). Por este motivo, se está poniendo mucho esfuerzo en el desarrollo de ADCs de próxima generación, con estrategias encaminadas a seleccionar los mejores antígenos, fármacos citotóxicos adecuados, *linkers* optimizados, nuevas químicas de conjugación y soluciones a posibles problemas de toxicidad (Beck *et al.* 2017).



**Figura 3. Estrategias disponibles para el diseño y desarrollo de ADCs.** Existen dos clases de *linkers* (en verde), procesables y no procesables, que se pueden optimizar para mejorar la estabilidad y solubilidad de los ADCs, influir en el efecto *bystander* o evitar la multirresistencia a fármacos. Los grupos principales de citotóxicos (en amarillo) están dirigidos contra el DNA o los microtúbulos, aunque otros pueden inhibir enzimas. Los mAbs (en morado) se basan en tres isotipos, que se pueden conjugar al *linker*-fármaco mediante enlaces tiosuccinimida entre residuos de aminoácidos (conjugación química), o mediante conjugación específica de sitio. Esta última se puede conseguir por (i) inserción de cisteínas adicionales, (ii) inserción de aminoácidos no naturales (UAAs, *unnatural amino acids*) y (iii) ligación asistida por enzimas. Cada sección de la figura muestra ejemplos de ADCs comerciales que utilizan las distintas opciones de componentes.

### 2.2.1. *Anticuerpo monoclonal*

#### 2.2.1.1. *Selección de la diana molecular*

Los anticuerpos monoclonales representan el esqueleto de los ADCs y deben reconocer específicamente el antígeno diana, que es, por lo general, una proteína accesible de la superficie celular. Estos antígenos idealmente se tienen que expresar de manera selectiva en las células cancerígenas o bien estar sobreexpresados en dichas células con respecto a las células normales. Por otro lado, para prevenir la unión del ADC al antígeno en la circulación, la secreción y el procesamiento del mismo deben ser mínimos (Shefet-Carasso y Benhar 2015). Adicionalmente, los antígenos deberían ser susceptibles de internalizarse para que, una vez unido, el ADC sea transportado al interior de la célula, donde el agente citotóxico ejercerá su acción antitumoral (Damelin *et al.* 2015).

#### 2.2.1.2. *Isotipos*

Los mAbs por sí solos pueden ejercer acciones antitumorales ya sea de manera directa, por ejemplo disminuyendo las señales mitogénicas que emanan de sus dianas, o de manera indirecta, atrayendo componentes del sistema inmune hacia el tumor. Por ello, los mAbs “desnudos” se usan a veces como agentes para el tratamiento del cáncer; un claro ejemplo es trastuzumab en cáncer de mama HER2+ (Sliwkowski *et al.* 1999, Taylor *et al.* 2007). Sin embargo, la validación de la actividad de los mAb no es un requerimiento para el desarrollo de un ADC activo. Una cuestión interesante es si la acción antitumoral del mAb mediada por el sistema inmune se mantiene cuando éste es conjugado al citotóxico. Por ejemplo, en el caso de T-DM1, la ADCC, característica de trastuzumab, se mantiene en el ADC (Junttila *et al.* 2011). La selección del isotipo del mAb podría influir en este aspecto. La mayoría de los mAbs usados en ADCs se seleccionan a partir de tres isotipos de IgG humanos: IgG1, IgG2 e IgG4. IgG1 normalmente apoya la ADCC, mientras que IgG2 e IgG4 generalmente son ineficientes o limitados en esta función (Wang *et al.* 2017).

### 2.2.1.3. *Química de conjugación*

El método de conjugación del citotóxico y del *linker* al mAb tiene un papel crítico en la agregación, capacidad de unión, eliminación de la circulación, potencia y tolerabilidad de los ADCs. En la mayoría de los ADCs que están actualmente aprobados o bajo evaluación clínica, la química de conjugación se basa en enlaces tiosuccinimida, formados mediante la reacción de tioles y alquilmaleimidias (Beck *et al.* 2017). El complejo fármaco-*linker* se puede unir al mAb a través de (i) la cadena lateral de lisinas aleatorias, (ii) lisinas de superficie modificadas con un grupo maleimido reactivo, o (iii) cisteínas libres generadas a partir de la reducción parcial de puentes disulfuro existentes. Este tipo de química conduce a mezclas heterogéneas de ADCs, con diferentes sitios de conjugación y una variedad de ratios fármaco-anticuerpo (DAR, *drug-antibody ratio*) (Lyon *et al.* 2014).

Una estrategia alternativa es la conjugación específica de sitio, que se puede alcanzar mediante (i) la inserción por ingeniería genética de residuos adicionales de cisteínas en diferentes sitios del anticuerpo, (ii) la inserción de aminoácidos no naturales (UAA, *unnatural aminoacids*) codificados genéticamente, y (iii) la ligación asistida por enzimas, como enzimas generadoras de formilglicina, transglutaminasas o sortasas (Tsuchikama y An 2016).

### 2.2.2. *Agente citotóxico*

Los agentes citotóxicos usados con más frecuencia en ADCs son compuestos que dañan el DNA o compuestos antimitóticos (Beck *et al.* 2017). El primer grupo comprende análogos de caliqueamicina (usados en GO (Appelbaum y Bernstein 2017) e IO (Kantarjian *et al.* 2016)) y análogos de duocarmicina (van der Lee *et al.* 2015). El segundo, análogos de auristatina basados en dolastatina 10 (usados en BV (Senter y Sievers 2012)), maitansinoides (usados en T-DM1 (Amiri-Kordestani *et al.* 2014)) y tubulisinas (Li *et al.* 2016). Otros fármacos usados en ADCs que se encuentran en fase clínica son inhibidores de la DNA topoisomerasa I (como análogos de camptotecina (Nakada *et al.* 2016)), agentes alquilantes del DNA

(como pirrolobenzodiazepinas (PBD, *pyrrolobenzodiazepine*) (Mantaj *et al.* 2017)) e inhibidores de la RNA polimerasa II (como  $\alpha$ -amanitina (Liu *et al.* 2015)).

Estos fármacos están optimizados para una alta citotoxicidad, de modo que puedan destruir las células del tumor a la concentración intracelular alcanzada tras la liberación del ADC. Esta concentración es frecuentemente baja debido al limitado número de antígenos en la superficie de la célula tumoral, el bajo DAR (alrededor de 3,5-4) de los ADCs disponibles actualmente, la internalización ineficiente de ciertos antígenos y la dificultad para penetrar en los tejidos de los tumores sólidos. Estas son probablemente las razones que condujeron al fallo de los primeros ADCs que incorporaban fármacos convencionales (mucho menos tóxicos), como taxanos o antracilinas (Chari 1998).

### 2.2.3. *Enlace o linker*

El tercer componente de los ADCs es el enlace o *linker* usado para unir el fármaco al anticuerpo. El *linker* debe tener una alta estabilidad en la circulación sanguínea, dado que la unión inestable podría conducir a la liberación del citotóxico en el torrente sanguíneo, causando un alto grado de toxicidad y una disminución en la eficacia (Thomas *et al.* 2016). Aun así, este enlace debe permitir la liberación eficiente del fármaco una vez que el ADC es internalizado. Existen dos clases principales de *linker* usados actualmente en la clínica: procesables y no procesables.

Los **enlaces procesables** se pueden romper química o enzimáticamente. Esta clase de enlaces suelta las toxinas de forma más eficiente que los no procesables, pero la ruptura no específica y la liberación del fármaco en la circulación son también mayores (DeVay *et al.* 2017). Dentro de esta primera clase de *linkers* existen tres tipos de mecanismos de liberación: (i) sensibles a ácido, como los enlaces hidrazina, que se procesan en el lisosoma como resultado del bajo pH (Nolting 2013); (ii) sensibles a proteasas lisosomales, como los enlaces peptídicos valina-alanina y valina-citrulina, que se procesan en el lisosoma por la actividad de la catepsina B (Dubowchik *et al.* 2002, Doronina *et al.* 2006); y (iii)

sensibles a reacciones redox, como los enlaces basados en puentes disulfuro, que se reducen como consecuencia del glutatión intracelular (Erickson *et al.* 2010).

Por otro lado, los **enlaces no procesables** son muy estables en la circulación y dentro de la célula, ya que dependen de la degradación proteolítica completa de la parte del mAb en el lisosoma, tras la internalización del ADC. El catabolito activo liberado incluye el fármaco unido al *linker*, que permanece adherido a un residuo de un aminoácido del mAb (Erickson *et al.* 2006). Ejemplos de enlaces no procesables incluyen el *linker* tioéter usado en T-DM1 (Lewis Phillips *et al.* 2008) o el ácido maleimidocaproico unido a monometil auristatina F (mc-MMAF), usado en algunos ADCs bajo evaluación clínica, como depatuxizumab mafodotina (Phillips *et al.* 2016).

La figura 3 muestra las distintas opciones disponibles actualmente para el desarrollo de ADCs.

## 2.3. Ado-trastuzumab emtansina o T-DM1

### 2.3.1. Desarrollo y resultados clínicos

Ado-trastuzumab emtansina o T-DM1 es un ADC formado por trastuzumab unido a un derivado de la maintansina a través de un enlace covalente no procesable (Lewis Phillips *et al.* 2008, Amiri-Kordestani *et al.* 2014). Los maitansinoides son agentes antimicrotúbulos muy potentes que se unen a tubulina  $\beta$ , impidiendo su polimerización (Cassady *et al.* 2004). El trastuzumab, por su parte, es un anticuerpo monoclonal humanizado diseñado contra HER2.

T-DM1 alcanzó la clínica en segunda y tercera línea de tratamiento de pacientes con cáncer de mama HER2+ metastásico, tras mostrar un incremento en la supervivencia global (Verma *et al.* 2012, Krop *et al.* 2017). Sin embargo, en primera línea de tratamiento, este compuesto no mejoró la eficacia de pertuzumab combinado con trastuzumab y quimioterapia (Perez *et al.* 2017).



El hecho de que HER2 se sobreexpresa en ciertos tumores confiere selectividad a T-DM1, restringiendo la toxicidad en otros tejidos. No se han detectado problemas graves de toxicidad a excepción de cierta trombocitopenia, producida por la internalización del compuesto en precursores de plaquetas (Amiri-Kordestani *et al.* 2014).

### 2.3.2. *Mecanismo de acción*

Para producir su efecto antitumoral, T-DM1 tiene que alcanzar el tumor en condiciones estables. En este contexto, para evitar la liberación inadecuada del agente citotóxico, se evaluaron diferentes tipos de enlaces hasta que se consiguió optimizar la estabilidad de los compuestos trastuzumab-DM1 (Lewis Phillips *et al.* 2008). El resultado final fue trastuzumab-MCC-DM1, en el que anticuerpo y una media de 3,5 moléculas de DM1 se mantienen unidos a través de enlaces tioéter no reducibles, y que presentó un adecuado perfil fármaco-cinético (Lambert y Chari 2014). Una vez que alcanza la masa tumoral, T-DM1 se une a HER2 en la superficie de las células cancerígenas, lo que desencadena la entrada de los complejos ADC-antígeno al interior de la célula por un proceso de endocitosis mediada por receptor (Barok *et al.* 2014). Dado que el *linker* es estable tanto en la circulación como en el microambiente tumoral, la liberación del agente citotóxico solo ocurre tras la degradación proteolítica completa del anticuerpo dentro del lisosoma (Lewis Phillips *et al.* 2008). Tras salir de este orgánulo hacia el citosol, los catabolitos de DM1 inhiben el ensamblaje de microtúbulos, causando en última instancia la muerte celular.

La unión de DM1 a trastuzumab no altera la capacidad de unión del anticuerpo a HER2 (Junttila *et al.* 2011), por lo que los efectos antitumorales intrínsecos del anticuerpo se mantienen en el ADC. Como consecuencia, el mecanismo de acción de T-DM1 se basa en efectos antitumorales relacionados con trastuzumab y en otros relacionados con DM1.

Tanto trastuzumab como T-DM1 inhiben la señalización a través de HER2, inducen la parada del ciclo celular y median la ADCC (Junttila *et al.* 2011). Por su



parte, la actividad antitumoral de DM1 incluye al menos cuatro mecanismos moleculares (Barok *et al.* 2014): (i) disrupción de la red de microtúbulos, lo que causa una parada del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M; (ii) catástrofe mitótica, caracterizada por la presencia de estructuras gigantes multinucleadas (Barok *et al.* 2011, Montero *et al.* 2015); (iii) disrupción de la red de microtúbulos que media el tráfico intracelular; y (iv) muerte celular por apoptosis, de manera dependiente de la concentración intracelular de DM1.

### 2.3.3. *Mecanismos de resistencia*

#### 2.3.3.1. *Unión de T-DM1 a HER2*

T-DM1 es un medicamento dirigido contra HER2, por lo que una disminución en los niveles del antígeno reconocido por el mAb podría resultar en resistencia. Existen varios estudios preclínicos en modelos celulares de resistencia a T-DM1, o ADCs estructuralmente similares, en los que las células mostraron una marcada disminución de los niveles proteicos de HER2, aunque otras líneas celulares resistentes no mostraron este efecto (Loganzo *et al.* 2015).

Otra posibilidad es que los niveles de HER2 se mantengan pero el antígeno se encuentre enmascarado por componentes de la matriz extracelular, como mucina y hialuronano (Nagy *et al.* 2005), o bien presente truncación del ectodominio (Scaltriti *et al.* 2007). Ambas circunstancias se han descrito como mecanismos de resistencia a trastuzumab y también podrían tener un papel potencial en la adquisición de resistencia a T-DM1. Sin embargo, estos mecanismos aún no se han reportado en modelos preclínicos.

#### 2.3.3.2. *Expresión de neuregulina*

Varios estudios han sugerido que la presencia de ciertos ligandos como NRG, que se une a HER3 y HER4, puede dificultar la eficacia de T-DM1 (Phillips *et al.* 2014). La NRG se expresa ampliamente en tumores de mama y se asocia a un incremento en la proliferación de las células cancerígenas (de Alava *et al.* 2007, Ocana *et al.* 2013). Dentro de este grupo de experimentos, se observó que el

bloqueo del brazo de dimerización de HER2 con pertuzumab incrementaba el efecto de T-DM1. Sin embargo, aunque parece claro en modelos preclínicos, los ensayos de combinación de T-DM1 con pertuzumab en pacientes no han demostrado superioridad al compararlos con pertuzumab, docetaxel y trastuzumab (Perez *et al.* 2017).

#### 2.3.3.3. Defectos en las rutas de internalización y tráfico intracelular

La eficacia de un ADC está muy ligada a la internalización del anticuerpo dentro de la célula. La endocitosis puede ocurrir por diferentes rutas de internalización, como la CME, la mediada por caveolina-1 (CAV1) y la independiente de clatrina y caveolina, aunque la CME se considera la principal ruta adoptada por varios ADCs (Kalim *et al.* 2017). Recientemente se ha descrito un modelo preclínico de resistencia a T-DM1 en el que la internalización del ADC se produce a través de CAV1 (Sung *et al.* 2017). La colocalización de T-DM1 dentro de CAV1 se correlacionó con una disminución de la respuesta al fármaco en un panel de líneas celulares HER2+, sugiriendo que la endocitosis de T-DM1 mediada por caveolina podría predecir respuesta.

#### 2.3.3.4. Defectos en el procesamiento lisosomal

Para liberar la carga citotóxica, T-DM1 necesita ser procesado dentro de los lisosomas, de tal modo que el mAb se degrade por completo, generando como catabolito activo Lys-MCC-DM1 (DM1 unido al *linker* y adherido a un residuo de lisina del anticuerpo). El capítulo I de este trabajo describe, por primera vez, un mecanismo de resistencia a T-DM1 ligado a un defecto en la actividad proteolítica de los lisosomas (Rios-Luci *et al.* 2017).

Las membranas lisosomales son bastante impermeables a los catabolitos liberados tras el procesamiento de ADCs con enlaces no procesables, como Lys-MCC-DM1. Por ello, precisan de su transporte desde el lumen del lisosoma al citoplasma. Recientemente se ha descrito la proteína de membrana lisosomal SLC46A3 como un transportador de este tipo de compuestos, cuyo silenciamiento genético fue capaz de inhibir la potencia de T-DM1 (Hamblett *et al.* 2015).

### 2.3.3.5. Bombas de expulsión de fármacos y alteraciones en la tubulina- $\beta$

Un mecanismo muy frecuente de resistencia a quimioterapia es la eliminación de los fármacos del citoplasma por transportadores del casete de unión a ATP (ABC, *ATP-binding cassette transporter*) (Yu *et al.* 2013). Los maitansinoides son también sustratos de algunos de estos transportadores, como PgP/MDR1 (*P-glycoprotein 1/multidrug resistance protein 1*), por lo que la resistencia a T-DM1 podría estar ligada a este proceso (Lambert y Chari 2014). Se ha observado sobreexpresión de ABCC2 y ABCG2 en modelos celulares de cáncer gástrico HER2+ resistentes a T-DM1, en los que la inhibición de dichos transportadores restauró la sensibilidad (Takegawa *et al.* 2017). En otros modelos preclínicos de resistencia a T-DM1, se observó inducción funcional de MRP1, cuya inhibición también dio como resultado la restauración de la sensibilidad (Loganzo *et al.* 2015).

Por otro lado, no existen datos de modelos de resistencia a T-DM1 en los que mutaciones en tubulina  $\beta$  hayan demostrado mediar la resistencia, pero podría ser un mecanismo potencial.

### 2.3.3.6. Papel de ciclina B1

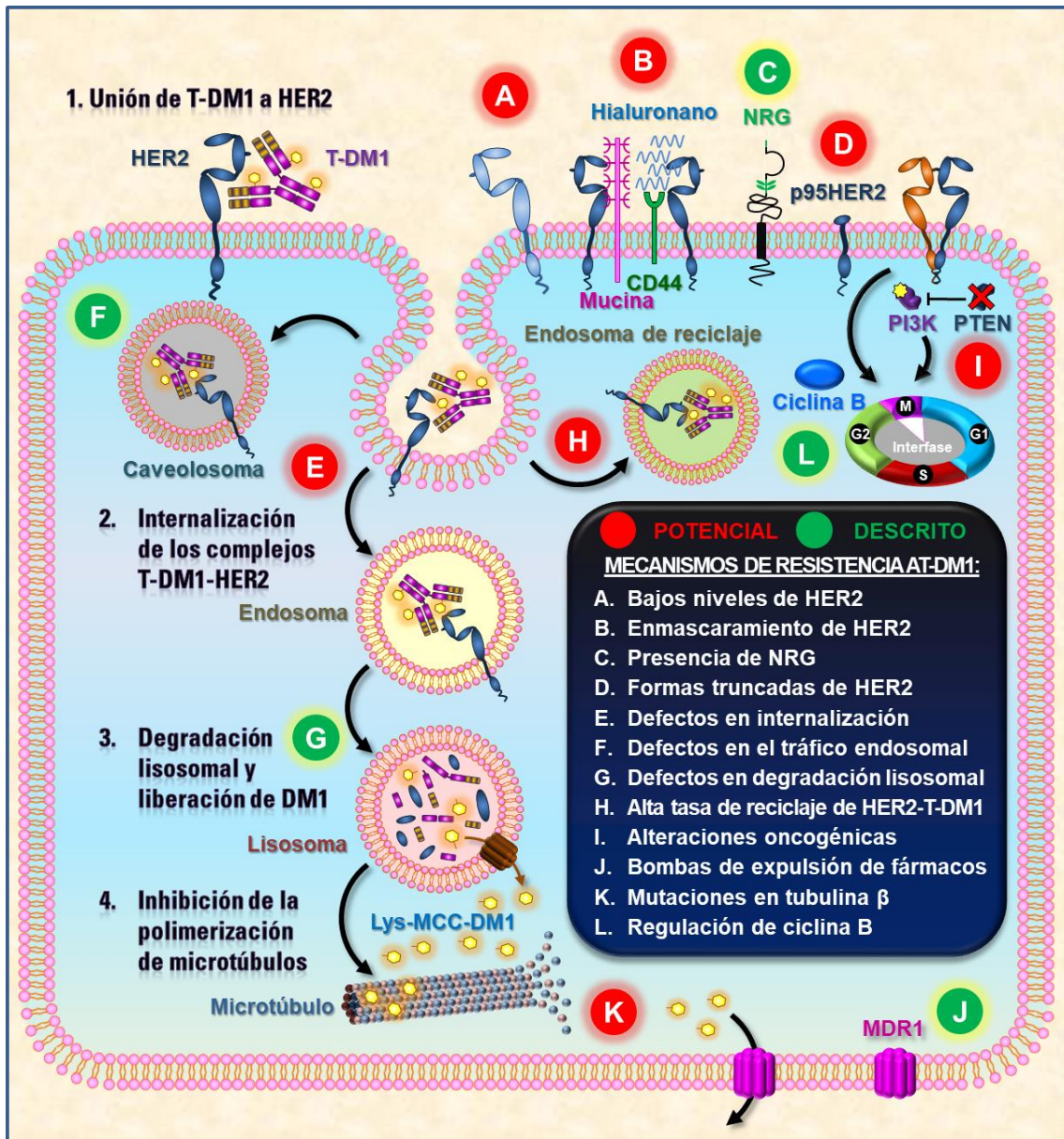
Otro mecanismo de resistencia a T-DM1 propuesto recientemente está relacionado con el efecto del ADC sobre ciclina B1, una proteína del ciclo celular que participa en la transición G<sub>2</sub>/M. En células de cáncer de mama HER2+ sensibles a T-DM1, el fármaco provocó un incremento en ciclina B1, que no se observó en células resistentes a T-DM1 (Sabbaghi *et al.* 2017). Además, el silenciamiento de ciclina B1 dio como resultado resistencia al medicamento. Es interesante también que en una cohorte de 18 explantes de cáncer de mama HER2+, el efecto de T-DM1 fue paralelo a los niveles de ciclina B1. Estos descubrimientos son clínicamente relevantes, dado que la inducción por ciclina B podría ser usada como biomarcador de sensibilidad a T-DM1.

### 2.3.3.7. Adquisición de alteraciones moleculares

30

La activación de rutas de señalización “aguas abajo” de HER2 debida a mutaciones en *PIK3CA* o deleciones en *PTEN* representa un mecanismo de resistencia conocido a trastuzumab (Berns *et al.* 2007). En el caso de T-DM1, no se ha descrito que alteraciones moleculares que conlleven la activación de estas vías medie la resistencia al fármaco. Sin embargo, actualmente hay un estudio clínico que está explorando la seguridad y la eficacia de la combinación de T-DM1 con inhibidores de PI3K (ClinicalTrials.gov identificador: NCT02038010).

La figura 4 muestra un resumen del mecanismo de acción de T-DM1 y los mecanismos de resistencia, potenciales y descritos, que pueden surgir.



**Figura 4. Entrada, procesamiento de T-DM1 y mecanismos de resistencia.** T-DM1 se une a HER2 en la membrana plasmática (1); a continuación, los complejos HER2-T-DM1 entran en la célula por un proceso de endocitosis mediada por receptor (2); los complejos internalizados se encuentran contenidos inicialmente dentro de vesículas endocíticas que se fusionan hasta convertirse en endosomas tempranos que finalmente maduran a lisosomas (3). Las proteasas ácidas procesan la parte del anticuerpo de T-DM1 para liberar Lys-MCC-DM1, que puede ser entonces transportado desde el lumen del lisosoma al citosol. Lys-MCC-DM1 intracelular inhibe la polimerización de microtúbulos (4), lo que conduce a una parada en mitosis y, en última instancia, muerte celular. Las letras dentro de los círculos indican los mecanismos de resistencia a T-DM1 potenciales (rojo) o ya descritos en la literatura (verde).

### 3. CÁNCER DE MAMA

#### 3.1. Epidemiología

El cáncer de mama es el más frecuente en las mujeres españolas y supone un 29% de todos los cánceres. En España, en 2015 se diagnosticaron 27.747 casos de cáncer de mama (García-Saenz *et al.* 2015). Aunque la mortalidad por este tipo de cáncer ha descendido en los últimos años gracias a la detección temprana y a la mejora de los tratamientos, el cáncer de mama sigue siendo la primera causa de muerte por cáncer en España en las mujeres. Según la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), en 2012 fallecieron 6.075 mujeres por esta enfermedad. La edad más frecuente de incidencia está por encima de los 50 años, pero aproximadamente un 10% se diagnostica en mujeres menores de 40 años. La media de supervivencia a 5 años para pacientes con cáncer de mama es del 90%, incrementándose al 99% cuando el cáncer está localizado; por el contrario, si el cáncer se ha diseminado a partes distantes del cuerpo, la tasa de supervivencia se reduce al 26% (García-Saenz *et al.* 2015).

#### 3.2. Clasificación

El cáncer de mama es una enfermedad tremendamente heterogénea en cuanto a alteraciones moleculares, sensibilidad al tratamiento y composición celular. Es por ello que se están realizando grandes esfuerzos encaminados a descifrar el perfil molecular de esta enfermedad, permitiendo así el diagnóstico temprano y el tratamiento eficaz del cáncer de mama (Perou *et al.* 2000, Dai *et al.* 2005).

##### 3.2.1 *Clasificación según el perfil molecular*

Los perfiles de expresión génica utilizados en el análisis de los tumores de mama han permitido identificar marcas génicas asociadas con diferentes parámetros clínicos, dando lugar a la clasificación de dichos tumores en cinco



subtipos: Luminal A, Luminal B, HER2-positivo, *basal-like* y *normal breast-like* (Prat y Perou 2011). Cada subtipo presenta características histopatológicas, moleculares y clínicas propias, por lo que se requieren diferentes tratamientos (De Laurentiis *et al.* 2010).

#### 3.2.1.1. Luminal A y B

Se caracterizan por la expresión de receptores hormonales, que incluyen al receptor de estrógenos (ER, *estrogen receptor*) y de progesterona (PR, *progesterone receptor*). El subtipo luminal A expresa niveles elevados del ER y se asocia relativamente a un mejor pronóstico (Sorlie *et al.* 2006). El subtipo luminal B presenta un fenotipo más agresivo y un mayor grado histológico (Perou *et al.* 2000). Además de los dos receptores hormonales citados, estos tumores también expresan EGFR, HER2 y ciclina E1 (Sorlie *et al.* 2001).

#### 3.2.1.2. HER2+

Se caracterizan por la sobreexpresión de HER2, descrita por primera vez en carcinoma de mama humano en los años 80 (King *et al.* 1985). Además, suelen ser negativos para receptores hormonales y presentan grados histológicos más bajos. Pueden tener también mutaciones en P53. Estos tumores tienen un pronóstico relativamente pobre y las pacientes son propensas a sufrir recaídas frecuentes y tempranas, y metástasis distantes (Reddy 2011). Entre el 15 y 20% de los cánceres de mama invasivos son HER2 positivos. La amplificación del gen y la consecuente sobreexpresión de HER2 ocurren durante el estadio *in situ* del desarrollo del tumor. Por lo tanto, HER2 generalmente se encuentra sobreexpresado en el tumor primario y en la metástasis.

#### 3.2.1.3. Basal-like

La denominación de carcinoma *basal-like* se debe a que las células neoplásicas de este subtipo expresan genes que normalmente se expresan en células mioepiteliales o normales-basales de la mama (Lakhani y O'Hare 2001, Jones *et al.* 2004). Representan el 15% de todos los cánceres de mama, con una

mayor frecuencia en mujeres premenopáusicas (Carey *et al.* 2006), y se caracterizan principalmente por la pérdida de expresión de los receptores hormonales, así como de HER2, y por la expresión de citoqueratinas CK5/CK6 y EGFR (Rakha *et al.* 2008). Además presenta mutaciones en P53 en más del 85% de los casos y es muy común en portadores de mutaciones en el gen *BRCA1* (*breast cancer 1*; cáncer de mama 1). Morfológicamente, se caracterizan por un alto grado histológico, alto índice mitótico, presencia de zonas necróticas, bordes presionados e infiltraciones linfocíticas visibles. Presenta un comportamiento clínico más agresivo y un patrón de diseminación metastásica con inclinación a cerebro y pulmón (Rakha *et al.* 2008).

#### 3.2.1.4. Normal breast-like o no clasificados

Estos tumores no caen en ninguna de las categorías descritas anteriormente, aunque se asemejan al subtipo *basal-like* en el perfil molecular e inmunohistoquímico. Corresponden al 6-10% de todos los cánceres de mama. Son normalmente pequeños y en general tienen buen pronóstico. Son más comunes en mujeres postmenopáusicas que en premenopáusicas (Reddy 2011). El subtipo “no clasificado” es negativo para 5 marcadores: ER, PR, HER2, citoqueratina CK5 y EGFR.

Con la evolución de las técnicas de genómica y la secuenciación masiva de tumores es de esperar que surjan otras subclasificaciones de los tumores de mama en base a nuevas entidades moleculares. Sin embargo, actualmente resulta muy difícil establecer un sistema de clasificación sencillo, práctico y fácilmente aplicable que pueda abarcar de forma concisa y completa todas las particularidades del cáncer de mama (Bhargava *et al.* 2009).

#### 3.2.2. Clasificación histológica

A pesar de la clasificación molecular de los subtipos de cáncer de mama, en la práctica clínica la clasificación se suele basar en el análisis por inmunohistoquímica de los receptores hormonales y HER2. Utilizando este análisis



se identifican los tres subtipos principales del cáncer de mama (luminal A, luminal B y HER2). El resto de tumores se han clasificado en un único grupo que se caracteriza por la pérdida de expresión (o mínima expresión) de ER, PR y HER2, de ahí que se les haya denominado como tumores de cáncer de mama triple negativo (TNBC, *triple negative breast cancer*). El TNBC corresponde al 15% de todos los cánceres de mama diagnosticados, pero es responsable del alto índice de mortalidad de esta enfermedad. Se caracteriza por una evolución clínica agresiva y mal pronóstico. La mayoría son carcinomas ductales de alto grado histológico, elevada proliferación y necrosis, con características semejantes a tumores metastásicos y medulares. Actualmente, la quimioterapia es la única modalidad de tratamiento disponible para los tumores *basal-like* y TNBC, al ser resistentes a las terapias dirigidas contra ER, PR y HER2 (Reddy 2011).

A nivel histológico, la inmensa mayoría de los tumores mamarios son adenocarcinomas originados en el tejido glandular. Los tumores en etapas muy tempranas de su desarrollo, que no tienen capacidad de invadir tejidos circundantes, se denominan carcinomas *in situ*, que pueden ser ductales o lobulares en función de que se originen en los ductos o en los lóbulos mamarios, respectivamente. Cuando las células tumorales son capaces de sobrepasar la membrana basal, invadiendo el tejido que rodea a los conductos, denominado estroma, se origina un carcinoma invasivo o infiltrante. Esta transición, de una lesión pre-invasiva *in situ* a una lesión invasiva, es un paso crítico en la progresión de la enfermedad. Si se encuentran células cancerosas en los ganglios linfáticos, puede ocurrir que las células se hayan extendido a otras partes del organismo. Cuando esto ocurre se denomina cáncer metastásico (MacMillan *et al.* 2014). Los lugares de metástasis más frecuentes son los huesos, los pulmones, el hígado, ganglios linfáticos distantes o el cerebro.

### 3.3. Opciones terapéuticas

La biología y el comportamiento del cáncer de mama van a determinar el plan de tratamiento, que debe ser completamente personalizado y va a depender de varios factores, que incluyen:

- El subtipo tumoral (niveles de ER, PR y HER2)
- El estadio del tumor
- Marcadores genómicos, como *Oncotype DX™*
- Edad del paciente, estado general, condición menopáusica y preferencias
- Presencia de mutaciones conocidas heredadas, como BRCA1 o BRCA2 (*breast cancer type 2 susceptibility protein*; proteína de susceptibilidad al cáncer de mama de tipo 2)

Aunque se personalice el tratamiento, hay varias consideraciones generales para el cáncer de mama de estadio temprano y localmente avanzado (Garcia-Saenz *et al.* 2015). En ambos casos se recomienda la cirugía para extirpar el tumor. En el caso de tumores grandes o tumores que crecen muy rápido, puede ser recomendable el tratamiento sistémico con quimioterapia o terapia hormonal antes de la cirugía, lo que se denomina terapia neoadyuvante. Tras la cirugía, se suele aplicar un tratamiento sistémico, denominado terapia adyuvante, para disminuir el riesgo de recurrencia y eliminar las células cancerígenas que hayan podido sobrevivir. Estas terapias incluyen radiación, quimioterapia, terapia dirigida y/o terapia hormonal (Del Barco *et al.* 2013). En el caso de tumores inoperables, el tratamiento sistémico es la única opción para disminuir el cáncer (Gavila *et al.* 2015). Para el cáncer recurrente, las opciones de tratamiento dependerán de cómo se trató originalmente el cáncer y de sus características (por ejemplo, estatus de ER, PR y HER2).

La terapia sistémica se administra por vía oral o intravenosa, de tal forma que alcance a las células cancerígenas a través del torrente sanguíneo. Se distinguen tres categorías: quimioterapia, terapia hormonal y terapia dirigida.

### 3.3.1. *Quimioterapia*

Se basa en el uso de fármacos que destruyen las células cancerígenas impidiendo que éstas crezcan y se dividan. Se administra en un número específico de ciclos durante un determinado período de tiempo. Dentro de los fármacos más comunes están: capecitabina (Xeloda®), carboplatino (Paraplatin®), cisplatino (Platinol®), ciclofosfamida (Neosar®), docetaxel (Docefrez®, Taxotere®), doxorubicina (Adriamycin®), doxorubicina liposomal pegilada (Doxil®), epirubicina (Ellence®), fluorouracilo (5-FU, Aduvicol®), gemcitabina (Gemzar®), metotrexato, paclitaxel (Taxol®), vinorelbina (Navelbine®), eribulina (Halaven®) o ixabepilona (Ixempra®). La quimioterapia se puede administrar como monoterapia o en combinación, lo que suele ser más efectivo.

### 3.3.2. *Terapia hormonal*

La terapia hormonal o endocrina es un tratamiento efectivo para la mayoría de tumores positivos para ER y/o PR, que usan hormonas para sostener su crecimiento. Dentro de este tratamiento se distingue el **tamoxifeno**, que bloquea la unión de estrógenos a las células del cáncer (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative 2005), y los **inhibidores de la aromatasa**, que bloquean la enzima encargada de transformar los andrógenos en estrógenos cuando los ovarios han dejado de producir estrógenos durante la menopausia (Lin y Winer 2008).

### 3.3.3. *Terapia dirigida*

Consisten en tratamientos dirigidos contra proteínas específicas o sobreexpresadas en las células del cáncer, o contra el microambiente que contribuye al crecimiento y supervivencia del tumor, limitando el daño a las células sanas. En el caso del cáncer de mama, estas terapias se usan en el subtipo HER2 e incluyen los anticuerpos monoclonales trastuzumab (Herceptin®) y

pertuzumab (Perjeta®), el ADC trastuzumab-emtansina (Kadcyla®), las moléculas pequeñas neratinib (Nerlynx®) y lapatinib (Tykerb®), y los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK, *cyclin-dependent kinase*) CDK4 y CDK6 palbociclib (Ibrance®), ribociclib (Kisqali®) y abemaciclib (Verzenio™).

## 4. CÁNCER DE OVARIO

### 4.1. Epidemiología

El cáncer epitelial de ovario es la segunda neoplasia del aparato genital femenino en frecuencia, tras el cáncer de endometrio. Sin embargo es la principal causa de mortalidad por cáncer ginecológico y la cuarta causa de muerte por cáncer en mujeres, tras el cáncer de pulmón, mama y colon (Yap *et al.* 2009). En España se diagnostican unos 3.300 casos anuales, lo que representa el 5,1% de los cánceres entre las mujeres. La elevada mortalidad del cáncer de ovario se explica por dos razones: la ausencia de síntomas específicos al inicio, lo que motiva que la mayoría de pacientes se presenten con enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico (que es más difícil de curar), y la ausencia de métodos de detección precoz que sean eficaces y estén validados. La media de supervivencia a 5 años para pacientes con cáncer de ovario es del 46%, la mitad que en el caso de cáncer de mama. Este porcentaje es ligeramente superior (del 56%) para mujeres menores de 65 años e inferior (del 28%) para mujeres que sobrepasan esa edad. Como es habitual, cuando el cáncer está localizado la tasa de supervivencia es elevada, aproximadamente del 90%; por el contrario, si el cáncer se ha diseminado a partes distantes del cuerpo, la tasa de supervivencia se reduce al 30% (Galceran *et al.* 2017).

Existen diferencias geográficas en la incidencia de esta enfermedad, siendo más frecuente en países industrializados. También se da con más frecuencia en las mujeres postmenopáusicas, con la máxima incidencia entre los 50 y 75 años.

## 4.2. Clasificación

Aunque su clasificación es compleja, los dos tipos más importantes de cáncer de ovario son los tumores epiteliales (90% de los casos) y los tumores de células germinales (10% de los casos) (Meinhold-Heerlein *et al.* 2016).

### 4.2.1. Tumores epiteliales

**Tumores serosos.** Son los cánceres más frecuentes de ovario. Suelen tener un tamaño medio de 15 cm en el momento del diagnóstico y en la mayoría de las ocasiones son bilaterales. En función de sus características histopatológicas se distinguen tumores de alto grado y de bajo grado.

**Tumores mucinosos.** Representan el 15% de los tumores malignos de ovario. Aparecen en mujeres jóvenes, generalmente se diagnostican en estadios precoces y tienen mejor pronóstico que los serosos. Su nombre deriva de que producen mucina, que se extiende por toda la cavidad peritoneal.

**Tumores endometrioides.** Representan el 15-25% de los cánceres ováricos. Tienen un aspecto sólido y oscuro, y en la mitad de los casos son bilaterales.

**Tumores de células claras.** Representan el 5% de los cánceres de ovario. Son bilaterales en el 20-40% de los casos.

**Tumores *borderline* o límite.** Se denomina así cualquiera de los tumores anteriores cuando presenta una baja malignidad. Su característica principal es que no invaden la profundidad del ovario. Suelen presentarse en mujeres jóvenes y progresan lentamente. Su pronóstico es favorable en la mayoría de los casos.

### 4.2.2. Tumores germinales

Los tumores de células germinativas del ovario son poco comunes, pero de crecimiento rápido y se observan con mayor frecuencia en mujeres jóvenes o en adolescentes. Estos tumores son con frecuencia unilaterales y generalmente curables si se detectan y se tratan en fases tempranas. Son muy sensibles a la quimioterapia, y su tratamiento quirúrgico es más conservador que en el caso de

los tumores epiteliales. Las variedades más frecuentes son los teratomas y los disgerminomas.

### 4.3. Opciones terapéuticas

Las opciones y recomendaciones de tratamientos van a depender de varios factores, como el tipo y estadio del cáncer, los efectos secundarios posibles, las preferencias de la paciente y su estado de salud general, o bien consideraciones personales de la mujer, como su edad y si planea tener hijos en el futuro.

#### 4.3.1. Cirugía

La cirugía habitualmente es un tratamiento importante para el cáncer de ovario, no solo a nivel terapéutico sino también para determinar el alcance de la enfermedad y estadificarla de manera precisa, ya que con las pruebas de imagen no se logra este objetivo. Existen varias opciones quirúrgicas para el cáncer de ovario, que van a estar determinadas por el estadio del tumor (Santaballa *et al.* 2016). En tumores localizados o en estadios más tempranos se puede llevar a cabo la extirpación de los ovarios y las trompas de Falopio (**salpingo-ooforectomía**), del útero (**histerectomía**), de los ganglios linfáticos de la pelvis (**linfadenectomía**) o del tejido delgado que recubre el estómago y el intestino grueso (**omentectomía**). En mujeres con cáncer de ovario metastásico se lleva a cabo una **cirugía citorreductora**, cuyo objetivo es eliminar la mayor cantidad de tumor que sea posible de manera segura. Este proceso puede ayudar a reducir los síntomas, así como a aumentar la efectividad de otros tratamientos, como la quimioterapia administrada después de la cirugía.

#### 4.3.2. Quimioterapia

La quimioterapia es la opción de tratamiento más frecuente en pacientes de cáncer de ovario y se administra en diversos momentos de la enfermedad (Santaballa *et al.* 2016).

**Quimioterapia adyuvante:** Se administra después de la cirugía y generalmente consiste en carboplatino (Paraplatin®) con paclitaxel (Taxol®) o docetaxel (Docefrez®, Taxotere®).

**Quimioterapia neoadyuvante.** Se administra antes de la cirugía con el objetivo de reducir el tamaño del tumor antes de la intervención. Es similar a la quimioterapia adyuvante.

**Quimioterapia de mantenimiento.** Se realiza para aumentar el tiempo hasta la recurrencia del cáncer o bien reducir el riesgo de esta.

**Quimioterapia de recurrencia.** Se administra para tratar el cáncer que ha regresado, con el objetivo principal de reducir o evitar los síntomas de la enfermedad, minimizando los efectos secundarios. En la enfermedad recurrente, el tratamiento se categoriza en función del momento en el que se usó por última vez un tratamiento a base de platino: en la enfermedad sensible a platinos (cuando el cáncer regresa después de 6 meses tras la quimioterapia con platino), las pacientes podrían beneficiarse de nuevo del tratamiento con carboplatino en combinación con doxorubicina liposomal (Doxil®), paclitaxel (Taxol®) o gemcitabina (Gemzar®); en la enfermedad resistente a platinos (cuando el cáncer regresa antes de 6 meses tras la quimioterapia con platino), las opciones de quimioterapia pueden incluir doxorubicina liposomal (Doxil®), paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), nab-paclitaxel (Abraxane®), gemcitabina (Gemzar®), etoposido (Toposar®, VePesid®), pemetrexed (Alimta®), ciclofosfamida (Cytoxan®), topotecán (Hycamtin®), vinorelbina (Navelbine®) o irinotecán (Camptosar®), generalmente en monoterapia.

#### 4.3.3. *Terapia dirigida*

Actualmente, los tratamientos dirigidos no suelen ser la primera opción en cáncer de ovario, ya que muchos se encuentran ahora en ensayos clínicos. Sin embargo, las pruebas moleculares directas sobre el tumor individual de las

pacientes pueden sugerir su adecuación a participar en uno de estos ensayos con una terapia dirigida específica.

#### 4.3.3.1. *Inhibidores de la angiogénesis*

Estos fármacos bloquean la acción del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), responsable de promover la angiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos. De esta forma, el tumor no recibe los nutrientes necesarios para crecer y diseminarse. Bevacizumab (Avastin®), un anticuerpo contra VEGF-A, ha demostrado ser efectivo para el cáncer de ovario, donde se usa en combinación con quimioterapia en pacientes con recurrencia resistente a los medicamentos a base de platino (Burger *et al.* 2011).

#### 4.3.3.2. *Inhibidores de PARP*

Los inhibidores de la poli-ADP-ribosa-polimerasa (PARP, *poly-ADP ribose polymerase*) actúan sobre la reparación del DNA en las células cancerosas, dificultando la replicación. Las proteínas BRCA1 y BRCA2 están involucradas en la reparación de roturas de doble cadena del DNA, mientras que PARP está implicado en la reparación de roturas de una sola hebra. Los fármacos que inhiben PARP en los tumores con BRCA1 o BRCA2 mutados provocan que las roturas de doble cadena del DNA no se puede reparar de manera eficiente, lo que lleva a la muerte de las células. La FDA aprobó el inhibidor de PARP olaparib (Lynparza®) para cáncer de ovario recurrente en pacientes que tienen una mutación de BRCA hereditaria y que han recibido 3 o más líneas de quimioterapia (Llort *et al.* 2015).

#### 4.3.3.3. *Vía de MAPK*

El carcinoma seroso de bajo grado presenta con frecuencia mutaciones en BRAF y KRAS, por lo que se está evaluando el uso de inhibidores de MEK en este tipo de tumores. Los primeros ensayos clínicos han dado buenos resultados (Farley *et al.* 2013).



#### 4.3.3.4. Vía de PI3K/AKT

La activación de la vía de PI3K mediante mutaciones en *PI3KCA*, *AKT* o inactivación de *PTEN* se ha observado en hasta un 30% de los carcinomas de ovario endometrioides y de células claras (Mabuchi *et al.* 2015). Aunque no está claro si estas aberraciones en la vía resultan críticas en el crecimiento del tumor, sí que se ha sugerido que la modulación de esta ruta puede revertir la resistencia a quimioterapia en cáncer de ovario (Carden *et al.* 2012).

#### 4.3.3.5. Receptores ERBB

La expresión del EGFR es frecuente hasta en un 60% de los tumores de ovario (Bartlett *et al.* 1996) y, de hecho, los agentes contra este receptor han demostrado actividad antitumoral en modelos preclínicos (Ciardiello *et al.* 2000). Sin embargo, los resultados clínicos del uso de fármacos dirigidos contra EGFR en cáncer de ovario no han dado buenos resultados (Yap *et al.* 2009). De manera similar, la terapia anti-HER2, tanto con trastuzumab como con pertuzumab, no ha supuesto un beneficio clínico en casos no seleccionados de carcinoma de ovario (Bookman *et al.* 2003, Gordon *et al.* 2006). En este sentido, la selección apropiada de las pacientes podría predecir la sensibilidad a fármacos contra HER2. Aquellas pacientes con activación de HER2, valorado por fosforilación, o con sobreexpresión o amplificación del receptor (como ocurre en un 18% de los carcinomas de ovario mucinosos) podrían beneficiarse de estos tratamientos.

Por otro lado, las terapias contra HER3 podrían resultar prometedoras. En estudios preclínicos se demostró que el tratamiento con un anticuerpo contra HER3 reducía el crecimiento tumoral en ratones con xenoinjertos de células de cáncer de ovario humanas (Sheng *et al.* 2010). También se ha descrito que HER3 tiene un papel relevante en la dispersión hematógica del cáncer de ovario (Pradeep *et al.* 2014).

#### 4.3.4. Inmunoterapia

Con la inmunoterapia se busca estimular o reforzar la capacidad del sistema inmunitario para destruir las células cancerosas. Ejemplos de estos fármacos son los anticuerpos monoclonales contra PD-1 (*programmed death 1*) y PD-L1 (*programmed death-ligand 1*). PD-1 se expresa en la superficie de células T activadas, células B y macrófagos. Cuando PD-1 se une a su ligando, que se expresa en un amplio rango de tumores (Zou y Chen 2008), regula negativamente las señales de los receptores de células T. Basado en esta idea de que la señalización PD-L1/PD-1 atenúa la inmunidad tumoral local, los agentes que bloquean dichas señales se han denominado inhibidores de puntos de control del sistema inmune y ya han demostrado su eficacia en otros tipos de cáncer, como el melanoma y el cáncer de pulmón (Topalian *et al.* 2012). Los estudios preclínicos y ensayos clínicos apuntan a que esta terapia puede ser efectiva en cáncer de ovario, especialmente en combinación con terapias más convencionales como la quimioterapia (Mandai *et al.* 2016).

Por otro lado, el tratamiento con “células T adoptivas”, basado en la transfusión de células T del propio paciente, ha demostrado buenos resultados en cáncer de ovario (Fujita *et al.* 1995). Una variante de esta terapia es la basada en CAR-T (*chimeric antigen receptor-modified T*) cells, es decir, células T del paciente reprogramadas mediante tecnología de transferencia génica para dirigir su potencial citotóxico contra las células del cáncer (Zhu *et al.* 2017). En el caso del carcinoma de ovario, los ensayos clínicos con CAR-T cells dirigidas contra MUC16, una proteína ampliamente expresada en este tipo de tumores, sugieren que las pacientes podrían beneficiarse de este tipo de tratamiento (Koneru *et al.* 2015).

## 5. CÁNCER DE RIÑÓN

### 5.1. Epidemiología

El cáncer de riñón, o carcinoma de células renales, se encuentra entre los diez cánceres más comunes tanto en hombres como en mujeres, considerándose responsable de un 2-3% de todos los tumores malignos en el adulto. El riesgo de padecer carcinoma renal durante la vida es aproximadamente del 1,6%, siendo casi dos veces más frecuente en hombres que en mujeres, y más común en afroamericanos que en raza caucásica. La mayoría de los casos se diagnostican en personas mayores de 45 años, con una edad promedio en el momento del diagnóstico de 64 años (Ferlay *et al.* 2015).

En España, según el informe de la SEOM, la incidencia fue de 6.474 casos en 2012 (4.346 en hombres y 2.128 en mujeres) y la mortalidad, de 2.295 personas (1.531 hombres y 764 mujeres).

### 5.2. Clasificación

La clasificación de los tumores de riñón es bastante compleja y ha sufrido múltiples cambios en la última década. Los diferentes subtipos se determinan en función de las características citoplasmáticas de los tumores, su arquitectura, la localización anatómica, la correlación con una enfermedad renal específica, la presencia de alteraciones moleculares o la predisposición familiar (Moch *et al.* 2016). A continuación se describe una clasificación clásica de los tumores de riñón, en la que se excluyen los tumores raros que se dan solo de manera esporádica (Srigley *et al.* 2013).

#### 5.2.1. *Carcinoma de células renales*

El carcinoma de células renales, también conocido como cáncer o adenocarcinoma de células renales, es el tipo más común de cáncer de riñón,

representando un 85% de todos los tumores renales malignos. Se origina en la corteza renal y se puede clasificar en varios subtipos:

**Carcinoma de células claras o ccRCC (*clear cell renal cell carcinoma*).** Es el más frecuente, representando un 80% de los casos. Las células claras pueden tener un crecimiento que varía de lento (grado 1) hasta rápido (grado 4). En este tipo de cáncer renal se han validado los resultados de la terapia dirigida y la inmunoterapia.

**Carcinoma papilar.** Representa el 15% de los casos. Se divide a su vez en dos subclases: tipo 1 y tipo 2 (este último de comportamiento más agresivo). Se tratan de la misma manera que el carcinoma de riñón de células claras.

**Carcinoma cromóforo y oncocitoma.** Representa el 5% de los casos. Tiene un crecimiento muy lento y rara vez se disemina.

**Carcinoma de los conductos colectores.** Son tumores muy infrecuentes, representando menos del 1% de los casos. Se comporta de modo similar al carcinoma de células transicionales de vejiga y vías urinarias.

**Variante sarcomatoide.** Puede coexistir con cualquiera de los subtipos anteriores y conlleva un comportamiento más agresivo del tumor por su crecimiento más rápido.

### 5.2.2. *Carcinoma de células transicionales*

También se conoce como carcinoma urotelial. Representa alrededor del 5-10% de los cánceres de riñón. Se trata de un tipo histológico que no se origina en la corteza del riñón, sino en el revestimiento de la pelvis renal. Este tipo de tumores tiene un comportamiento y tratamiento diferentes, más similar al cáncer de vejiga y de las vías urinarias.

### 5.2.3. *Nefroblastoma o tumor de Wilms*

Se trata de un tipo poco frecuente de cáncer renal que se presenta típicamente en la infancia.

### 5.3. Opciones terapéuticas

A la hora de planificar el tratamiento del cáncer de riñón, determinar el estadio de la enfermedad resulta crucial. Según la clasificación TNM se establecen 4 estadios, cuyas características se describen en la figura 5.

Tumor Primario (T)		
<b>T0</b>	No hay evidencia de tumor primario.	<b>Estadio I</b> • T1 N0 M0
<b>T1</b>	≤7 cm en su mayor dimensión, limitado al riñón.	
<b>T2</b>	>7 cm en su mayor dimensión, limitado al riñón.	<b>Estadio II</b> • T2 N0 M0
<b>T3</b>	El tumor se extiende a venas principales o tejidos perinefríticos pero no a la glándula adrenal ipsilateral ni más allá de la fascia Gerota.	
<b>T4</b>	El tumor invade más allá de la fascia Gerota (incluyendo extensión contigua a la glándula adrenal ipsilateral).	<b>Estadio III</b> • T1/T2 N1 M0 • T3 N0/N1 M0
Nódulos Linfáticos Regionales (N)		
<b>Nx</b>	No se pueden evaluar.	
<b>N0</b>	No hay metástasis a nódulos linfáticos regionales.	<b>Estadio IV</b> • T4 N M0 • T N M1
<b>N1</b>	Metastasis a nódulos linfáticos regionales.	
Metástasis Distantes (M)		
<b>M0</b>	No hay metástasis distantes.	
<b>M1</b>	Metastasis distantes.	

Figura 5. Estadificación del carcinoma renal de acuerdo al sistema TNM.

Hay distintos tipos de tratamiento disponibles para los pacientes con cáncer de células renales, que varían en función del estadio de la enfermedad (Gallardo *et al.* 2017). Cuando la enfermedad se presenta localizada en el riñón (estadios I, II y III), la cirugía puede ser potencialmente curativa. La intervención quirúrgica puede ser una **nefrectomía parcial** (se extrae el tumor y parte del tejido que lo rodea con el fin de conservar tejido renal sano y funcional) o una **nefrectomía radical** (se

extrae el riñón, la glándula suprarrenal, el tejido circundante y, por lo general, algunos ganglios linfáticos cercanos). Cuando no es posible operar para extraer el tumor, se puede usar como tratamiento la **embolización arterial** para reducirlo, o también la **crioablación** y la **ablación por radiofrecuencia**.

Para pacientes con cáncer renal avanzado (estadio IV), la opción de cirugía tiene como objetivo reducir el mayor volumen de masa tumoral posible (**cirugía citorreductiva**) y se suele emplear junto con un tratamiento sistémico, ya sea inmunoterapia o terapia dirigida. Cabe destacar que, en general, el cáncer de células renales, a diferencia de otro tipo de tumores, es resistente a la quimioterapia (Hartmann y Bokemeyer 1999). Por lo tanto, son necesarias otras estrategias terapéuticas.

### 5.3.1. *Inmunoterapia*

En el carcinoma renal se emplean dos citoquinas: **Interleucina 2** (IL-2), o Proleukin®, e **Interferón alfa** (IFN $\alpha$ ). El primero es el fármaco que ha demostrado mayor eficacia; antes se usaba en primera línea pero, debido a los graves efectos secundarios, actualmente solo se usa en pacientes saludables o que no responden a las terapias dirigidas. El IFN $\alpha$  tiene menos efectos secundarios que la IL-2, pero también resulta menos eficaz. Hoy en día, el uso en la clínica de estas citoquinas ha disminuido considerablemente debido a la aparición de nuevos tratamientos dirigidos que han demostrado mayor eficacia clínica y mejor perfil de tolerancia. Un ejemplo de estos nuevos agentes inmunoterápicos es **nivolumab** (Opdivo®), un anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1 que está mostrando muy buenos resultados (Geynisman 2015).

### 5.3.2. *Terapia dirigida*

La terapia dirigida utiliza fármacos y otras sustancias que pueden identificar y eliminar células cancerosas sin dañar las células normales. Cabe destacar que estos fármacos pueden producir remisión de la enfermedad o bien impedir la progresión de la misma en la mayoría de los casos, pero no curan la enfermedad.

Para el cáncer avanzado de células renales, la **terapia antiangiogénica** es el tratamiento de preferencia. Actúa inhibiendo receptores críticos de los vasos sanguíneos desarrollados en el propio tumor, impidiendo así la formación de nuevos vasos; el resultado es que el tumor deja de crecer o reduce su tamaño. Entre los fármacos antiangiogénicos, los mejores resultados se han conseguido con Sunitinib, Pazopanib, Bevacizumab, Sorafenib, Axitinib y Tivozanib. Por otro lado, se emplean los denominados **inhibidores de la vía mTOR**, una vía que tiene un papel fundamental en el metabolismo, crecimiento y proliferación de la célula tumoral. Actualmente se dispone de dos fármacos de este tipo: Temsirolimus y Everolimus.

Las opciones que han demostrado eficacia en primera línea o en el tratamiento de entrada para la enfermedad avanzada serían: Sunitinib, Pazopanib, Bevacizumab-Interferón o Temsirolimus en pacientes con criterios de mal pronóstico. En segunda línea o tras fallo al tratamiento de entrada: Nivolumab, Cabozantinib, Axitinib, Everolimus o Sorafenib (Gallardo *et al.* 2017).





# **OBJETIVOS**



El sistema de receptores ERBB y sus ligandos juega un papel primordial en la señalización celular, por lo que su desregulación tiene una fuerte implicación en la aparición de patologías, como la oncogénesis. Por ello, estas proteínas constituyen importantes dianas terapéuticas, cuya inhibición ha demostrado ser una estrategia poderosa a la hora de manejar distintos tipos de cáncer. Un ejemplo que ha marcado un punto de inflexión en el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama HER2+ es trastuzumab y, más recientemente, trastuzumab-emtansina o T-DM1. Este último consiste en un anticuerpo conjugado a fármaco, una clase moléculas complejas que utilizan la alta especificidad de los anticuerpos para dirigir agentes citotóxicos muy potentes a células tumorales, y que se presentan como una estrategia muy prometedora para múltiples tipos de cáncer.

Sin embargo, existen limitaciones en estos tratamientos. Por un lado, en patologías en las que el uso de terapias dirigidas está ampliamente extendido, como es el caso de cáncer de mama HER2+, con frecuencia surgen resistencias al tratamiento. Por otro lado, existen patologías en las que el uso de terapias dirigidas aún no está tan arraigado, debido en parte a la falta de dianas terapéuticas adecuadas contra las que dirigir un ADC. Algunos ejemplos son el carcinoma de ovario o el carcinoma renal de células claras avanzado que, a pesar de los progresos en cirugía y tratamiento, siguen siendo enfermedades incurables.

## **OBJETIVOS**

Considerando estos precedentes, nos planteamos los siguientes objetivos:

- I. Describir el mecanismo que conduce a la adquisición de resistencia a T-DM1 en modelos celulares de cáncer de mama HER2+.
- II. Evaluar el potencial terapéutico de T-DM1 en cáncer de ovario HER2+.
- III. Identificar dianas terapéuticas contra las que dirigir un ADC en carcinoma renal de células claras.



# **MATERIAL 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) se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, California, Estados Unidos). El material de plástico estéril para cultivos celulares fue comprado a BD Biosciences (Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos) y Corning Inc. (Corning, Nueva York, Estados Unidos).

Los fármacos e inhibidores utilizados en los experimentos *in vitro* e *in vivo* fueron: T-DM1 y trastuzumab, ambos de Hoffmann-La Roche (Basilea, Suiza) adquiridos a través de una farmacia local o donados por Genentech (South San Francisco, California, Estados Unidos); erlotinib, de Hoffmann-La Roche, y gefitinib, de AstraZeneca (Cambridge, Reino Unido), adquiridos a través de una farmacia local; carboplatino y cisplatino, de Pfizer (Nueva York, Nueva York, Estados Unidos); docetaxel, de Hospira UK Ltd (Berkshire, Reino Unido); vinorelbina, de Pierre Fabre (Barcelona, España); lapatinib y rapamicina, de LC Laboratories (Woburn, Massachusetts, Estados Unidos); bafilomicina A1, de Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, Estados Unidos); mertansina, de MedChem Express (Monmouth Junction, Nueva Jersey, Estados Unidos); y cetuximab, de Merck (Darmstadt, Alemania).

Los dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates*) fueron comprados a Fermentas Life Sciences (Burlington, Canadá). La enzima DNA polimerasa y su tampón de reacción fueron obtenidos de Biotools Biotechnological & Medical Laboratories (Madrid, España). La enzima MMLV-RT (*Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*) y los oligonucleótidos utilizados en las diferentes PCRs (*polymerase chain reaction*) fueron de Invitrogen. El *RNasin RNase Inhibitor* fue de Promega (Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

El reactivo empleado en las transfecciones celulares fue jetPEI®, de Polyplus Transfection (Nueva York, Nueva York, Estados Unidos). Los vectores lentivirales

fueron obtenidos de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). La puromicina empleada para la selección fue de Sigma-Aldrich.

La proteína A-Sefarosa® y la GammaBind G-Sefarosa® fueron distribuidos 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 (Mortsel, Bélgica).

El resto de reactivos generales utilizados en este trabajo fueron adquiridos a Sigma-Aldrich, Roche Applied Science (Penzberg, Alemania) o Merck.

## 1.2. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este trabajo y su procedencia se especifican en las siguientes tablas: tabla 2 (anticuerpos primarios comerciales), tabla 3 (anticuerpos primarios generados en el laboratorio) y tabla 4 (anticuerpos secundarios). Todos los anticuerpos generados en el laboratorio son anticuerpos policlonales de conejo y se obtuvieron siguiendo el procedimiento que se indica en la sección 1.3.

**Tabla 2. Anticuerpos primarios usados en inmunodetección.**

Aplicación	Antígeno	Huésped	Dilución	Referencia
IP (array)	C-ABL	Ratón	0,1 µg	Santa Cruz #sc-23
IP (array)	CSF-1R	Conejo	0,1 µg	Santa Cruz #sc-692
IP (array)	EPHA2	Conejo	0,1 µg	Santa Cruz #sc-924
IP (array)	FAK	Conejo	0,1 µg	Santa Cruz #sc-558
IP (array)	FGFR1	Conejo	0,1 µg	Santa Cruz #sc-121
IP (array)	FGFR2	Conejo	0,1 µg	Santa Cruz #sc-122
IP (array)	FGFR3	Conejo	0,1 µg	Santa Cruz #sc-123
IP (array)	FGFR4	Conejo	0,1 µg	Santa Cruz #sc-124
IP (array)	FLT3	Conejo	0,1 µg	Santa Cruz #sc-479
IP (array)	IGF-1R	Conejo	0,1 µg	Santa Cruz #sc-713
IP (array)	C-MET	Conejo	0,1 µg	Santa Cruz #sc-161
IP (array)	PDGFR $\alpha$	Conejo	0,1 µg	Santa Cruz #sc-338
IP (array)	PDGFR $\beta$	Conejo	0,1 µg	Santa Cruz #sc-339
IP (array)	RET1	Conejo	0,1 µg	Santa Cruz #sc-167
IP (array)	RET2	Conejo	0,1 µg	Santa Cruz #sc-1290



IP (array)	SRC	Conejo	0,1 µg	Santa Cruz #sc-8056
IP (array)	C-KIT	Ratón	0,1 µg	BD #555713
IP (array)	DTK	Ratón	0,1 µg	R&D #MAB859
IP (array)	VEGFR1	Ratón	0,1 µg	R&D #MAB321
IP (array)	VEGFR2	Ratón	0,1 µg	R&D #3572
IP (array)	VEGFR3	Ratón	0,1 µg	R&D #MAB3491
WB	Ciclina B1	Ratón	1:2.500	Santa Cruz #sc-245
WB	Ciclina E	Conejo	1:1.000	Santa Cruz #sc-198
WB	WEE1	Conejo	1:1.000	Santa Cruz #sc-9037
WB	P27	Conejo	1:1.000	Santa Cruz #sc-1641
WB	CDK2	Conejo	1:5.000	Santa Cruz #sc-163
WB	CDK4	Conejo	1:5.000	Santa Cruz #sc-260
WB	GAPDH	Conejo	1:20.000	Santa Cruz #sc-25778
WB	GAPDH	Ratón	1:10.000	Santa Cruz #sc-166574
WB	Fosfo-Y <sup>99</sup> -HRP	Ratón	1:5.000	BD #610012
WB	Fosfo-Tyr	Ratón	1:10.000	Santa Cruz #sc-7020
WB	Fosfo-Histona H3	Conejo	1:10.000	Millipore #06-570
WB	Fosfo-CDK1 (Y <sup>15</sup> )	Conejo	1:1.000	Cell signaling #9111
WB	Fosfo-RB (S <sup>780</sup> )	Conejo	1:10.000	Cell signaling #3590
WB	Fosfo-RBP1	Conejo	1:10.000	Cell signaling #4735
WB	Fosfo-RB (S <sup>807/811</sup> )	Conejo	1:10.000	Cell signaling #9308
WB	LC3	Conejo	1:5.000	Cell Signaling #3868
WB	Fosfo-S6	Conejo	1:10.000	Cell Signaling #2215
WB	P62	Ratón	1:2.500	BD #610832
WB	BUBR1	Ratón	1:3500	BD #612503
WB	Caspasa 3	Ratón	1:5.000	BD #610323
WB	Caspasa 3 procesada	Conejo	1:10.000	BD #9664
WB	Calnexina	Conejo	1:40.000	Stressgen #SPA-860
WB/IF	HER2 (Ab3)	Ratón	1:10.000/40	Calbiochem #OP15
IP	EGFR (528)	Ratón	1 µg	Santa Cruz #sc-120
IP	TGFα	Cabra	1 µg	R&D #AF-239-NA
IP/IF	HER2 (4D5)	Humano	1 µg/10 nM	Cedido (MX Sliwkowsky)
IF	Nucleoporina p62	Ratón	1:200	BD #610498
IF	Tubulina β	Ratón	1:300	Sigma-Aldrich #T4026
IF	LAMP1	Conejo	1:100	Cell Signaling #9091
IF	HER2 (T-DM1-Cy3)	Humano	10 nM	Acoplado en laboratorio
IF	HER2 (T-DM1-Alexa488)	Humano	10 nM	Acoplado en laboratorio
IF	HER2 (Trastuzumab-Cy3)	Humano	10 nM	Acoplado en laboratorio

IP: Inmunoprecipitación; WB: Western blot; IF: Inmunofluorescencia.

Tabla 3. Anticuerpos primarios producidos en el laboratorio.

Aplicación	Antígeno	Epítipo	Dilución	Referencia
WB	EGFR humano	Conejo	1:2.000	(Sanchez-Martin y Pandiella 2012)
IP/WB	HER3 humano	Conejo	1 µg/1:5.000	(Sanchez-Martin y Pandiella 2012)
IP/WB	HER4 humano	Conejo	1 µg/1:2.500	(Sanchez-Martin y Pandiella 2012)
IP/WB	TGFα de rata	Conejo	1 µg/1:5.000	(Pandiella y Massague 1991)
IP/WB	DM1	Conejo	1 µg/1:10.000	
IP/IF	TGFα humano	Conejo	1 µg/1:5.000	

Tabla 4. Anticuerpos secundarios usados en inmunodetección.

Molécula conjugada (Aplicación)	Especie reconocida - Antígeno	Dilución	Referencia
HRP (WB)	Conejo - IgG (H+L)	1:20.000	Bio-Rad #170-6515
HRP (WB)	Ratón - IgG (H+L)	1:10.000	Amersham #NA931
DyLight®680 (WB Odyssey®)	Ratón - IgG (H+L)	1:10.000	Thermo Fisher Scientific #35518
DyLight®800 (WB Odyssey®)	Conejo - IgG (H+L)	1:10.000	Thermo Fisher Scientific #35571
Cy™2 (IF)	Ratón - IgG (H+L)	1:100	Amersham #PA42002
Cy™2 (IF)	Conejo - IgG (H+L)	1:100	Jackson IR #111-225-144
DyLight®488 (IF)	Humano - IgG+IgM	1:500	Jackson IR #109-485-044
Cy™3 (IF)	Conejo - IgG (H+L)	1:1.000	Jackson IR #111-165-003
Cy™3 (IF)	Humano - IgG (H+L)	1:800	Jackson IR #109-165-003

IgG: Inmunoglobulina G; H: Cadena pesada de la Ig; L: Cadena ligera de la Ig.

### 1.3. Producción de anticuerpos

#### 1.3.1. Acoplamiento de los péptidos

##### 1.3.1.1. TGF $\alpha$

Para producir sueros enriquecidos en anticuerpos policlonales contra el factor de crecimiento humano recombinante TGF $\alpha$  (ProSpec, Ness-Ziona, Israel), se inmunizaron hembras de conejos de la raza *New Zealand*, distribuidos por la Granja San Bernardo (Tulebras, España), con TGF $\alpha$  acoplado a hemocianina de lapa (KLH, *Keyhole Limpet Hemocyanin*; Calbiochem, Darmstadt, Alemania). El manejo y mantenimiento de los animales de experimentación se llevó a cabo de acuerdo con la legislación europea y española (Directiva 2010/63/UE y Ley 6/2013, respectivamente) relativa a la protección y cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, tras la aprobación del comité institucional. Se siguió el procedimiento descrito por Sambrook (Sambrook *et al.* 1987), que se resume a continuación. A 1 ml de KLH diluida en PBS (*Phosphate-Buffered Saline*; tampón fosfato salino) (pH 6) a una concentración final de 10 mg/ml se le añadieron 50  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO, *dimethyl sulfoxide*; Merck) que contenían 1,5 mg de MBS (*3-maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester*, éster de N-hidroxisuccinimida del ácido m-maleibenzoico; Sigma-Aldrich). Se agitó esta mezcla durante 30 minutos y se pasó por una columna de Sephadex G-25 para obtener las fracciones que contenían KLH conjugada a MBS, lo cual se determinó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro modelo SmartSpec™Plus (Bio-Rad Laboratories; Hercules, California, Estados Unidos). En paralelo, se disolvió 1 mg de TGF $\alpha$  recombinante humano en 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O milliQ estéril y se mezcló con la solución de KLH-MBS, manteniéndola en agitación moderada durante 1 hora a temperatura ambiente para promover su acoplamiento.

### 1.3.1.2. *DM1*

La producción de sueros enriquecidos en anticuerpos policlonales contra el fármaco mertansina (DM1) se realizó siguiendo el mismo procedimiento que para TGF $\alpha$ , con la diferencia de que el DM1 (1mg) se disolvió en 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O milliQ estéril y 200  $\mu$ l de DMSO, añadidos en fracciones de 100  $\mu$ l, hasta obtener una disolución homogénea.

### 1.3.2. *Inoculación y obtención de antisueros*

#### 1.3.2.1. *TGF $\alpha$*

Para la primera inoculación se mezcló la solución de KLH-MBS-TGF $\alpha$  (conteniendo unos 200  $\mu$ g de TGF $\alpha$ ) con un volumen equivalente de adyuvante completo de Freund (Pierce, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), añadido en fracciones de 100  $\mu$ l, mientras se agitaba vigorosamente. Se llevó a cabo la sonicación de la suspensión hasta conseguir una emulsión estable, con un sonicador Vibra-Cell™ (Sonics&Materials Inc.; Newtown, Connecticut, Estados Unidos) a una potencia máxima de 500 vatios. Tras su completa emulsión, la mezcla se inyectó en los conejos siguiendo un protocolo de inmunización intradérmica, para lo que se repartió la dosis de antígeno en varios puntos dorsales (aproximadamente 0,1 ml por punto). A los 21 días de la primera inoculación, se administró una dosis de recuerdo de 200  $\mu$ g de TGF $\alpha$  con adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich) que se emulsionó de la misma manera y se inyectó de forma subcutánea en las axilas de 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. Tras la retracción del coágulo, el suero se clarificó mediante centrifugación a 3000g y el suero se conservó a -20°C hasta su purificación por cromatografía de afinidad.

### 1.3.2.2. DM1

La inoculación del antígeno en el conejo se realizó siguiendo el mismo procedimiento que para TGF $\alpha$ , pero utilizando una cantidad mayor de DM1 (250  $\mu$ g de DM1 tanto para la primera inoculación como para la dosis de recuerdo).

### 1.3.3. Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad

Para preparar las columnas de cromatografía, se utilizó una matriz de Sefarosa<sup>®</sup> CL-4B activada con bromuro de cianógeno (CNBr, *cyanogen bromide*; GE Healthcare), que se incubó con 1 mM HCl durante 15 minutos, siguiendo las indicaciones del fabricante. Transcurrido este tiempo, se equilibraron con tampón de acoplamiento (0,5 M NaCl; 0,1 M NaOH; pH 8,2) y se añadió el antígeno correspondiente acoplado a MBS-BSA (*bovine serum albumin*; albúmina sérica bovina), siguiendo el mismo protocolo de acoplamiento del apartado 1.3.1. Tras una incubación a 4°C durante toda la noche en agitación, se lavaron nuevamente con tampón de acoplamiento y se bloquearon los sitios de unión libres de la resina con 0,1 M Tris pH 8 durante 2 horas. A continuación se realizaron tres ciclos de cambio de pH, haciendo pasar alternativamente tampón A (0,1 M acetato; 0,5 M NaCl; pH 4) y tampón B (0,1 M Tris; 0,5 M NaCl; pH 8). Finalmente, se lavaron las columnas con PBS y se preservaron en el mismo tampón suplementado con 0,05% de azida sódica, para evitar su contaminación, hasta su uso.

Para purificar los anticuerpos, se incubó el antisuero con la columna durante 2 horas a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C, en agitación. A continuación, se lavó repetidamente con tampón de lavado (10 mM Tris; 0,5 M NaCl; pH 8) hasta que la absorbancia a 280 nm fue inferior a 0,01. En ese momento se comenzó la elución del anticuerpo unido a la columna añadiendo glicina 0,1 M a pH 2,6. Las fracciones recogidas, de un 1 ml cada una, se neutralizaron con 150  $\mu$ l de 1 M Tris-HCl a pH 8. Para comprobar la presencia de anticuerpos, se midió la absorbancia de cada fracción a 280 nm y se juntaron las fracciones con mayor absorbancia. Estas fracciones se concentraron usando un filtro Amicon<sup>®</sup> Ultra-4 de 100K (Millipore). Una vez purificados los anticuerpos, se validaron para IP y WB.

#### 1.4. Conjugación de anticuerpos a SMCC-DM1

Para generar anticuerpos conjugados a fármacos contra varios antígenos de interés, se acoplaron 2 mg de cetuximab, 1 mg de trastuzumab y 1 mg de anti-hTGF $\alpha$  a SMCC-DM1 mediante el reactivo SET0101, de Levena Biopharma (San Diego, California, Estados Unidos). Este kit contiene 200 nmol de un *linker*-toxina, en este caso SMCC-DM1, que permite acoplar hasta 5 mg de anticuerpo. El *linker* SMCC (*succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate*; succinimidil 4- (N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato) es no procesable y contiene un grupo N-hidroxisuccinimida (NHS éster) que reacciona con los grupos amino presentes en las cadenas laterales de residuos de aminoácidos de lisina del anticuerpo, generando enlaces amida estables. Para asegurar que no había grupos amino, que competirían con el anticuerpo por la unión al *linker* dificultando la conjugación, se cambió el tampón en el que estaban disueltos los anticuerpos por *coupling buffer 1* (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 50 mM NaCl; 2 mM EDTA; pH 6,5), utilizando un filtro Amicon® Ultra-0.5 de 100K (Millipore). A continuación, se midió la concentración de anticuerpo en un NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific) y se ajustó a 10-20 mg/ml. Se disolvió el reactivo SET0101 en dimetilacetamida (DMA, *dimethylacetamide*) a una concentración de 10 mM y se incubó un equivalente de 7 molar de reactivo con las soluciones de anticuerpo. Se añadió DMA extra a la solución de conjugación hasta obtener un volumen final de DMA de 10% v/v. Se mezcló brevemente la reacción y se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el acoplamiento, se añadió 1 ml de *conjugation buffer 2* (50 mM succinato de sodio; pH 5) y se pasó a un filtro Amicon® Ultra-0.5 de 100K. Se realizaron un total de 4 lavados con dicho *buffer*. Finalmente, se esterilizaron las soluciones de ADCs por filtración, con un filtro de nitrocelulosa de baja adsorción de 0,22  $\mu$ m (Millipore) y se cuantificaron en el NanoDrop™.

## 2. CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares empleadas para el desarrollo de este trabajo son de origen humano y se detallan en la tabla 5.

**Tabla 5. Líneas celulares.**

Línea celular	Tejido	Medio de cultivo	Especie
BT474	Carcinoma ductal de mama HER2+	DMEM 10% FBS	Humano
HCC1419	Carcinoma ductal de mama HER2+	RPMI 10% FBS	Humano
HCC1569	Carcinoma de mama HER2+	RPMI 10% FBS	Humano
HCC1954	Carcinoma ductal de mama HER2+	RPMI 10% FBS	Humano
SKBR3	Adenocarcinoma de mama HER2+	DMEM 10% FBS	Humano
A2780	Adenocarcinoma de ovario	RPMI 10% FBS	Humano
IGROV1	Adenocarcinoma de ovario	RPMI 10% FBS	Humano
OVCAR8	Adenocarcinoma de ovario	DMEM 10% FBS	Humano
SKOV3	Adenocarcinoma de ovario	DMEM 10% FBS	Humano
A498	Carcinoma renal de células claras	DMEM 10% FBS	Humano
ACHN	Carcinoma renal de células claras	DMEM 10% FBS	Humano
Caki2	Carcinoma renal de células claras	DMEM 10% FBS	Humano
769P	Carcinoma renal de células claras	RPMI 10% FBS	Humano
7860	Carcinoma renal de células claras	RPMI 10% FBS	Humano
CHO	Epitelio de ovario	DMEM 5% FBS	Hámster
CHO-TGF $\alpha$ *	Epitelio de ovario	DMEM 5% FBS	Hámster
HEK293T	Fibroblasto embrionario de riñón	DMEM 5% FBS	Humano
IMIMPC1	Adenocarcinoma de páncreas	DMEM 10% FBS	Humano
NP29	Adenocarcinoma de páncreas	DMEM 10% FBS	Humano
NP31	Adenocarcinoma de páncreas	DMEM 10% FBS	Humano

\* Células CHO transfectadas de manera estable con TGF $\alpha$  (Teixido *et al.* 1990).

### 2.1. Condiciones de cultivo

Las células se cultivaron en placas estériles en un incubador a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Los medios de cultivo utilizados fueron: (i) DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), conteniendo 4,5 g/l glucosa, 4 mM L-glutamina y 5 mM piruvato, y (ii) RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 L-glutamina, ambos suplementados con 5 o 10% de FBS, 100 U/ml penicilina y 100  $\mu$ g/ml estreptomycin. Cuando las líneas alcanzaron un 80-90% de confluencia, se procedió a su subcultivo. Para ello, se lavaron con PBS estéril (2,7 mM KCl; 1,5 mM

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 137 mM NaCl; 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y se incubaron 5 minutos con una solución de 0,25% tripsina-EDTA, que se neutralizó con medio de cultivo fresco. La suspensión celular se transfirió a nuevas placas de cultivo, realizando la dilución adecuada para cada línea celular.

## 2.2. Preservación de líneas celulares

Las células fueron congeladas a partir de cultivos en fase de crecimiento exponencial. Para congelarlas, una vez tripsinizadas se centrifugaron a 1.200 rpm durante 3 minutos y se resuspendieron en 1 ml de medio de congelación (DMEM o RPMI, según el tipo celular, suplementado con 10% de FBS y 10% de DMSO, como agente crioprotector). Los crioviales se mantuvieron a  $-80^\circ\text{C}$  durante 24 horas y, a continuación, se transfirieron a tanques de nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

## 2.3. Generación de modelos de resistencia

Los clones resistentes a T-DM1 fueron obtenidos a partir de la línea parental BT474 mediante exposición prolongada al fármaco. Se realizó un estudio inicial de dosis-respuesta a T-DM1 (desde 0,1 nM a 100 nM) tras 5 días de tratamiento, y se eligieron cuatro concentraciones de T-DM1 (0,25; 0,5; 1 y 5 nM), basadas en la tasa de inhibición de la proliferación celular. Se sembraron las células BT474 a baja densidad y se incubaron hasta que se adhirieron a la placa de cultivo. Seguidamente, se cambió el medio por medio de cultivo fresco con T-DM1, proceso que se repitió semanalmente durante aproximadamente 2 meses. Transcurrido ese tiempo aparecieron clones resistentes a la concentración más alta de T-DM1 (5 nM), que se aislaron y transfirieron de forma individual a placas de 24 pocillos. Estas líneas celulares se mantuvieron en cultivo en presencia de 5 nM de T-DM1 durante 1 mes adicional. Los clones estables generados por exposición prolongada a T-DM1 se analizaron de manera rutinaria para comprobar que mantenían la resistencia al fármaco.



## 2.4. Modificaciones genéticas

### 2.4.1. Transfección con plásmidos

Los experimentos de transfección se realizaron usando el reactivo jetPEI®, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se mezclaron 10 µg del plásmido de interés con 250 µl de NaCl 150 mM y 20 µl de jetPEI® con 250 µl de NaCl. A continuación, se transfirió la dilución de jetPEI® al DNA y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente se adicionó, gota a gota, sobre el medio de cultivo de una placa de 100 mm con las células diana a una confluencia del 50-60%. A las 24 horas se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco, y las células fueron utilizadas para los experimentos pertinentes en las 24-48 horas siguientes.

### 2.4.2. Infección con lentivirus

Los experimentos de silenciamiento génico se llevaron a cabo mediante transducción celular con lentivirus, utilizando secuencias de shRNA (*short hairpin RNA*) clonadas en el vector pLKO.1. Para producir los virus se emplearon las células HEK293T (células derivadas de la línea HEK293, que han sido transformadas con los genes adenovirales E1a y E1b y contienen el antígeno T del virus SV40 (Graham *et al.* 1977)). Las células empaquetadoras HEK293T fueron transfectadas mediante el reactivo jetPEI®, tal y como se describe en la sección 2.4.1., con los siguientes plásmidos:

- Vector lentiviral (8 µg): pLKO.1-puro o sh no codificante (control negativo), pLKO.1-GFP (control positivo), pLKO.1-shRNA
- pMDG-VSV-G (4 µg). Contiene el cDNA de la envuelta del virus.
- pRSV-Rev (4 µg). Contiene el cDNA de *Rev* (codifica para una proteína que permite la exportación del núcleo al citoplasma de fragmentos del mRNA que contienen el elemento RRE).

- pMDL-RRE (4 µg). Contiene el cDNA de *gag* (codifica para proteínas estructurales principales del virión), *pol* (codifica una DNA polimerasa específica de retrovirus) y RRE (sitio de unión para la proteína Rev).

Transcurridas 24 horas de la transfección, se reemplazó el medio de las células HEK293T por medio fresco y 24 horas después se recogió el medio con los virus, se filtró con filtros de PVDF de 0,45 µm (Millipore) y se le añadió polibreno a una concentración final 6 µg/ml. Este medio se utilizó para transducir las células diana. Pasadas 8 horas de incubación con virus, se les cambió el medio por medio fresco. 48 horas después de la infección con los virus, se seleccionaron las células infectadas con puromicina (3 µg/ml).

Para cada mRNA diana se probaron un mínimo de 5 vectores lentivirales diferentes y los dos que produjeron los mayores niveles de silenciamiento de las respectivas proteínas se utilizaron para los experimentos de proliferación. Los vectores seleccionados se describen en la tabla 6.

**Tabla 6. *short hairpin* RNAs.**

Gen	Referencia del clon	Secuencia madura antisentido (5'-3')
<i>EGF</i>	TRCN0000039635	TAA TTC CTT GAT AGC GAC GGG
	TRCN0000121070	TTG TCC AGG CTA ATT TGG TGG
<i>HER2</i>	TRCN0000010342	ATG TAT AGG TAA CCT GTG AT
	TRCN0000039878	TAC AAA GCC TGG ATA CTG ACA
<i>TGFA</i>	TRCN0000006375	AAC ACA ATA CCC AGA GCG AAC
	TRCN0000006377	AGC ACA CAT GTG ATG ATA AGG

## 2.5. Ensayos de proliferación celular

Para analizar la proliferación celular se utilizó el ensayo de metabolización de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; Sigma-Aldrich) o contaje celular directo.

### 2.5.1. *Metabolización de MTT*

Este ensayo se basa en la capacidad de las mitocondrias en las células vivas para reducir el compuesto MTT, que es amarillo y soluble en agua, dando lugar a un compuesto morado que precipita en forma de cristales insolubles en agua (formazán), mediante la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa (Mosmann 1983). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad entre 2.000 y 20.000 células por pocillo, dependiendo del tipo celular, y se incubaron 24 horas para permitir su adherencia a la placa de cultivo. En ese momento se realizaron los tratamientos oportunos a las células y su efecto se determinó a los tiempos indicados para cada experimento en los pies de figura. Para la medición se adicionó MTT al medio con las células, a una concentración final de 500 µg/ml, y se incubó durante una hora a 37°C. A continuación, se retiró el medio y se añadieron 500 µl por pocillo de DMSO para disolver los cristales de formazán (MTT reducido). Tras una incubación de 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y agitación, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm, utilizando un lector automático ULTRA Evolution (Tecan; Männedorf, Suiza).

### 2.5.2. *Contaje celular*

Para los experimentos de contaje, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad entre 10.000 y 150.000 células por pocillo, dependiendo del tipo celular y el tiempo de tratamiento, y se cultivaron igual que en el caso anterior. Una vez finalizado el tratamiento, se tripsinizaron las células y se diluyeron en ISOTON® (Beckman Coulter, Brea, California, Estados Unidos) para proceder a su contaje en un contador de partículas *Z1 Coulter Particle Counter* (Beckman Coulter).

En ambos ensayos, los resultados están representados como la media  $\pm$  la desviación estándar (d.e.) de los triplicados de un experimento representativo. Los valores de IC50 se calcularon usando el programa GraphPad Prism versión 5.0.

## 2.6. Imagen por contraste de fases

Para la adquisición de imágenes representativas de la morfología de los cultivos celulares, se sembraron las células en placas de 6 pocillos a baja densidad (entre 5.000 y 20.000 células, dependiendo del tipo celular) y se cultivaron toda la noche en su medio. Al día siguiente, se realizaron los tratamientos correspondientes durante el tiempo indicado.

La observación y la toma de fotografías de las células se realizaron mediante microscopía de contraste de fases con el objetivo 20X, utilizando un microscopio Axiovert 135 (Zeiss; Oberkochen, Alemania) equipado con una cámara Hamamatsu (Hamamatsu Photonics; Tokio, Japón). Las imágenes se adquirieron con el programa OpenLab version 5.0.

70

## 3. TRABAJO CON RNA Y DNA

### 3.1. Extracción de RNA

El RNA celular se obtuvo mediante el método de extracción fenólica (Chomczynski y Sacchi 1987), modificado en el protocolo del TRIzol™, de Invitrogen. Una vez alcanzada una confluencia del 80-90%, se lavaron las placas de cultivo con PBS frío y se añadió 1 ml de TRIzol™ (solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina) por placa de 100 mm. Con la ayuda de un raspador, se levantaron y recogieron las células en tubos Eppendorf de 1,5 ml, donde se incubaron a temperatura ambiente 5 minutos, para permitir la disociación completa de los complejos núcleoproteicos. A continuación se añadieron 200 µl de cloroformo y, tras agitar vigorosamente durante 15 segundos, se volvieron a incubar a temperatura ambiente 2-3 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Tras la centrifugación se formaron tres fases, una inferior orgánica (proteínas), una interfase sólida de color blanco (DNA) y una superior acuosa (RNA). Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se precipitó el RNA con 500 µl de isopropanol, mediante una incubación de 10 minutos seguida de una centrifugación a

12.000 rpm a 4°C. Tras la precipitación, se eliminó el sobrenadante, se lavó el pellet de RNA con 1 ml de etanol 75%, se centrifugó para retirar el alcohol y se dejó secar el precipitado parcialmente, hasta que se resuspendió en agua libre de RNasas. La concentración de RNA se determinó en un NanoDrop™. Las muestras se conservaron a -80°C hasta su utilización.

## 3.2. *Microarrays de RNA*

### 3.2.1. *Purificación del RNA*

El RNA resultante de la extracción con TRIzol™ se limpió y purificó a través de columnas, mediante el kit *RNeasy mini kit* (Qiagen; Hilden, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante.

### 3.2.2. *Cuantificación y análisis de la calidad del RNA*

La cuantificación, así como la evaluación de la integridad y calidad del RNA se llevó a cabo mediante el sistema *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies; Santa Clara, California, Estados Unidos). Para cada muestra, el bioanalizador calcula la relación entre las áreas de las bandas ribosomales 28S y 18S, que idealmente debe estar entre 1,8 y 2,1, siendo este parámetro utilizado como indicador de la calidad de la muestra.

### 3.2.3. *Preparación de las muestras e hibridación*

Se partió de 3 µg totales de RNA. El cDNA de doble cadena y el posterior cDNA biotinilado se sintetizaron usando un cebador T7-polyT y el kit *BioArray RNA labeling kit* (Enzo Life Sciences; Farmingdale, Nueva York, Estados Unidos), respectivamente. A continuación, se fragmentó el RNA marcado y se hibridó con *HG-U133 plus 2.0 GeneChip oligonucleotide arrays* (Affymetrix, Santa Clara, California, Estados Unidos). La cuantificación de las intensidades de fluorescencia de las distintas pruebas presentes en el *array* se realizó usando un *GenArray Scanner* (Hewlett-Packard; Palo Alto, California, Estados Unidos). Para cada una de las muestras o condición, se hibridaron tres réplicas biológicas diferentes.

#### 3.2.4. Análisis de datos

Los pasos 3.2.2 y 3.2.3 fueron llevados a cabo por personal del servicio de Genómica, que devuelve los datos crudos en formato CEL. Los archivos sin procesar se normalizaron mediante el algoritmo RMA implementado en el programa Expression Console version 1.4.1 (Affymetrix). Los genes que presentaron una expresión diferencial se identificaron usando el programa Transcriptome Analysis Console (TAC) versión 3.0 (Affymetrix), seleccionando todos los genes que presentaron una tasa de cambio o *fold change*  $\geq 2$  y un *p*-valor de ANOVA  $\leq 0,05$ .

72

Los análisis de enriquecimiento se realizaron mediante la herramienta *online* Enrichr (Chen *et al.* 2013, Kuleshov *et al.* 2016). Los datos de los *microarrays* están disponibles en la base de datos GEO (GSE100192).

### 3.3. Síntesis de cDNA

La síntesis del DNA complementario al mRNA se llevó a cabo mediante el sistema de retrotranscripción de Invitrogen, basado en la enzima transcriptasa reversa MMLV-RT (200 U/ $\mu$ l). Se utilizaron oligonucleótidos poliT (timidina) como cebadores.

Se partió de 2  $\mu$ g de RNA por cada muestra para el cDNA. Para cada reacción se preparó una mezcla que incluía 1  $\mu$ l de 10 mM dNTPs Mix, 1  $\mu$ l de oligo dT (*stock* a 1  $\mu$ g/ $\mu$ l) y H<sub>2</sub>O milliQ hasta 12  $\mu$ l. Se calentaron las muestras durante 5 minutos a 65°C y tras ese tiempo se añadieron el resto de componentes en el siguiente orden: 4  $\mu$ l de tampón de reacción 5X (*First-Strand Buffer*), 2  $\mu$ l de 0,1 M DTT (*dithiothreitol*), 1  $\mu$ l RNaseIN (*Recombinant Ribonuclease Inhibitor*, 40 U/ $\mu$ l). Se mezclaron cuidadosamente los componentes y se incubaron 2 minutos a 37°C. A continuación se añadió 1  $\mu$ l de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (200 U) y se realizó la reacción de retrotranscripción durante 50 minutos a 37°C. Para inactivar la enzima, se calentaron las muestras a 70°C durante 15 minutos.

### 3.4. PCR semicuantitativa

La expresión de los distintos genes de interés se analizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cuyos componentes se detallan a continuación:

- Tampón comercial (20 mM MgCl<sub>2</sub>; 750 mM Tris-HCl pH 9; 500 mM KCl; 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): 1X
- Mezcla de nucleótidos (dNTPs): 0,2 mM
- Oligonucleótido sentido: 0,2 μM
- Oligonucleótido antisentido: 0,2 μM
- cDNA molde: 0,5 μg
- Taq DNA polimerasa: 1 U
- H<sub>2</sub>O milliQ: hasta 20μl

Adicionalmente, para cada gen analizado se incluyó un control negativo con todos los componentes de la mezcla anterior, pero sin cDNA molde.

La reacción tuvo lugar en un termociclador (PerkinElmer; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) con un programa constituido por las siguientes etapas:

- Desnaturalización inicial: 94°C durante 5 minutos.
- Reacción cíclica: 30-35 ciclos de:
  - 30 segundos a 94°C (desnaturalización)
  - 30 segundos a 58-60°C (anillamiento de los oligonucleótidos)
  - 1 minuto a 72°C (extensión)
- Extensión final: 72°C durante 10 minutos.

El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% diluida en tampón TAE 1X (2 M Tris; 0,05 M EDTA), con 2 μg/ml de bromuro de etidio. Las bandas correspondientes a los fragmentos amplificados

fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta *GELDoc 2000* (Bio-Rad). Los tamaños de los diferentes fragmentos, fueron determinados con el marcador de peso molecular *100 bp DNA ladder* de Invitrogen.

Para diseñar los oligonucleótidos se utilizó como secuencia de referencia las secuencias de mRNA de los genes de interés sin intrones, disponibles en la base de datos pública Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)), y el programa primer3 (MIT). Los oligonucleótidos utilizados se describen en la tabla 7.

**Tabla 7. Oligonucleótidos para PCR y qRT-PCR.**

Gen	Referencia	Secuencia (5'-3')	Amplicón
<i>EGF</i>	EGF FW	TCA GGG AAG ATG ACC ACC AC	169 pb
	EGF RV	TCT CGG TAC TGA CAT CGC TC	
<i>TGFA</i>	TGFA FW	GAA GCC ACA AAG CCG GTA AA	188 pb
	TGFA RV	ATA CTT ACC GAG GGC TCA CG	
<i>AREG</i>	AREG FW	GCT GCC TTT ATG TCT GCT GT	229 pb
	AREG RV	CAC TGG AAA GAG GAC CGA CT	
<i>BTC</i>	BTC FW	CAC CAC ACA ATC AAA GCG GA	153 pb
	BTC RV	ACT CTC TCA CAC CTT GCT CC	
<i>HBEGF</i>	HBEGF FW	TGG TGC TGT CAT CTG TCT GT	209 pb
	HBEGF RV	GTC TTT CCC CTC TGC AGT CT	
<i>CSPG5</i>	CSPG5 FW	TGA CGG TGT TCT TTG CCA AG	191 pb
	CSPG5 RV	GCA GGA CTT GAG AAC CTC CT	
<i>EREG</i>	EREG FW	CGT GTG GCT CAA GTG TCA AT	235 pb
	EREG RV	TGG AAC CGA CGA CTG TGA TA	
<i>EPGN</i>	EPGN FW	TGA CAG CAC TGA CCG AAG AG	188 pb
	EPGN RV	CTC ATG GTG GAA TGC ACA AG	
<i>GAPDH</i>	GAPDH FW	TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC	87 pb
	GAPDH RV	GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG	
<i>PP1A</i>	PP1A FW	ACC GCC GAG GAA AAC CGT GTA	129 pb
	PP1A RV	TGC TGT CTT TGG GAC CTT GTC TGC	
<i>TUBB1</i>	TUBB FW1	GTT TGC ACC TCG CTG CTC	625 pb
	TUBB RV1	TTC ATG ATG CGA TCA GGG TA	
	TUBB FW2	ACC TTC AGT GTG GTG CCT TC	642 pb
	TUBB RV2	CTT GAA GAG CTC CTG GAT GG	
	TUBB FW3	GCA GAT GCT TAA CGT GCA GA	447 pb
TUBB RV3	AGA GGC AGC AAA CAC AAA TTC		

FW: *forward*, oligo "sentido"; RV: *reverse*, oligo "antisentido"; pb: pares de bases.



### 3.5. PCR cuantitativa

La cuantificación de la expresión de los distintos genes de interés se llevó a cabo mediante qRT-PCR (*quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*). Para llevar a cabo la reacción, se añadió una mezcla conteniendo 1X SYBR® *Select Master Mix for CFX* (Applied Biosystems; Foster City, California, Estados Unidos) y 160 nM de cada oligonucleótido a 5 µL de una dilución 1:25 de cDNA, hasta un volumen final de 25 µL.

Adicionalmente, para cada gen analizado se incluyó un control negativo con todos los componentes de la mezcla anterior, pero sin cDNA molde. Todas las reacciones se llevaron a cabo en duplicado en un termociclador *iQ™5 Multicolor Real Time PCR Detection System* (Bio-Rad), con un programa constituido por las siguientes etapas:

- Desnaturalización inicial: 95°C durante 5 minutos.
- Reacción cíclica: 40 ciclos de:
  - 30 segundos a 95°C (desnaturalización)
  - 30 segundos a 60°C (anillamiento de los oligonucleótidos)
  - 30 segundos a 72°C (extensión)
- Extensión final:
  - 1 minuto a 95°C
  - 1 minuto a 72°C

Para el análisis cuantitativo de la expresión génica, los valores de expresión relativa se calcularon de acuerdo a la fórmula:  $\text{Expresión relativa del gen} = 2^{-(\text{Ct gen de referencia} - \text{Ct gen})}$ . Se calculó la expresión media y la desviación estándar para cada duplicado.

Los oligonucleótidos se diseñaron igual que para la PCR semicuantitativa, asegurando que el producto de PCR resultante de la amplificación no superase los 250 pares de bases.

## 4. TÉCNICAS DE INMUNODETECCIÓN

### 4.1. Western blot

#### 4.1.1. Preparación de lisados celulares

Para la obtención de lisados celulares, las placas de cultivo con las células adheridas se lavaron dos veces con PBS frío y, posteriormente, se incubaron durante 10 minutos con tampón de lisis frío, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (20 mM Tris pH 8; 140 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 10% glicerol; 5 mM EDTA; 1 mM ortovanadato sódico; 10 mM  $\beta$ -glicerol fosfato; 10 mM fluoruro sódico; 10  $\mu$ g/ml aprotinina; 10  $\mu$ g/ml leupeptina; 0.5  $\mu$ g/ml pepstatina; 1 mM PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*; fluoruro de fenilmetilsulfonilo) (modificado de Cabrera *et al.* 1996)). Las células se dispersaron mecánicamente con ayuda de un raspador y, tras recoger los extractos celulares en tubos de 1,5 ml, se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C y 12.000 rpm, en una centrífuga refrigerada (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Posteriormente, los sobrenadantes clarificados se transfirieron a nuevos tubos. Tanto el PBS como el tampón de lisis se mantuvieron en frío y todo el proceso se llevó a cabo en hielo. Los extractos proteicos se cuantificaron por el método colorimétrico descrito por Bradford (Bradford 1976), usando BSA como estándar de proteína, o por el ensayo del ácido bicinconínico (BCA, *bicinchoninic acid*) mediante el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante.

La detección de las proteínas se llevó a cabo utilizando el método de Western blot, bien directamente en extracto, mezclando la cantidad necesaria con tampón de carga 2X (4% SDS; 0,05% azul de bromofenol; 20% glicerol; 2%  $\beta$ -mercaptoetanol; 100 nM Tris-HCl; pH 6,8), o mediante inmunoprecipitación, en

caso de que fuese necesario enriquecer la muestra en la proteína de interés. Una vez preparadas las muestras, se calentaron durante 7 minutos a 100°C.

#### **4.1.2. Preparación de lisados a partir de muestras de tumores**

Las muestras de pacientes se obtuvieron en el Hospital Universitario de Salamanca. El tejido fresco de los tumores primarios se embebió en OCT y luego en isopentano, y se almacenó a -80°C. Se realizó una tinción con hematoxilina/eosina para llevar a cabo la selección del tejido tumoral, mediante la escisión de parte del tejido de la pieza.

Las muestras de tumores y órganos procedentes de los xenoinjertos de ratón se obtuvieron tras sacrificar a los animales y fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido.

En ambos casos, los tumores fueron troceados, lavados con PBS y homogeneizados (Dispomix) en tampón de lisis frío (1,5 ml por cada 100 mg de muestra), con una concentración 10 veces superior de inhibidores de proteasas que la empleada para lisados celulares. Tras el procesamiento de las muestras, se centrifugaron a 10.000g durante 20 minutos a 4°C, en una centrífuga refrigerada y los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos.

#### **4.1.3. Inmunoprecipitación**

Para la inmunoprecipitación, se utilizó 1-2 mg de extracto proteico junto con el anticuerpo correspondiente y 60 µl de proteína A-Sefarosa® o GammaBind G-Sefarosa® (en función del tipo de inmunoglobulina del anticuerpo). Esta mezcla se mantuvo en agitación a 4°C durante al menos 2 horas. Posteriormente, se lavaron los complejos inmunes tres veces con 1 ml de tampón de lisis frío y cada muestra se resuspendió en 30 µl de tampón de carga. Una vez preparadas las muestras, se hirvieron durante 7 minutos a 100°C.

#### 4.1.4. *Inmunoprecipitación en superficie*

Para la inmunoprecipitación en superficie, se cultivaron las células en placas de 100 mm, se lavaron dos veces con *Krebs-Ringer-HEPES buffer* (KRH; 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6 mM glucosa; 25 mM HEPES; pH 7,4 (Cabrera *et al.* 1996)) y se incubaron 2 horas a 4°C con 10 nM T-DM1 en 1 ml de KRH. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS y se lisaron las células. Los restos celulares se retiraron mediante una centrifugación de 10 minutos a 10.000g y 4°C y los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos con proteína A-Sefarosa®.

78

#### 4.1.5. *Electroforesis y detección de proteínas*

La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli 1970). Para ello, se cargaron las muestras hervidas en el gel montado en cubetas *Mini-PROTEAN*®3 (Bio-Rad) o en cubetas grandes de tipo *Sturdier*. El porcentaje de poliacrilamida en los geles varió en función del tamaño de la proteína de interés. Las proteínas se separaron sometiendo los geles a un voltaje constante de 120 V, en el caso de geles pequeños, o 200 V para geles grandes, en tampón de electroforesis (20 mM Tris-HCl; 192 mM glicina; 1% SDS), hasta que el frente de colorante del tampón de carga salió del gel.

Una vez finalizada la electroforesis, se transfirieron las proteínas separadas por SDS-PAGE a una membrana de PVDF (*polyvinylidene difluoride*; difluoruro de polivinilideno). Para ello se utilizó el sistema *Trans-Blot*® de Bio-Rad (transferencia húmeda) en tampón de transferencia (20 mM Tris-HCl; 192 mM glicina) a un amperaje constante de 500 mA durante un intervalo de tiempo fijado en función del porcentaje de acrilamida del gel utilizado y sus dimensiones (entre 70 minutos y 3 horas), o a un voltaje constante de 20 V durante 14 horas.

A continuación se bloquearon las membranas durante al menos una hora con 1% de BSA en TBS-T (*Tris-buffer saline with Tween*; 140 mM NaCl; 0,05% Tween; 10 mM Tris pH 7,5), para prevenir las uniones no específicas, y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en tampón de bloqueo, durante al menos 2 horas. Posteriormente, se realizaron tres lavados, de 7 minutos cada uno, con TBS-T y se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) durante media hora. Tras realizar nuevamente tres lavados con TBS-T, se visualizaron las bandas por autorradiografía con un sistema de detección basado en la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno y potenciado con *p*-iodofenol (Cabrera *et al.* 1996). Para ello se incubaron durante 1 minuto en tampón de revelado (0,08% luminol; 0,02% *p*-iodofenol; 0,1 M Tris-HCl; pH 9,3) al que previamente se le añadió 0,44 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De forma alternativa, se incubaron las membranas con anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos DyLight®688 o DyLight®800 durante media hora y, tras realizar tres lavados con TBS-T, se visualizaron las bandas con el sistema de imagen infrarroja Odyssey® (LI-COR; Lincoln, Nebraska, Estados Unidos). Todas las incubaciones se llevaron a cabo en un balancín y los lavados, en una plataforma con agitación orbital.

La cuantificación de las bandas obtenidas por Western blot correspondientes a las proteínas de interés se llevó a cabo con el programa ImageJ versión 1.61 (U. S. National Institutes of Health (Schneider *et al.* 2012)).

#### **4.1.6. Arrays de proteínas**

Para evaluar de manera simultánea la fosforilación de múltiples tirosina quinasas humanas, se llevaron a cabo *arrays* de anticuerpos comerciales (*proteome profiler human phospho-RTK array kit* y *proteome profiler human phospho-RTK array kit*, R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello, se hibridaron 300 µg de lisado celular de cada muestra con cada membrana del kit. La cuantificación de la intensidad de píxel de los diferentes puntos, correspondientes a tirosina quinasas, así como

controles positivos y negativos, se realizó mediante el programa Image Studio V5.2 (LI-COR).

Alternativamente, se prepararon *arrays* de anticuerpos en el laboratorio. Para ello, se añadió en duplicado 1  $\mu$ l de cada anticuerpo (1  $\mu$ g) a una membrana de nitrocelulosa, que se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se bloqueó 2 horas en TBS-T con 5% de BSA y se incubó con 1 mg de los lisados de proteínas durante toda la noche a 4°C. Se realizaron tres lavados, de 10 minutos cada uno, con TBS-T y se incubaron 2 horas con el anticuerpo anti-fosfo-tirosina conjugado a HRP. El protocolo se continuó de la misma manera que para un WB convencional y la cuantificación se llevó a cabo igual que para los *arrays* comerciales. Como controles negativos se incluyeron Ig y PBS.

## 4.2. Inmunofluorescencia

### 4.2.1. Epifluorescencia y microscopía confocal

Para la inmunofluorescencia indirecta, las células cultivadas sobre cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS suplementado con 1 mM CaCl<sub>2</sub> y 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> (PBS/CM) y se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS/CM durante 30 minutos. A continuación se lavaron dos veces con PBS/CM y se minimizó la autofluorescencia mediante una incubación con NH<sub>4</sub>Cl en PBS/CM durante 10 minutos (*quenching*). Las células se permeabilizaron con 0,1% de Tritón-X100 en PBS/CM 10 minutos y se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con 0,2% de BSA en PBS/CM durante 1 hora. Posteriormente, se incubaron los cubreobjetos con los anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo durante una hora. Tras tres lavados de 10 minutos cada uno en solución de bloqueo, se incubaron las células con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con fluorocromos. Tras tres lavados de 10 minutos cada uno en PBS/CM con 0,2% BSA, los núcleos de las células marcadas se contrastaron con DAPI 1  $\mu$ g/ml diluido en H<sub>2</sub>O milliQ. Los cubreobjetos se fijaron a portaobjetos de vidrio con Gelvatol (12% mowiol; 30% glicerol; 0,12 M Tris pH 8,5).

Para la detección de T-DM1, las células se cultivaron sobre cubreobjetos y se trataron con 10 nM T-DM1 durante 15 minutos a 37°C, seguido de dos lavados con PBS. Tras este pulso, se permitió a las células crecer en su medio de cultivo los tiempos indicados. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS/CM y se fijaron con paraformaldehído igual que en el caso anterior. Para el marcaje de orgánulos ácidos, se añadió 100 nM de *Lysotracker™ Red DND-99* (Molecular Probes; Eugene, Oregón, Estados Unidos Eugene) 30 minutos antes del paso de lavado y fijación. Se continuó el protocolo como se indicó previamente, obviando el paso de anticuerpo primario.

Las células se analizaron mediante un microscopio de epifluorescencia Axioplan 2 (Zeiss) o un microscopio confocal de fluorescencia, con el sistema *Leica TSC SP5 system* (Leica Microsystems; Wetzlar, Alemania), utilizando un objetivo 60X. Las imágenes confocales se adquirieron y analizaron con el programa *Leica Application Suite Advanced Fluorescence* (LAS AF Version 2.6.3.8173; Leica Microsystems). Las imágenes de proyecciones máximas de *z-stacks* se adquirieron y analizaron con el microscopio *Spectral Confocal Microscope FV1000* (Olympus; Tokio, Japón).

Los estudios de colocalización se llevaron a cabo con el programa LAS AF o con el ImageJ. En el primer caso, el programa analiza la dispersión de las señales de fluorescencia dentro de una “región de interés” (ROI, *region of interest*) que contiene las células y devuelve un porcentaje medio de la tasa de colocalización entre T-DM1 y LysoTracker™. Este valor se calcula como el ratio entre el área de señal de fluorescencia que colocaliza y el área del primer plano de la imagen. En el segundo caso, para estudiar la colocalización entre T-DM1 y LAMP1, se utilizaron los *plugins* “*colocalization*” y “*analyze particles*” del ImageJ.

#### 4.2.2. Time lapse

Para los ensayos de microscopía en célula viva, se acopló T-DM1 al fluorocromo DyLight®550 con el kit *DyLight® Antibody Labeling Kit* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se sembraron las

células en placas de cultivo con base de vidrio (*μ-Dish 35 mm, high, Glass Bottom*; Ibidi; Martinsried, Alemania) y se trataron con 10 nM DyLight®550-T-DM1 durante 30 minutos a 4°C. Tras el pulso, se realizaron dos lavados con PBS, se añadió medio fresco y se tomaron imágenes de las células vivas cada 20 minutos durante un período de 72 horas en un sistema *DeltaVision* acoplado a un microscopio Olympus IX71 automatizado, con un objetivo 63X (GE Healthcare). Se utilizó el programa de análisis de datos y deconvolución SoftWoRx (GE Healthcare). Para los ensayos de *time lapse* a largo plazo, las células fueron tratadas como en el caso anterior y mantenidas en el incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 72 horas. A partir de ese momento, se adquirieron imágenes cada 20 minutos durante un período de 48 horas, resultando un tratamiento experimental total de 120 horas.

## 5. CITOMETRÍA DE FLUJO

### 5.1. Ciclo celular

El análisis del ciclo celular se llevó a cabo mediante marcaje de las células con yoduro de propidio (PI, *propidium iodide*), un agente intercalante del DNA que permite cuantificar su contenido utilizando la técnica de citometría de flujo.

Para el análisis del ciclo celular, se sembraron las células en placas de 6 pocillos a una densidad de 10.000 células por pocillo, se dejaron en su medio hasta que se adhirieron a la placa de cultivo y, a continuación, se llevaron a cabo los tratamientos indicados. Una vez finalizados, se recogieron las células no adheridas presentes en el medio y las células adheridas a la placa (mediante tripsinización) y, tras un lavado con PBS, se fijaron y permeabilizaron con 1 ml de etanol 70% frío durante toda la noche a -20°C. Los pellets de células se resuspendieron en 500 μl de PBS con 0,2 mg/ml de *DNase-free RNase* (Sigma-Aldrich). Se incubó la mezcla en oscuridad a 37°C durante 2 horas y, a continuación, se añadió 5 μg/ml de PI (Sigma-Aldrich). Por último, se adquirieron las células (50.000 eventos por muestra) en un citómetro *BD Accuri C6 Flow Cytometer* (BD Biosciences) a baja



velocidad y se analizó el contenido de DNA mediante el programa C6 (BD Biosciences). Para ello, se excluyeron los agregados celulares y se calcularon los porcentajes de células en las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>/M del ciclo celular.

## 5.2. Apoptosis

El análisis de apoptosis o muerte celular programada se llevó a cabo marcando las células con PI y Anexina V-FITC (*fluorescein isothiocyanate*).

Una vez finalizados los tratamientos indicados, se recogieron las células no adheridas presentes en el medio y las células adheridas a la placa (mediante tripsinización) y, tras un lavado con PBS, se resuspendieron en 100 µL de tampón de unión o *binding buffer* 1X frío (0,1 M HEPES/NaOH pH 7,4; 1,4 M NaCl; 25 mM CaCl<sub>2</sub>) conteniendo 5 µl de anexina V-FITC y 5 µl de solución de PI (50 mg/ml). Las muestras se mezclaron suavemente con vortex y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, se añadieron 400 µl de *binding buffer* 1X a cada muestra. Por último, se adquirieron las células (50.000 eventos por muestra) en un citómetro *BD Accuri C6 Flow Cytometer*, a velocidad media, y se analizaron los datos mediante el programa C6.

## 5.3. Pérdida de potencial de membrana mitocondrial

La disfunción mitocondrial dentro del proceso de muerte celular está frecuentemente asociada con la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial. Una técnica que permite medir alteraciones en la membrana es el marcaje con TMRE (*tetramethylrhodamine, ethyl ester*; tetrametilrodamina, etil ester), un fluorocromo catiónico que se acumula en la mitocondria.

Una vez finalizados los tratamientos indicados, se incubaron las células con 0,5 µM TMRE durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Pasado ese tiempo, se recogieron las células no adheridas presentes en el medio y las células adheridas a la placa (mediante tripsinización suave, para no dañar las células) y se

centrifugaron a 300g durante 5 minutos a 10°C. Finalmente, se resuspendió el pellet en 500 µl de PBS y se adquirieron las células (50.000 eventos por muestra) en un citómetro *BD Accuri C6 Flow Cytometer*, a velocidad media. Los datos se analizaron mediante el programa C6.

#### 5.4. Marcaje en superficie

Para el análisis de los niveles de proteínas en superficie, o de T-DM1, se cultivaron las células en placas de 60 mm, se lavaron con PBS y se recogieron mediante la incubación a 37°C con 0,05% tripsina-EDTA. Tras lavar con PBS suplementado con 1% FBS (PBS/FBS), se centrifugaron las células y se resuspendieron en 1 ml de PBS/FBS conteniendo 10 nM T-DM1 o 1 µg/ml del anticuerpo primario contra la proteína de interés. Tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron las células y se resuspendieron en 1 ml de PBS/FBS conteniendo el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con Cy3 (dilución 1:80). Se realizó una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se lavaron las células dos veces y se resuspendió el pellet en PBS. Los niveles de intensidad media de fluorescencia se determinaron con un citómetro de flujo *BD Accuri C6 flow cytometer* y el programa C6.

#### 5.5. pHrodo™

Para evaluar si T-DM1 llega a compartimentos ácidos tras su internalización se marcó el fármaco con el fluorocromo rojo pHrodo™, mediante el kit *pHrodo™ Red Microscale Labeling Kit* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. pHrodo™ es un colorante fluorogénico que no emite señal a pH neutro, pero cuya fluorescencia incrementa dramáticamente a medida que el pH del entorno se vuelve más ácido (Aziz *et al.* 2013). Analizando los cambios en la señal de fluorescencia se puede inferir si T-DM1 se encuentra en orgánulos ácidos, como los lisosomas. Para ello, se incubaron las células con 5 nM pHrodo-T-DM1

durante 15 minutos o 24 horas a 37°C, protegidas de la luz. La emisión de fluorescencia se monitorizó mediante microscopía de epifluorescencia, usando un microscopio Nikon Eclipse Ti-S (Nikon; Tokio, Japón). Para cuantificar la intensidad media de fluorescencia, se recogieron y adquirieron las células tratadas con un citómetro de flujo *BD Accuri C6 flow cytometer*. El porcentaje de células positivas para el canal FL2 de los 50.000 eventos adquiridos se analizó con el programa C6.

## 6. ESTUDIOS *IN VITRO*

### 6.1. Marcaje con biotina e internalización de T-DM1

Para estudiar su internalización, se biotiniló T-DM1 con succinimidil-2-(biotinamido)etil-1,3-ditiopropionato mediante el reactivo *EZ-Link™ NHS-SS-Biotin* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este agente contiene un puente disulfuro en su brazo espaciador, lo que permite que el fármaco marcado pueda ser procesado y liberado de la biotina tras el tratamiento con un agente reductor, como glutatión. Para realizar el marcaje, se incubó 1 ml de una solución de 2 mg/ml T-DM1 en PBS con un exceso molar de 20 veces de una solución de 10 mM NHS-SS-Biotina en DMSO (preparada inmediatamente antes de su uso), durante 40 minutos a temperatura ambiente. El exceso de NHS-SS-biotina sin reaccionar se queló con 50 mM de NH<sub>4</sub>Cl.

Las células recibieron un pulso de 30 minutos a 4°C con 10 nM de T-DM1 biotinilado, se lavaron dos veces con PBS y se dejaron en su medio de cultivo a 37°C durante distintos tiempos, para evaluar la internalización en cada punto. Transcurridos los tiempos de internalización, se colocaron las placas en hielo, se lavaron con PBS y se eliminaron los grupos biotina del T-DM1 biotinilado residual que permanecía unido a la membrana celular. Para ello, se realizaron tres lavados a 4°C, de 10 minutos cada uno, con el tampón de procesamiento frío (*glutathione cleavage buffer*: 50 mM glutatión; 75 mM NaCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>; 80 mM

NaOH; 10% FBS. El glutatión y el NaOH se añadieron inmediatamente antes de realizar los lavados y el pH del tampón se ajustó a 8,6). A continuación, se lavaron las células dos veces con PBS y se lisaron en tampón de lisis-II frío (150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10% glicerol; 40 mM HEPES pH 7,4; 1% Nonidet P-40; 1  $\mu$ M pepstatina; 1  $\mu$ g/ml aprotinina; 1  $\mu$ g/ml leupeptina; 1 mM PMSF; 1 mM ortovanadato de sodio; 25 mM  $\beta$ -glicerofosfato; 10 mM fluoruro de sodio). El T-DM1 biotinilado se inmunoprecipitó con *Streptavidin Sepharose® High Performance* (GE Healthcare) durante al menos 2 horas a 4°C. Transcurrida la incubación, se recuperaron los complejos inmunes, se lavaron y se separaron las proteínas por SDS-PAGE y Western blot convencional.

86

La cuantificación de las señales correspondientes a la cadena ligera de T-DM1 internalizado se realizó usando el programa ImageJ. La internalización se representó como el nivel de T-DM1 tras sustraer el fondo (0), relativo al máximo nivel de T-DM1 internalizado para cada línea celular.

## 6.2. Actividad de catepsinas

Para cuantificar y monitorizar la actividad de la catepsina B en los cultivos celulares, se utilizó el kit *Magic Red Cathepsin B detection kit* (Immunochemistry Technologies; Bloomington, Minnesota, Estados Unidos), siguiendo las indicaciones del fabricante. El sustrato empleado en el kit es permeable a las células, por lo que penetra fácilmente a través de la membrana celular y de las membranas internas de los orgánulos celulares; si las catepsinas están activas, el sustrato se procesa liberando el fluoróforo cresil violeta, que se vuelve fluorescente tras su excitación. A medida que la actividad enzimática progresa, más sustrato se procesa y la señal fluorescente se intensifica.

Para evaluar la actividad de la catepsina B, se incubaron  $3 \times 10^6$  células en suspensión con el sustrato MR-(RR)<sub>2</sub> durante 1 hora a 37°C protegidas de la luz, resuspendiéndolas suavemente cada 20 minutos para evitar que las células precipitasen. A continuación, la suspensión celular se repartió en 3 pocillos de una

placa de 96 pocillos y se midió la intensidad de fluorescencia en un lector de placas, a una longitud de onda de excitación de 592 nm y de emisión de 628 nm.

## 7. ESTUDIOS *IN VIVO* CON MODELOS ANIMALES

### 7.1. Cepas de ratón y mantenimiento de los animales

El manejo y mantenimiento de los animales de experimentación se llevó a cabo de acuerdo con la legislación europea y española (Directiva 2010/63/UE y Ley 6/2013, respectivamente) relativa a la protección y cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, tras la aprobación del comité institucional. Se adquirieron hembras de ratón BALB/c *nu/nu*, de siete semanas de edad y peso en torno a 20 gramos, de los Laboratorios Charles River y se mantuvieron en la zona libre de patógenos de nuestro Animalario institucional.

### 7.2. Producción de xenoinjertos

Para los estudios sobre resistencia a T-DM1 en cáncer de mama, se utilizó como modelo celular la línea del subtipo HER2+ de cáncer de mama, BT474 y los clones resistentes a T-DM1 derivados de la línea parental. Se resuspendió un total de  $5 \times 10^6$  células de cada una de las líneas celulares en 50  $\mu$ l de DMEM y 50  $\mu$ l de Matrigel (BD Biosciences), que fueron inyectadas a nivel subcutáneo en la glándula mamaria caudal de cada ratón (dos xenoinjertos por animal). Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 700 mm<sup>3</sup>, se randomizaron los animales (n = 10 por línea celular) en dos grupos con volúmenes tumorales medios similares, que fueron tratados por vía intravenosa (a través de la vena de la cola) con una única dosis del vehículo solo (PBS) o de T-DM1 (3 mg/kg). Se midieron los diámetros de los tumores con un calibre dos veces por semana y el volumen tumoral se calculó a partir de la fórmula: volumen = ancho<sup>2</sup> x longitud/2. Se sacrificaron los ratones en el día 21 de tratamiento o cuando el volumen tumoral alcanzó 2.000 mm<sup>3</sup>.

Para los estudios sobre la acción de T-DM1 en cáncer de ovario, se utilizó como modelo celular la línea de adenocarcinoma de ovario, SKOV3. Se resuspendió un total de  $5 \times 10^6$  células SKOV3 en 100  $\mu$ l de DMEM y 100  $\mu$ l de Matrigel, que fueron inyectadas a nivel subcutáneo en los dos flancos de cada ratón (dos xenoinjertos por animal). Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 200 mm<sup>3</sup>, se randomizaron los animales (n = 15) en tres grupos (5 ratones por grupo) con volúmenes tumorales medios similares, que fueron tratados por vía intravenosa (a través de la vena de la cola) con el vehículo solo (PBS), con T-DM1 (15 mg/kg) o con trastuzumab (15 mg/kg). Los ratones recibieron dos dosis de tratamiento (días 0 y 7) en la primera semana tras alcanzar el volumen determinado. Se midieron los diámetros de los tumores igual que en el caso anterior. Los ratones tratados con trastuzumab se sacrificaron en el día 28, mientras que los tratados con T-DM1 se mantuvieron para evaluar la aparición de recidivas.

## **8. MUESTRAS DE PACIENTES Y MODELOS RESISTENTES DERIVADOS DE PDXs (*PATIENT DERIVED XENOGRAFTS*)**

Se analizaron un total de 16 muestras de carcinoma de ovario (incluyendo cistoadenocarcinoma, *borderline* tumoral, carcinoma seroso y carcinoma indiferenciado) y 44 muestras de riñón (23 muestras de carcinoma renal de células claras y 21 muestras de riñón sano), todas ellas obtenidas del departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca, procedentes de pacientes diagnosticadas durante el periodo 2005-2011. Todos los pacientes proporcionaron un consentimiento informado por escrito para la recogida de las muestras y su subsecuente análisis. El procedimiento fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital de Salamanca y gestionado a través del Banco de tumores del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca. Las muestras congeladas humanas fueron inspeccionadas previamente mediante el ensayo de tinción con hematoxilina-eosina para confirmar el subtipo histopatológico.

El modelo de PDX118 se estableció a partir de una biopsia de una metástasis cutánea obtenida en el *Vall d'Hebron Institute of Oncology* (VHIO), como se ha descrito previamente (Vicario *et al.* 2015). La muestra del tumor mamario empleada en este estudio procede de una resección quirúrgica obtenida en el Hospital Universitario del Vall d'Hebron, cuyo procesamiento ha seguido la Declaración de Helsinki sobre principios éticos para la investigación médica que implica especímenes humanos. Antes de llevar a cabo los estudios moleculares, se obtuvo el consentimiento informado del paciente que proporcionó el tejido. Se utilizaron ratones NOD.CB17-Prkdcscid/J (NOD/SCID) para establecer el PDX, y se mantuvieron y trataron de acuerdo a las guías institucionales del Hospital Universitario Vall d'Hebron. Los cultivos celulares derivados del PDX118 se establecieron y caracterizaron en el VHIO, como se ha descrito previamente (Vicario *et al.* 2015). El tratamiento continuo de estas líneas con concentraciones crecientes de T-DM1 condujo a la aparición de dos líneas celulares independientes resistentes al fármaco, denominadas TD44 y TD55.

## 9. ESTUDIOS *IN SILICO*

Los análisis de expresión de EGFR y TGF $\alpha$  en líneas celulares de cáncer se llevaron a cabo a partir de los datos genómicos de acceso público disponibles en *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) (Barretina *et al.* 2012, Cancer Cell Line Encyclopedia y Genomics of Drug Sensitivity in Cancer 2015).

Los análisis de expresión de EGFR y TGF $\alpha$  en muestras de tejido sano y tejido tumoral de cohortes de pacientes con distintos tipos de cáncer se obtuvieron mediante la herramienta del *Broad Institute of MIT and Harvard, FireBrowse*.

El diseño de oligonucleótidos para PCR y qRT-PCR se realizó con el programa Primer3 (Koressaar y Remm 2007, Untergasser *et al.* 2012).

El análisis de enriquecimiento funcional de las listas de genes expresados diferencialmente obtenidas de los datos de *microarrays* se llevó a cabo con el programa Enrichr (Chen *et al.* 2013, Kuleshov *et al.* 2016).

## 10. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El análisis estadístico de los datos experimentales obtenidos en este trabajo se llevó a cabo usando el programa de análisis de datos *IBM SPSS Statistics 24* (IBM; North Castle, Nueva York, Estados Unidos). A no ser que se indique de otra manera, todos los datos están representados como la media  $\pm$  d.e.

90

Los índices de combinación de fármacos se calcularon con el algoritmo de Chou-Talalay (Chou *et al.* 1994), mediante el programa *CalcuSyn*.

La comparación de variables continuas entre dos grupos se llevó a cabo usando el test *t* de Student de dos colas o el test U de Mann-Whitney, con un nivel de significación del 5% ( $p = 0,05$ ). Salvo en los datos referentes a muestras de pacientes, todos los experimentos se llevaron a cabo al menos dos veces.



# **CAPÍTULO I**



## **Capítulo I: Resistencia a T-DM1 en cáncer de mama**

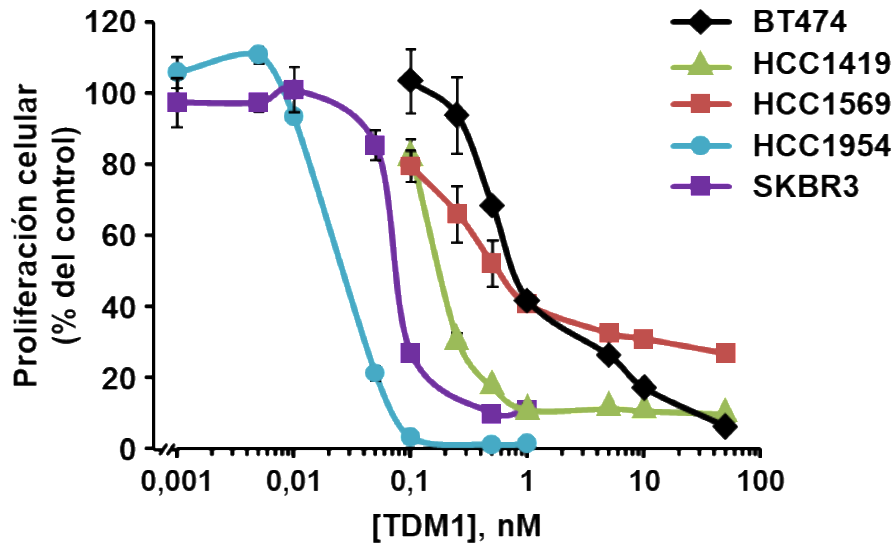
### **1. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA CON RESISTENCIA ADQUIRIDA A T-DM1**

La resistencia a fármacos es un problema grave en clínica, ya que limita la efectividad de las terapias anticancerígenas. Por desgracia, se sabe muy poco de cómo surgen estas resistencias en pacientes, sobre todo debido al limitado acceso a muestras tumorales tras los tratamientos y a la falta de ensayos clínicos enfocados a detectar marcadores de resistencia. Por todo ello, los modelos preclínicos basados en células resultan muy interesantes para extrapolar los potenciales mecanismos de resistencia que surgen tras el tratamiento crónico de los tumores (Loganzo *et al.* 2016).

93

#### **1.1. Efecto de T-DM1 en un panel de líneas celulares de cáncer de mama HER2+**

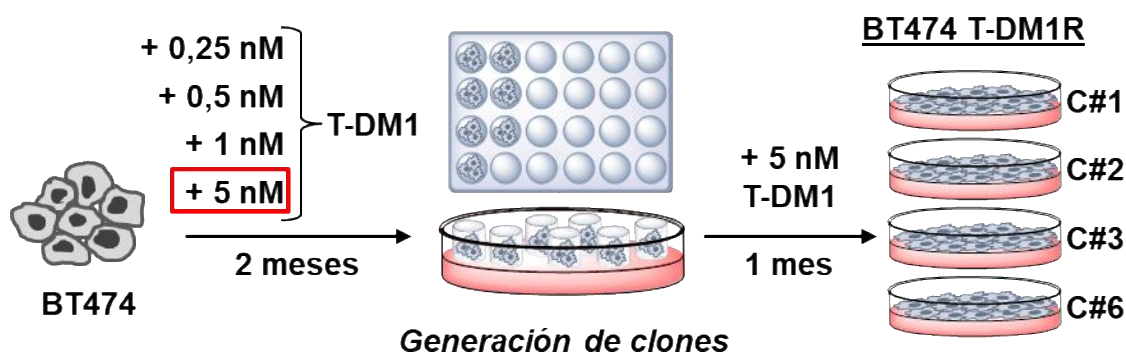
Con el fin de generar modelos de resistencia adecuados, se comenzó evaluando el efecto de T-DM1 en un panel de líneas celulares de cáncer de mama HER2+ sensibles (BT474 y SKBR3) o resistentes (HCC1419, HCC1569 y HCC1954) a trastuzumab. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de dosis-respuesta al fármaco (concentraciones de T-DM1 desde 1 pM hasta 50 nM), analizando la proliferación celular por contaje. Como se muestra en la figura 6, todas las líneas celulares testadas fueron sensibles a concentraciones nanomolares del ADC, aunque el grado de sensibilidad fue heterogéneo. La línea más sensible resultó ser HCC1954 (IC<sub>50</sub>: 0,027 nM), seguida por SKBR3 (IC<sub>50</sub>: 0,090 nM), HCC1419 (IC<sub>50</sub>: 0,169 nM) y HCC1569 (IC<sub>50</sub>: 0,585 nM). La línea celular más resistente fue BT474 (IC<sub>50</sub>: 0,962 nM).



**Figura 6. Estudio de dosis-respuesta a T-DM1 en cinco líneas celulares HER2+.** Las células se trataron con concentraciones crecientes de T-DM1 (1 pM a 50 nM) durante 5 días y se contaron. Los resultados se representan como el porcentaje de la media  $\pm$  d.e., relativo a la condición control (sin fármaco);  $n=3$ . Se muestra un experimento representativo que se repitió dos veces.

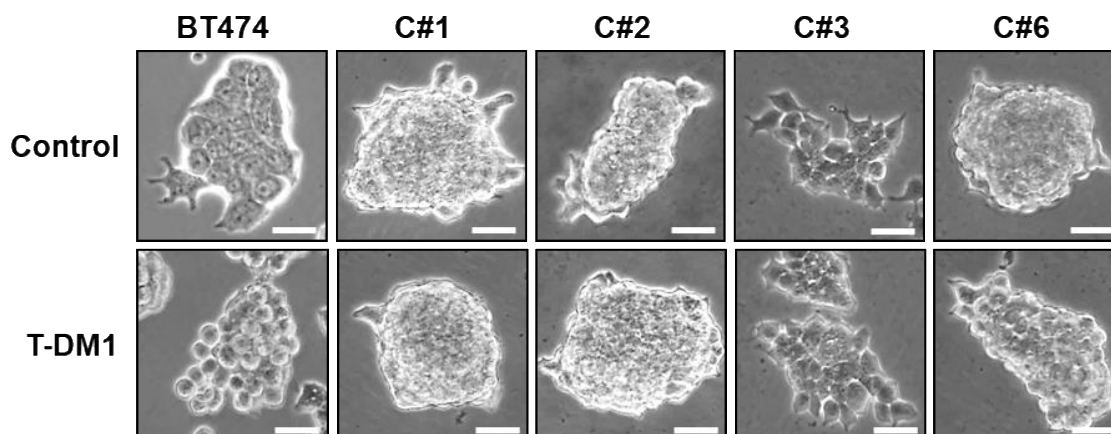
## 1.2. Generación y caracterización de clones resistentes a T-DM1

La línea celular BT474 se ha usado durante mucho tiempo como modelo celular de cáncer de mama HER2+, para estudios de la biología de HER2 y de terapias dirigidas contra dicha proteína. Por este motivo, y por ser la línea que presentó la menor sensibilidad a T-DM1, se eligió para la generación de células resistentes a T-DM1. Como se muestra en la figura 7, las células se trataron con T-DM1 durante un total de tres meses y se obtuvieron cuatro clones resistentes (C#1, C#2, C#3 y C#6).



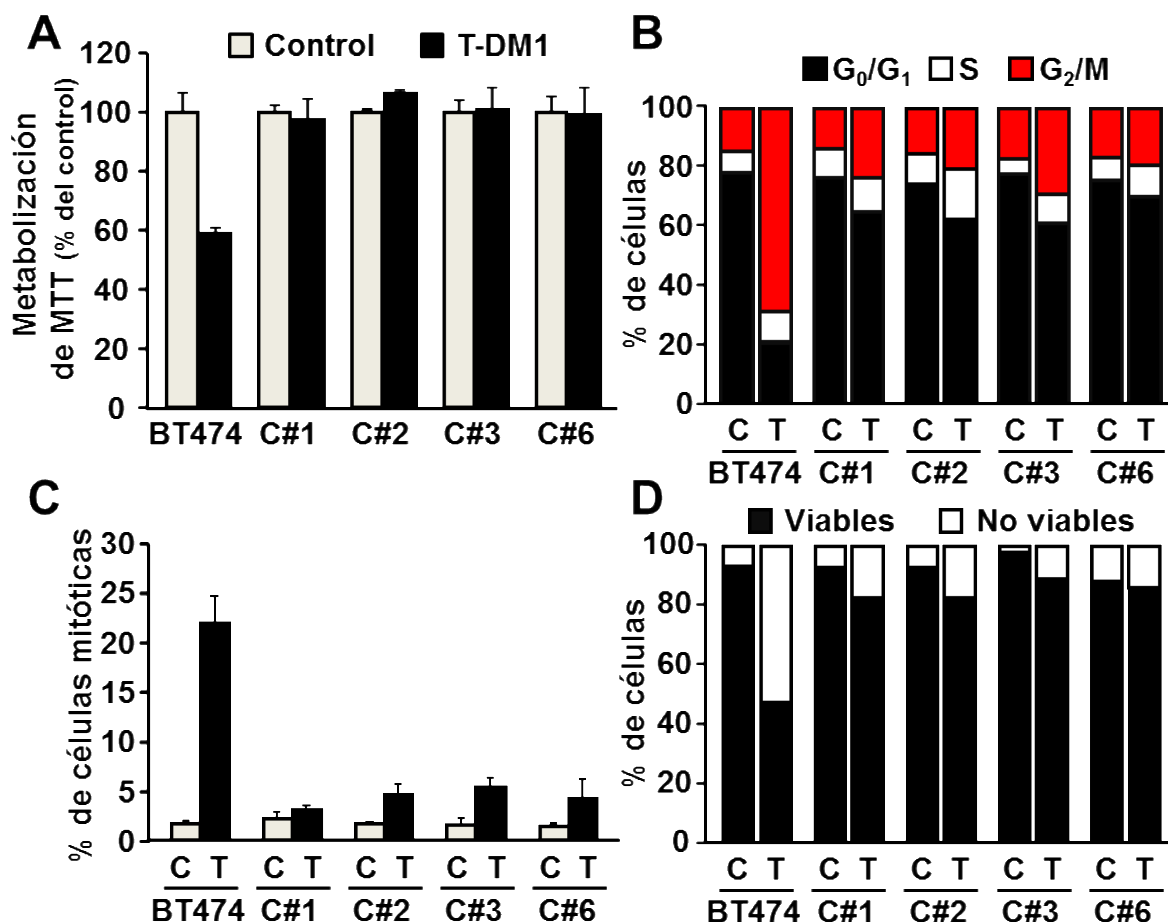
**Figura 7. Representación esquemática de la generación de líneas celulares resistentes a T-DM1.** Las células BT474 se trataron durante dos meses con las concentraciones indicadas de T-DM1 (exposición permanente al fármaco) hasta la aparición de clones resistentes, que se aislaron individualmente y se mantuvieron un mes adicional en presencia de 5 nM T-DM1. Se obtuvieron cuatro líneas celulares independientes (C#1, C#2, C#3 y C#6).

La inspección visual de los cultivos de los clones resistentes demostró que el tratamiento con T-DM1 no afectó sustancialmente su morfología, al contrario de lo que ocurría con la línea parental BT474, en la que el fármaco provocó el redondeo de las células, debido probablemente a la parada en mitosis (Figura 8). También se observó que los clones C#1, C#2 y C#6 crecían formando agregados celulares más compactos que en el caso de la línea BT474 o C#3.



**Figura 8. Cambios morfológicos inducidos por T-DM1 en la línea parental y los clones resistentes.** Las células, cultivadas en placas de 6 pocillos, se trataron con 5 nM T-DM1 durante 3 días y, a continuación, se tomaron imágenes de contraste de fases (objetivo 20X). Escala: 50  $\mu$ m.

Los experimentos de proliferación celular confirmaron que los clones eran resistentes a la acción de T-DM1, al compararlos con la línea parental (Figura 9A). Uno de los mecanismos responsables de la acción antitumoral de T-DM1 es la restricción de la progresión de las células diana a lo largo del ciclo celular. Por ello, se analizó el perfil del ciclo celular en las líneas celulares, lo que mostró que el tratamiento con T-DM1 provocaba la acumulación de las células BT474 en la fase G<sub>2</sub>/M. Por el contrario, los clones fueron muy resistentes a este efecto del fármaco (Figura 9B). El análisis cuantitativo demostró la acumulación de las células BT474 en mitosis (Figura 9C). La parada continuada de las células en mitosis debido a la acción de T-DM1 devino en la muerte celular, probablemente como consecuencia de catástrofe mitótica (Barok *et al.* 2011) (Figura 9D). Esta pérdida de viabilidad resultó marginal en los clones resistentes a T-DM1.

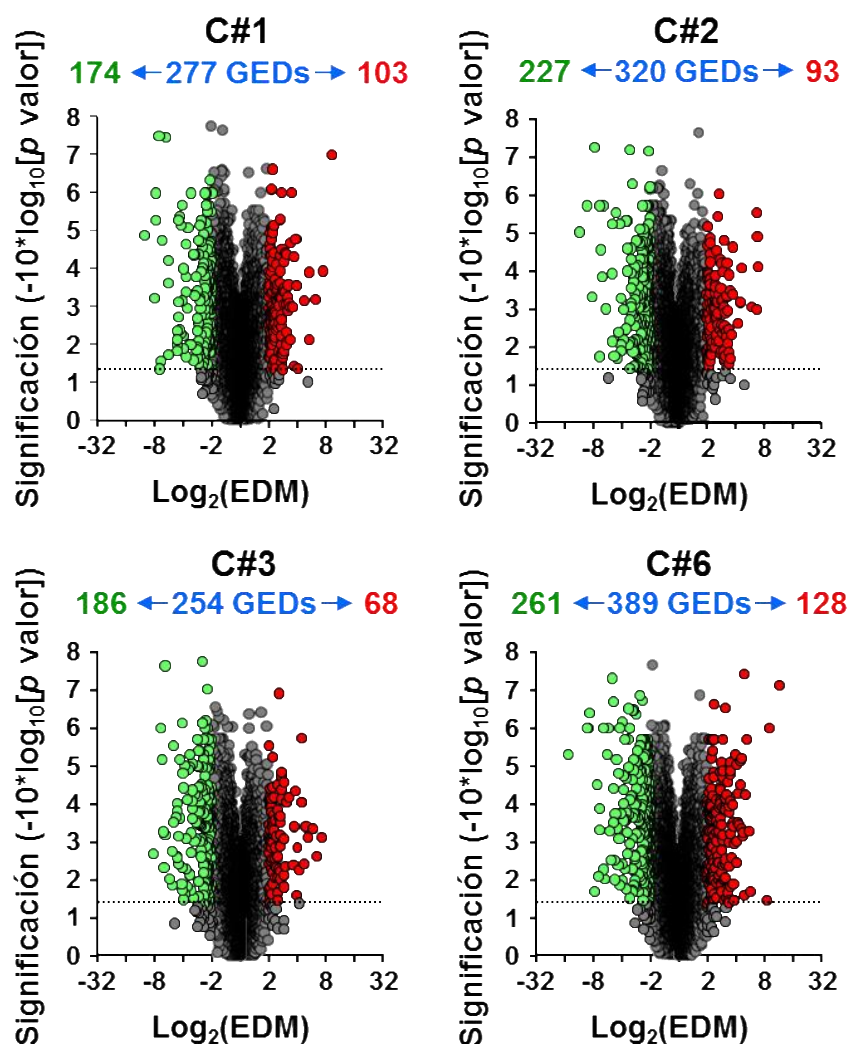


**Figura 9. Confirmación de la resistencia a T-DM1 en los clones derivados de BT474.** (A) Se trataron la línea parental BT474 y los clones resistentes con 5 nM T-DM1 y se evaluó la proliferación por metabolización de MTT a los 5 días. Los resultados se representan como el porcentaje de la media  $\pm$  d.e., relativo a la condición control (sin fármaco); n=3. Se muestra un experimento representativo que se repitió dos veces. (B) Se trataron las células y se analizó la distribución de las fases del ciclo celular por tinción con PI y citometría de flujo. Los resultados muestran el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo de un experimento representativo. (C) Se trataron las células, se fijaron con paraformaldehído y se tiñeron con DAPI para determinar las células mitóticas. Para cada condición, se contaron al menos 1.500 células. Las barras muestran el porcentaje de células mitóticas respecto al total de células contadas, como la media  $\pm$  d.e. de tres experimentos independientes. (D) Se trataron las células, se cotiñeron con anexina V-FITC y PI y se analizaron por citometría de flujo. Se representa el porcentaje de células viables (cuadrante anexina V-/PI-) y no viables (cuadrantes anexina V+/PI-, anexina V+/PI+ y anexina V-/PI+) de un experimento representativo. C: control, T: T-DM1 5 nM durante 3 días.

### 1.3. Estudio transcriptómico de los clones resistentes a T-DM1

Una vez establecidas las líneas celulares resistentes a T-DM1, se llevó a cabo un análisis de la expresión génica por *microarrays*, con el objetivo de explorar potenciales diferencias transcriptómicas entre ellas que pudieran explicar la adquisición de la resistencia. En primer lugar, se determinó el número de genes expresados diferencialmente entre cada clon con respecto a la línea parental BT474. La figura 10 muestra los gráficos de volcán correspondientes a las comparaciones de los genes expresados en cada uno de los cuatro clones resistentes frente a los genes expresados en las células BT474. De ellos se extrae que las células BT474 diferían en 277, 320, 254 y 389 genes de los clones C#1, C#2, C#3 y C#6, respectivamente.





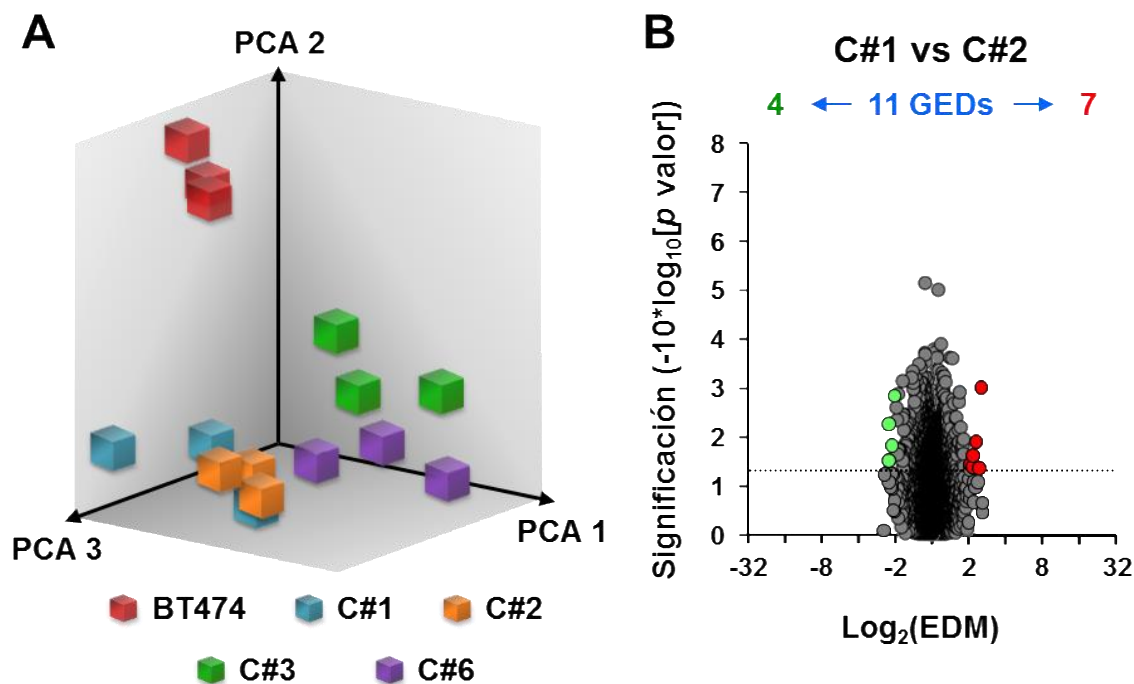
**Figura 10. Genes expresados diferencialmente (GEDs) en los clones resistentes a T-DM1 frente a la línea parental BT474.** Para determinar los GEDs, se estableció un corte de tasa de cambio (*fold change*) de 2 y un  $p$  valor  $\leq 0,05$ . Los genes que cumplieron ambos criterios están coloreados en verde (infraexpresados) y en rojo (sobreexpresados). El resto de genes se representa en color gris. El eje de ordenadas representa la significación como  $-10$  multiplicado por el logaritmo en base 10 del  $p$  valor; el eje de abscisas representa el logaritmo en base 2 de la expresión diferencial media (EDM). Los datos provienen de tres réplicas biológicas independientes.

A continuación, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA, *principal component analysis*). El PCA busca la proyección que convierte un conjunto de observaciones de variables posiblemente correlacionadas en un conjunto lineal de valores de variables sin correlación llamadas componentes principales. Se trata de una transformación lineal a un nuevo sistema de coordenadas para el conjunto original de datos, en el cual la varianza de mayor

tamaño del conjunto de datos es capturada en el primer eje (PCA1 o primer componente principal), la segunda varianza más grande es el segundo eje (PCA2) y la tercera, el tercer eje (PCA3) (Konishi 2015). En el caso de los análisis de expresión génica, este agrupamiento sería indicativo de la homogeneidad o relación entre los perfiles de expresión génica de las distintas muestras.

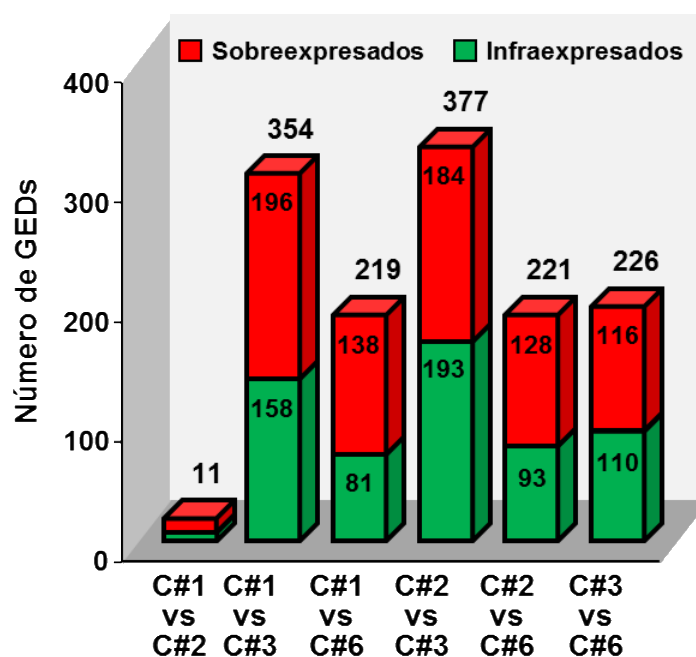
Como era de esperar, el PCA mostró un agrupamiento de las réplicas biológicas para cada línea celular, así como diferencias sustanciales entre la línea parental BT474 y los clones (Figura 11A). Cabe destacar que los clones C#1 y C#2 presentaron un alto grado de agrupamiento en el gráfico 3D del PCA; por ello, se llevó a cabo un análisis comparativo de la expresión génica, como el realizado entre los clones y la línea parental. Este análisis reveló que solo 11 genes estaban diferencialmente expresados entre ambos clones (Figura 11B).

100



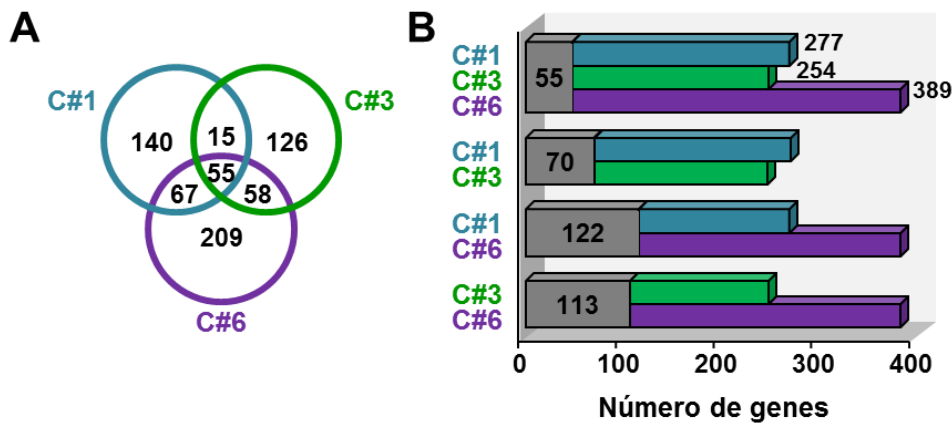
**Figura 11. Agrupamiento de las muestras en función de su expresión génica. (A)** Análisis de componentes principales de los datos obtenidos de los *microarrays*. Los ejes del gráfico muestran las tres variables que más explican la varianza dentro del conjunto de datos (PCA1, PCA2 y PCA3). Las réplicas biológicas de cada muestra están representadas en el gráfico con el mismo color. **(B)** Genes expresados diferencialmente entre los clones resistentes C#1 y C#2. El análisis se realizó como se indica en la figura 10.

El hecho de que los clones C#1 y C#2 fuesen tan parecidos abría la posibilidad de que otros clones resistentes fuesen también similares y, por ello, se realizó el mismo análisis comparativo de la expresión génica entre todos ellos. A pesar del bajo número de genes expresados diferencialmente entre la primera pareja de clones, se observó un número mucho mayor de genes al realizar la misma comparación entre el resto de clones (Figura 12). Todo ello parecía indicar que los clones C#1 y C#2 estaban constituidos por poblaciones celulares muy similares y, por esa razón, se decidió usar el clon C#1 como representativo de los dos.



**Figura 12. Genes expresados diferencialmente entre todas las líneas celulares resistentes a T-DM1.** El análisis se realizó como se indica en la figura 10. El número total de GEDs para cada comparación se indica encima de la barra correspondiente.

Una vez establecido que los clones C#1, C#3 y C#6 eran diferentes desde un punto de vista del perfil de expresión génica, se analizó qué genes diferencialmente expresados respecto a la línea parental tenían en común. Se observó que los tres clones compartían un total de 55 genes (Figura 13A y B). Los clones C#1 y C#3 compartían 70 genes; los clones C#1 y C#6, 122; y los clones C#3 y C#6, 113. Todos estos resultados sugerían que los clones C#1, C#3 y C#6 eran diferentes entre ellos, pero compartían algunos genes cuando se comparaban con la línea sensible BT474, lo que podría indicar un mecanismo común de resistencia.



**Figura 13. Genes expresados diferencialmente respecto a la línea BT474 compartidos por los clones resistentes a T-DM1. (A)** Diagrama de Venn que muestra el solapamiento de los genes que tienen niveles de expresión modificados en los clones frente a la línea parental. **(B)** Las barras coloreadas indican el número total de GEDs para cada clon (azul, C#1; verde, C#3; morado, C#6). La porción gris común a todas las barras representa el número de GEDs compartidos por los clones indicados a la izquierda.

#### 1.4. Estudios *in vivo*

Tras validar la resistencia de los clones *in vitro* y comprobar la heterogeneidad de los mismos en cuanto a morfología y perfil de expresión génica, se quiso determinar si estas características se reproducían en modelos *in vivo*. Para ello, se inyectaron ratones desnudos con células BT474 y células de los clones resistentes, y se trataron tal y como se indica en “Materiales y Métodos”.

En los ratones con xenoinjertos de BT474, el tratamiento con T-DM1 disminuyó el volumen tumoral, lo cual no ocurrió en los ratones con xenoinjertos de células procedentes de los clones (Figura 14). Sin embargo, la cinética de crecimiento de los tumores en los ratones tratados con T-DM1 varió entre los diferentes clones, lo cual iba en consonancia con la heterogeneidad observada *in vitro*. Los tumores derivados de C#1 fueron los más resistentes a la acción de T-DM1. Los derivados de C#3 mostraron una respuesta inicial a la acción del fármaco, pero no se observó regresión de la masa tumoral y, de hecho, los tumores recuperaron el crecimiento a partir del séptimo día de tratamiento. En los tumores derivados de C#6, T-DM1 pareció frenar inicialmente el crecimiento tumoral pero, al igual que lo ocurrido con los otros clones, no hubo regresión de la masa tumoral.

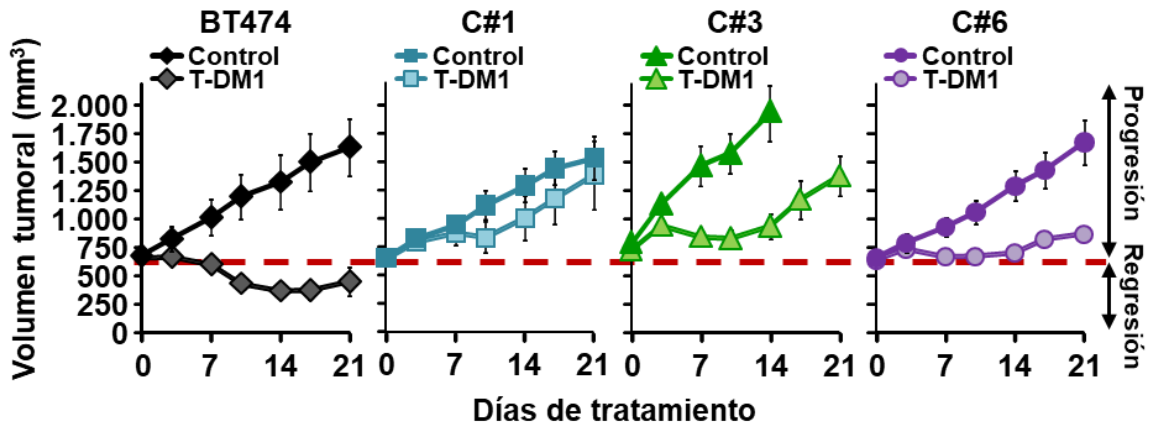


Figura 14. Efecto de T-DM1 *in vivo* en ratones inyectados con células sensibles y resistentes a T-DM1. Los ratones recibieron una única dosis de T-DM1 (día 0 de tratamiento) y los tumores se midieron dos veces por semana. Los resultados se representan como la media  $\pm$  d.e. del volumen tumoral de los ratones de cada grupo; n=5, control; n=5, T-DM1. La línea roja indica el volumen de los tumores en el momento del comienzo del tratamiento con T-DM1 (alrededor de 700 mm<sup>3</sup>), que se usó como referencia para determinar la progresión o regresión tumoral.

La baja tasa de crecimiento de los tumores derivados de C#6 permitió seguir durante más tiempo el comportamiento de los mismos. Cabe destacar que la extensión del tratamiento con T-DM1 hasta un período de 9 semanas provocó la regresión completa de los tumores derivados de la línea parental BT474 (Figura 15). Sin embargo, ese mismo tratamiento no evitó el crecimiento progresivo de las masas tumorales originadas a partir de las células C#6.

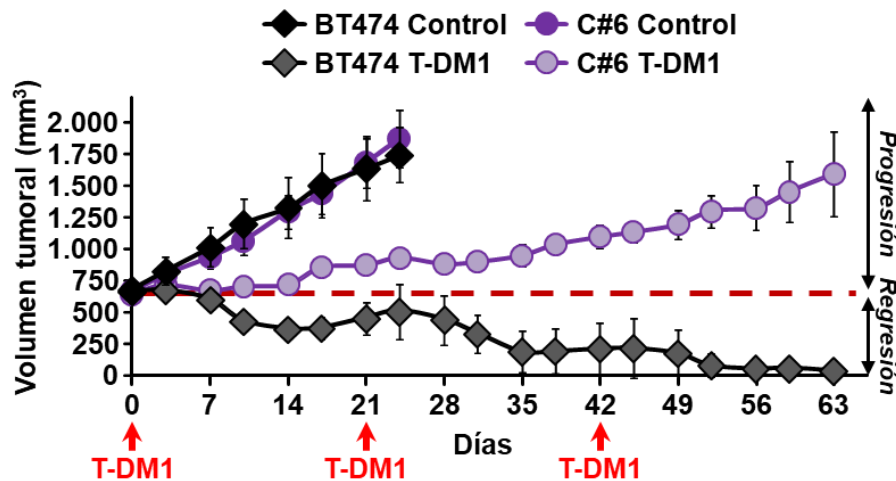
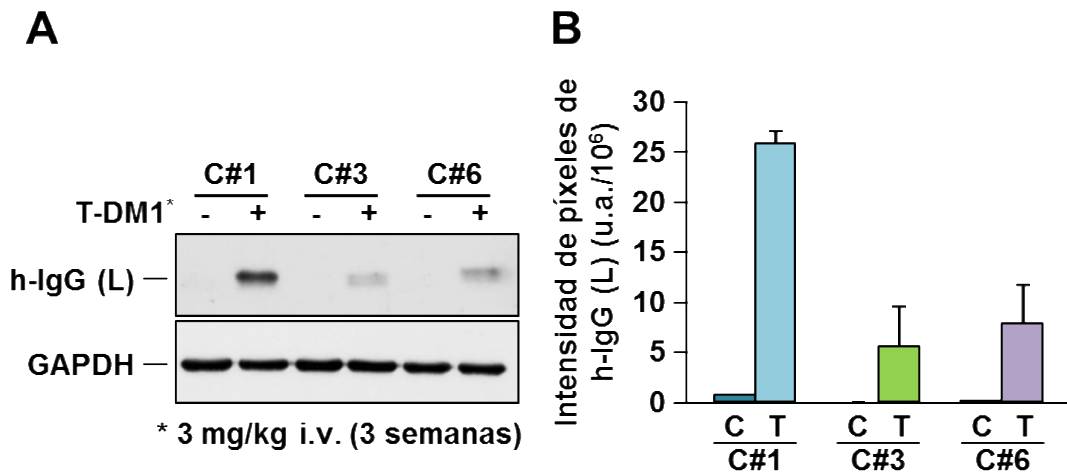


Figura 15. Efecto del tratamiento prolongado con T-DM1 *in vivo*. Los ratones inyectados con células BT474 o C#6 recibieron un total de 3 dosis de T-DM1 (una dosis cada 3 semanas) y los tumores se midieron dos veces por semana. Los resultados se representan como la media  $\pm$  d.e. del volumen tumoral de los ratones de cada grupo.

Una vez finalizado el estudio *in vivo*, se sacrificaron los animales y se obtuvieron los tumores de los ratones inyectados con las células resistentes. En el caso de la línea parental BT474, el tratamiento con T-DM1 provocó la regresión completa de los tumores, por lo que no se pudo conseguir esa muestra. Con el fin de determinar si el fármaco llegaba por igual a todos los tumores, se analizaron los niveles de T-DM1 por WB. Como era de esperar, en las muestras tumorales de los ratones control, que no recibieron el fármaco, no se detectó señal de T-DM1 (Figura 16A). Los tumores derivados de ratones inyectados con C#1 y tratados con T-DM1 acumularon el fármaco en mayor medida que aquellos derivados de C#3 y C#6 (Figura 16A y B).



**Figura 16. Acumulación de T-DM1 en tumores control y tratados.** Tras 3 semanas de tratamiento intravenoso (i.v.), se sacrificaron los animales, se extrajeron los tumores y se analizaron los niveles de T-DM1 por WB, usando un anticuerpo contra la cadena ligera de la inmunoglobulina humana (h-IgG (L)). El nivel de GAPDH se usó como control de carga. **(B)** Cuantificación de los niveles de T-DM1 en los tumores control (C) y tratados (T). La gráfica muestra la media  $\pm$  d.e. de la intensidad de píxeles de la banda correspondiente a la cadena ligera de T-DM1; n=3 tumores.

## 2. DETERMINACIÓN DE UN MECANISMO DE RESISTENCIA A T-DM1 EN BT474

Para determinar cómo se ha adquirido la resistencia a T-DM1 en los clones derivados de BT474 se realizó un estudio sistemático del camino que sigue el fármaco una vez que llega a las células cancerígenas. La alteración en alguno de los pasos implicados en la acción antitumoral de T-DM1, desde la unión del anticuerpo al antígeno hasta la liberación del citotóxico, pasando por la internalización y degradación lisosomal, podría suponer un mecanismo de resistencia (Barok *et al.* 2014).

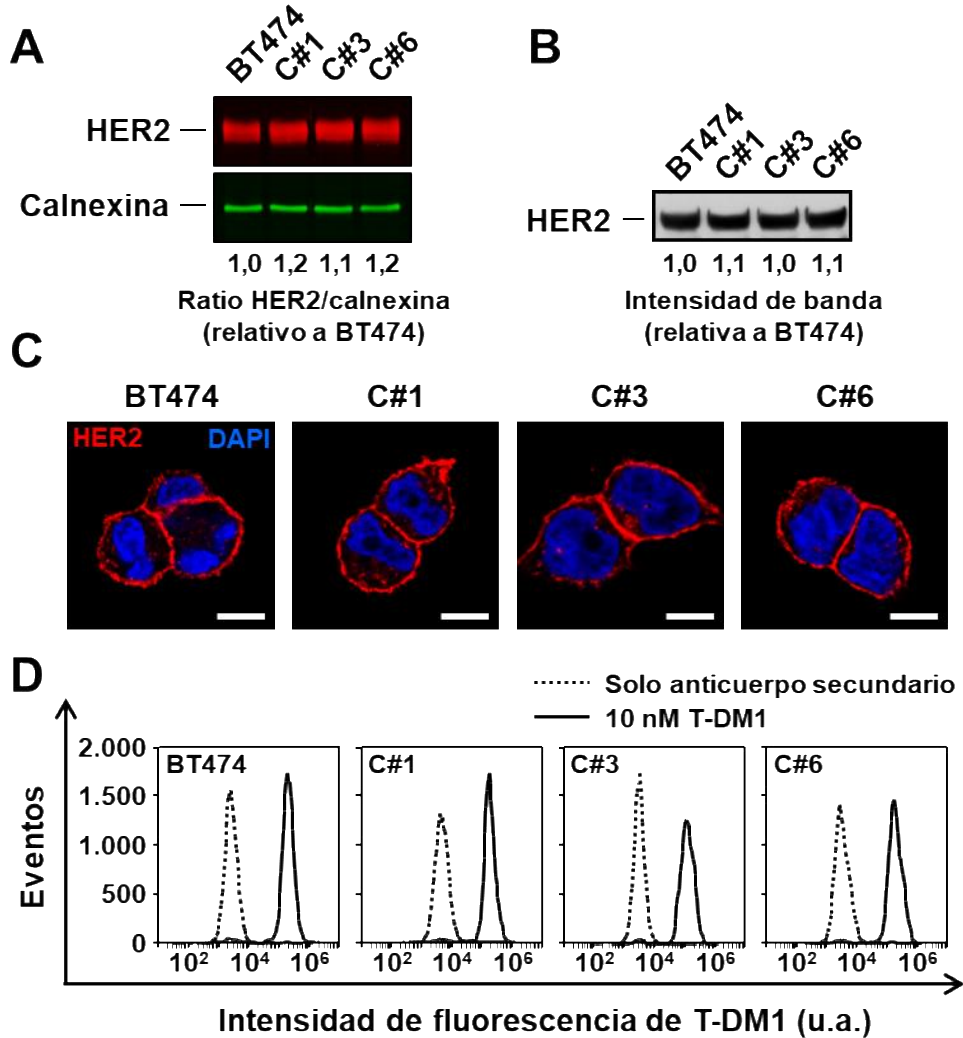
### 2.1. Análisis del papel de HER2 (*docking site*) en la adquisición de resistencia a T-DM1

105

#### 2.1.1. Determinación de los niveles de HER2 total y HER2 en superficie

Uno de los mecanismos descritos de resistencia a terapias anti-HER2 es la pérdida de dicha proteína o la presencia de formas truncadas que carecen del ectodominio (Scaltriti *et al.* 2007). Para evaluar si esto ocurría en los clones resistentes, se analizaron los niveles de HER2, tanto totales (por WB cuantitativo e IF) como en la superficie celular (por IP de superficie con T-DM1 y citometría de flujo). Como se muestra en la figura 17A, no se observaron diferencias sustanciales entre los niveles totales de HER2 en extracto proteico entre los clones resistentes y la línea parental. Los estudios de IF, usando trastuzumab para marcar HER2, mostraron patrones de distribución y niveles de la proteína similares, tanto a nivel intracelular como en la superficie celular (Figura 17C). Para verificar que los niveles de HER2 en superficie eran similares en todas las líneas celulares, en primer lugar se llevó a cabo una IP de superficie usando T-DM1 como anticuerpo primario (Figura 17B). Adicionalmente, se cuantificaron los niveles de proteína mediante un marcaje en superficie con T-DM1 y citometría de flujo (Figura 17D). Al realizar estos experimentos con T-DM1 como anticuerpo primario se demostró

no solo que los niveles eran similares entre la línea parental y todos los clones resistentes, sino también que la capacidad de unión de T-DM1 a HER2 de superficie se mantenía en los clones.

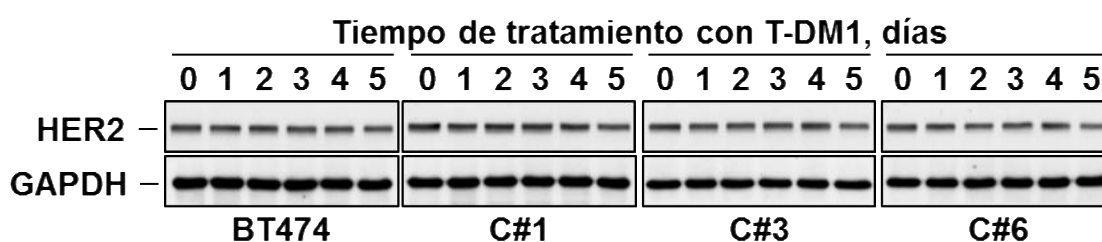


**Figura 17. Niveles de HER2 total y en superficie en los clones resistentes a T-DM1.** Se analizaron los niveles totales de HER2 en las líneas celulares parental y resistentes a T-DM1 por WB (A) o por IF (C). Para la IF, se fijaron las células y se marcó HER2 (rojo), usando trastuzumab como anticuerpo primario, y el DNA (azul). Escala: 7,5  $\mu$ m. (C, D) Niveles de HER2 en la superficie celular de las líneas celulares parental y resistentes. Los niveles de HER2 se analizaron cuantitativamente mediante IP de superficie (B) o mediante citometría de flujo (D), usando en ambos casos T-DM1 como anticuerpo primario.



### 2.1.2. Efecto del tratamiento con T-DM1 sobre los niveles de HER2

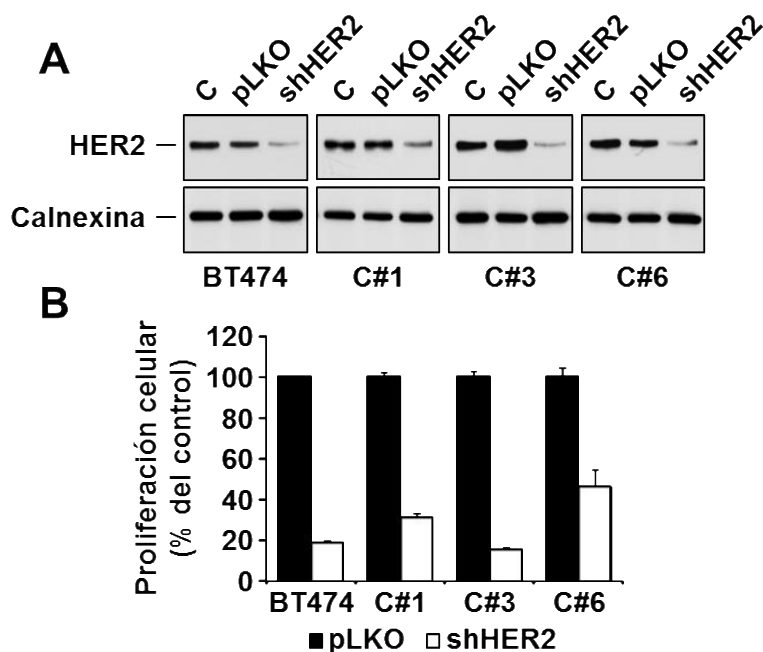
Para valorar si el tratamiento con T-DM1 modificaba los niveles de HER2 en las distintas líneas celulares, se llevó a cabo una incubación con el fármaco a tiempos largos (hasta 5 días) y se analizaron los niveles totales de la proteína por WB. El tratamiento prolongado con T-DM1 no pareció tener ningún efecto notable sobre los niveles totales de HER2. Además, no se detectaron diferencias entre los distintos clones (Figura 18).



**Figura 18. Efecto del tratamiento prolongado con T-DM1 en los niveles de HER2.** Se trataron las células con 5 nM T-DM1 durante los tiempos indicados y 30  $\mu$ g de lisados celulares se analizaron por WB con un anticuerpo anti-HER2. Se utilizó la expresión de GAPDH como control de carga.

### 2.1.3. Efecto de la pérdida de HER2 en la resistencia a T-DM1

La pérdida de la dependencia de HER2 también se ha propuesto como mecanismo de resistencia a terapias anti-HER2 (Moasser 2007). Para explorar si una independencia adquirida del oncogén era responsable de la aparición de la resistencia a T-DM1 en los clones, se llevó a cabo el silenciamiento de HER2 mediante secuencias de shRNA (Figura 19A) y se analizó el efecto en la proliferación celular (Figura 19B). Estos experimentos demostraron que tanto la línea parental BT474 como las líneas celulares resistentes tenían una fuerte dependencia de HER2, ya que el silenciamiento de la proteína afectaba sustancialmente la proliferación de todas ellas, indicando que las líneas resistentes seguían siendo adictas a HER2.



**Figura 19. Silenciamiento de HER2 en BT474 y en los clones resistentes a T-DM1. (A)** Se analizaron extractos celulares de las diferentes líneas celulares transducidas con shRNA por WB, con un anticuerpo anti-HER2 o anti-calnexina, como control de carga. **(B)** Efecto del silenciamiento de HER2 en la proliferación celular. Una vez comprobado el silenciamiento, se sembraron las células en placas de 6 pocillos y se contaron a los 3 días. Los resultados se representan como el porcentaje de la media  $\pm$  d.e., relativo a las células transducidas con un shRNA no codificante (pLKO);  $n=3$ . Se muestra un experimento representativo que se repitió dos veces.

#### 2.1.4. Estado de activación de las rutas de señalización reguladas por HER2 en los clones resistentes

Se ha descrito que la resistencia a terapias anti-HER2 puede surgir como consecuencia de la sobreactivación compensatoria de vías de señalización “aguas abajo” de HER2, en particular, la ruta de PI3K (Eichhorn *et al.* 2008). Para estudiar el estado de activación de múltiples intermediarios de señalización se utilizaron los *arrays* comerciales *Proteome Profiler Human Phospho-Kinase*, que permiten evaluar de manera simultánea la activación de 43 quinasas humanas. Estos experimentos mostraron que los patrones de fosforilación de las diferentes proteínas analizadas eran similares entre todas las líneas celulares, aunque, los clones C#1 y C#3 presentaban más semejanza entre ellos. El clon C#6 exhibió un patrón de fosforilación más parecido al de BT474 (Figura 20). En general, cabe

destacar que no se detectó sobreactivación evidente de ninguna de las rutas de señalización principales “aguas abajo” de HER2 en los clones resistentes.

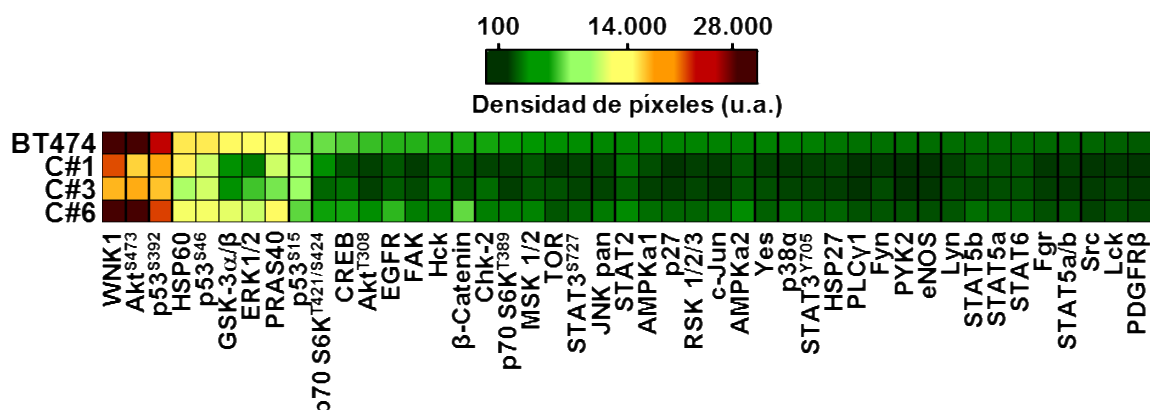


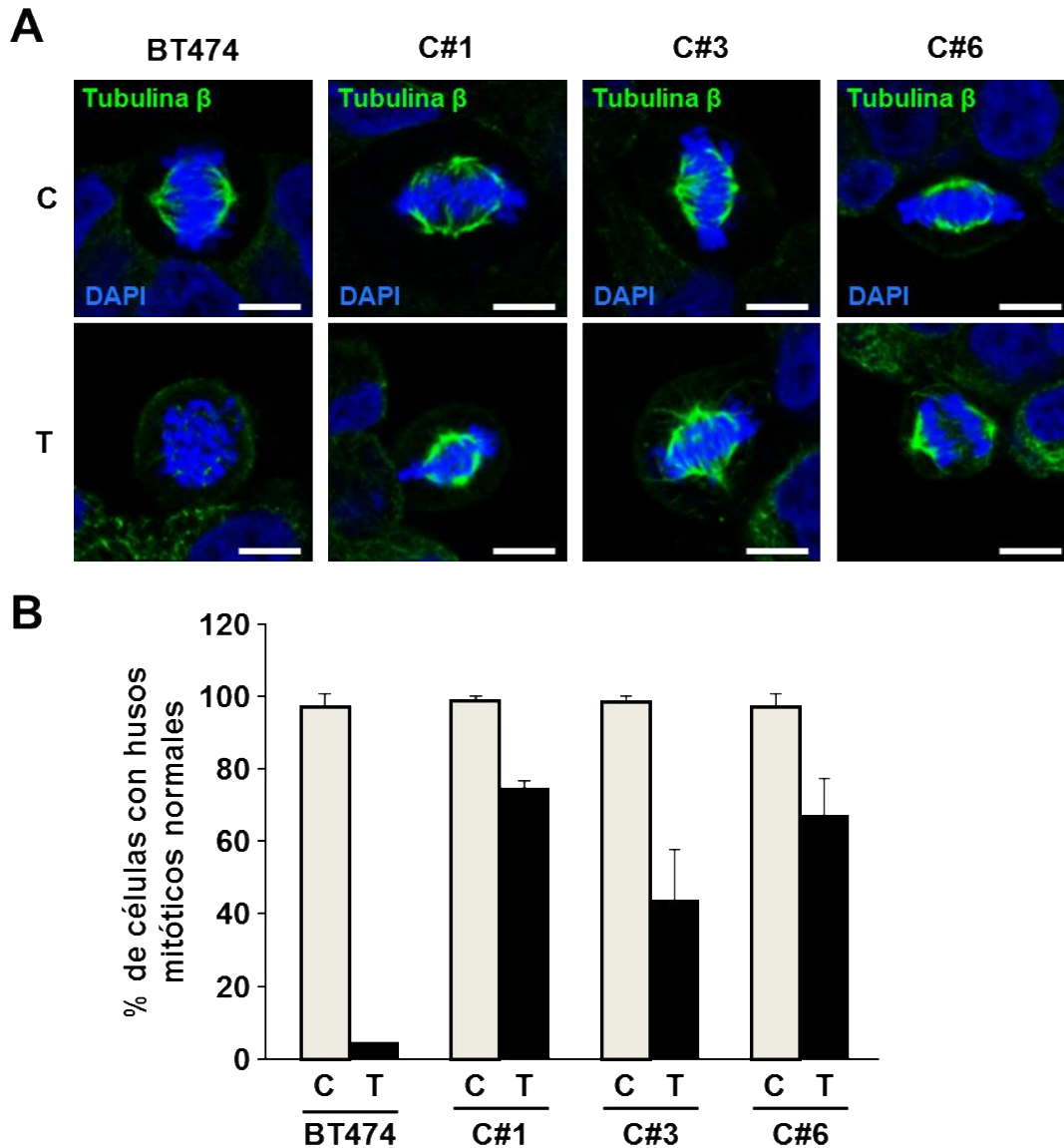
Figura 20. Nivel de fosforilación de intermediarios de señalización en las líneas celulares parental y resistentes a T-DM1. Cada cuadrado representa la media de la señal obtenida para cada proteína, procedente de duplicados en el *array*. La escala de color represente la intensidad de píxeles tras cuantificar los *arrays*, en unidades arbitrarias (u.a.).

## 2.2. Análisis del papel de la tubulina $\beta$ en la adquisición de resistencia a T-DM1

Una vez descartada la alteración del antígeno de superficie HER2 como responsable de la aparición de resistencia a T-DM1, se procedió a estudiar la diana intracelular contra la que va dirigido el citotóxico acoplado al anticuerpo, es decir, la tubulina  $\beta$ .

### 2.2.1. Análisis de los husos mitóticos

El mecanismo de acción de T-DM1 incluye la inhibición de la polimerización de los microtúbulos durante la mitosis (Verma *et al.* 2012). Por tanto, si el fármaco está ejerciendo su función se deberían detectar husos mitóticos aberrantes en las células tratadas. Como se observa en la figura 21A, T-DM1 perjudicó gravemente la formación del huso mitótico en la línea parental BT474, mientras que los clones resistentes se vieron mucho menos afectados por el tratamiento (Figura 21A y B).



**Figura 21. Efecto de T-DM1 en la formación del huso mitótico. (A)** IF del huso mitótico tras la acción de T-DM1. Se trataron las células, se fijaron, se marcó tubulina  $\beta$  (verde) y el DNA (azul), y se tomaron imágenes representativas. Escala: 7,5  $\mu$ m. **(B)** Análisis cuantitativo de las células mitóticas que presentan husos mitóticos normales. Se evaluaron los husos bipolares en las células mitóticas de las diferentes líneas celulares tratadas o no con T-DM1. El gráfico muestra el porcentaje de la media  $\pm$  d.e. de dos experimentos independientes, calculada de la siguiente forma: número de células mitóticas con husos normales / número total de células mitóticas  $\times$  100 (%). C: control, T: 5 nM T-DM1 durante 5 días.

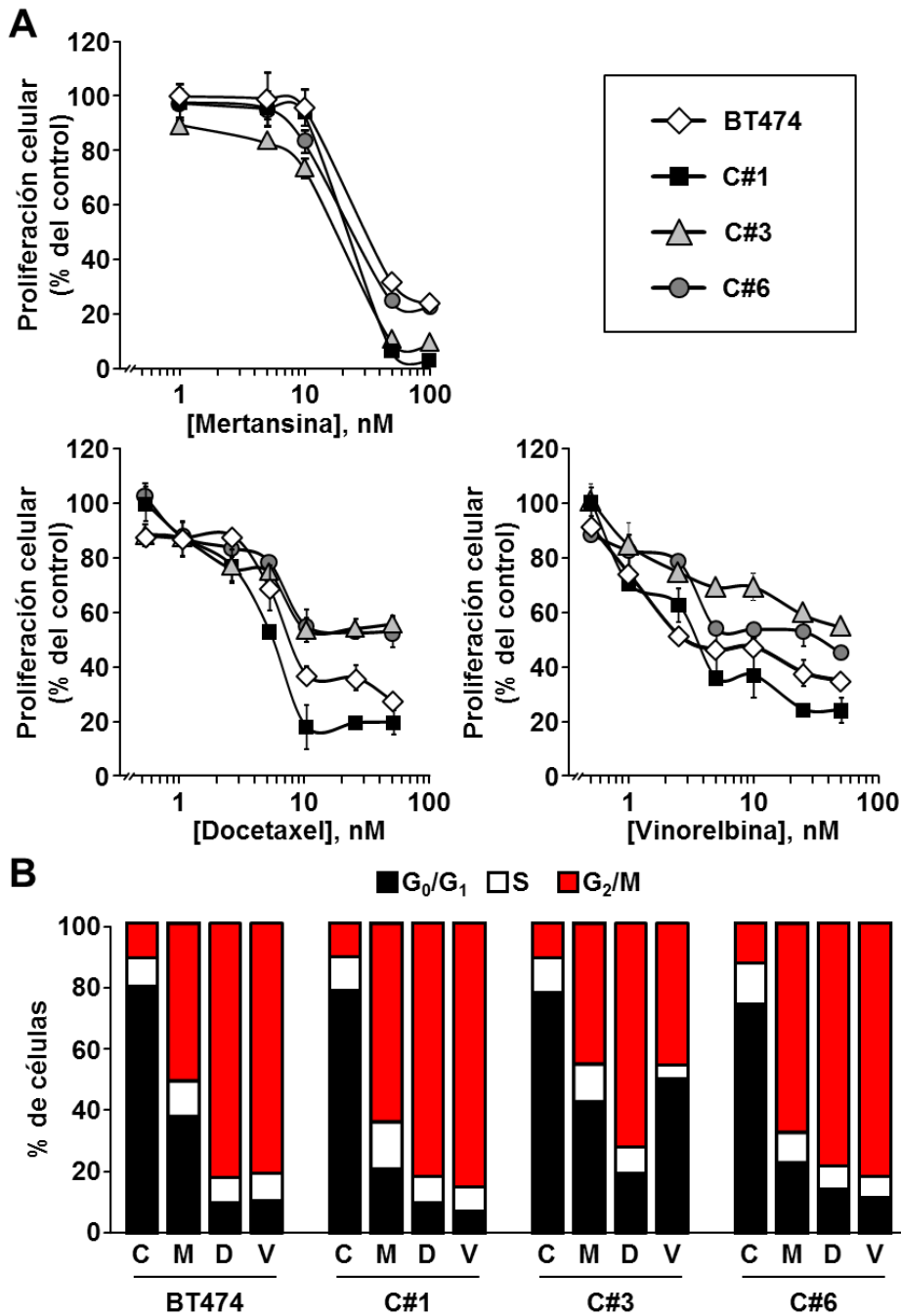
### 2.2.2. *Análisis de mutaciones en tubulina $\beta$ en los clones resistentes*

Para descartar posibles mutaciones en *TUBB1*, se llevó a cabo la secuenciación del gen, utilizando varios oligonucleótidos para abarcar la secuencia completa. Los oligos empleados se detallan en la tabla 7. El análisis de los electroferogramas no reveló ninguna mutación ni en la línea parental BT474 ni en los clones resistentes.

### 2.2.3 *Efecto de otros fármacos antimicrotúbulos en los clones resistentes*

Si la resistencia de los clones a T-DM1 estuviera relacionada con la acción del citotóxico sobre la diana molecular intracelular, es decir, sobre la tubulina  $\beta$ , el tratamiento de las líneas celulares con el fármaco libre (sin conjugar al anticuerpo) no debería tener un efecto terapéutico sobre las células. Para comprobarlo, se trataron todas las líneas celulares con DM1 libre (mertansina) y con otros fármacos antimicrotúbulos usados en la clínica, como vinorelbina y docetaxel. Los experimentos de proliferación celular indicaron que los diferentes clones eran sensibles a todos estos compuestos. Sin embargo, se observaron diferencias en la potencia antiproliferativa de vinorelbina y docetaxel entre los diferentes clones, lo cual estaba en consonancia con el comportamiento diferencial observado entre ellos al analizar otras propiedades biológicas (Figura 22A). Los análisis del ciclo celular demostraron que estos fármacos provocaban parada en  $G_2/M$  tanto en las líneas resistentes como en la parental (Figura 22B).

Estos datos, junto con las imágenes de husos mitóticos y la secuencia intacta de la tubulina  $\beta$ , indicaron que la funcionalidad de la tubulina  $\beta$  no se encontraba alterada en los clones.



**Figura 22. Efecto del compuesto DM1 libre (mertansina) y de otros fármacos antimicrotúbulos usados en clínica en la proliferación celular de células parentales y resistentes a T-DM1. (A)** Las células se trataron con concentraciones crecientes de los distintos fármacos y se evaluó la proliferación por metabolización de MTT a los 3 días. Los resultados se representan como el porcentaje de la media  $\pm$  d.e., relativo a la condición control (sin fármaco); n=3. Se muestra un experimento representativo que se repitió tres veces. **(B)** Las células se trataron con los distintos fármacos durante 24 horas y se analizó la distribución de las fases del ciclo celular por tinción con PI y citometría de flujo. Los resultados muestran el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo de un experimento representativo. C: control, M: 25 nM mertansina, D: 2,5 nM docetaxel, V: 2,5 nM vinorelbina.

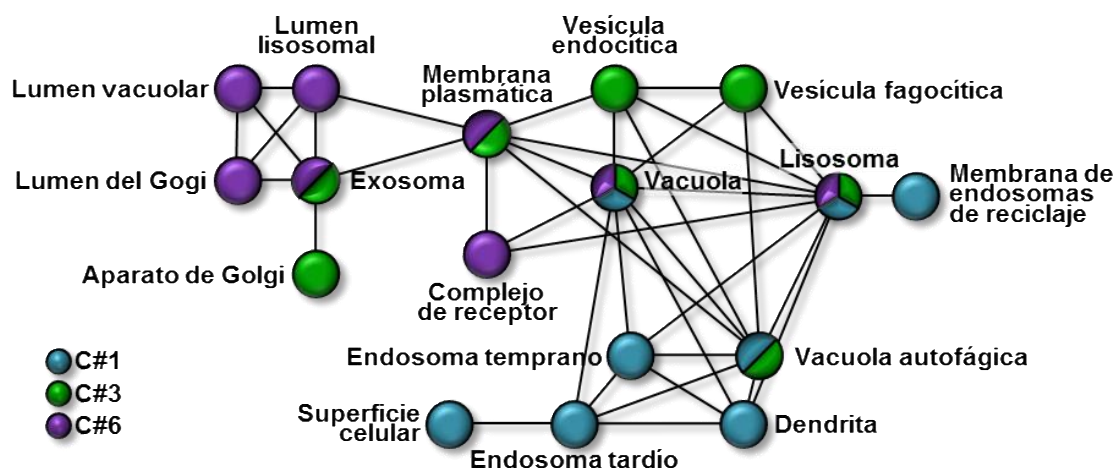


## 2.3. Análisis de la internalización de T-DM1

### 2.3.1. Análisis de enriquecimiento de los genes expresados diferencialmente en los clones resistentes

Además de ser utilizados para evaluar la expresión de genes de interés que pudieran tener un papel relevante en la adquisición de resistencia, los datos de expresión génica también se utilizaron para explorar componentes celulares que pudieran estar alterados en los clones resistentes a T-DM1. Para ello se empleó la herramienta web *Enrichr*, un programa de análisis de enriquecimiento que proporciona un resumen de los términos de ontología génica atribuidos a listas de genes expresados diferencialmente. El proyecto Ontología Génica (GO, *Gene Ontology*) proporciona un vocabulario controlado para describir el gen y los atributos del producto génico en cualquier organismo. Consta de dos partes: (i) la ontología por sí misma; que informa de la función molecular de los productos génicos; su rol en los procesos biológicos y su localización en componentes celulares; y (ii) la anotación, que caracteriza los productos génicos usando términos de la ontología (Gene Ontology 2015). Al introducir en *Enrichr* las tres listas de genes, correspondientes a la expresión diferencial de cada uno de los clones respecto a la línea parental, y filtrar los resultados por “componente celular” se obtuvieron los términos enriquecidos en las líneas resistentes. Como se observa en la figura 24, los términos de GO relacionados con la vía endocítica se encontraban enriquecidos en todos los clones resistentes, compartiendo además algunos de ellos tales como lisosoma o vacuola. Estos estudios apuntaban al tráfico endosomal o a la función lisosomal como procesos subcelulares que podrían ser responsables de la aparición de resistencia a T-DM1.

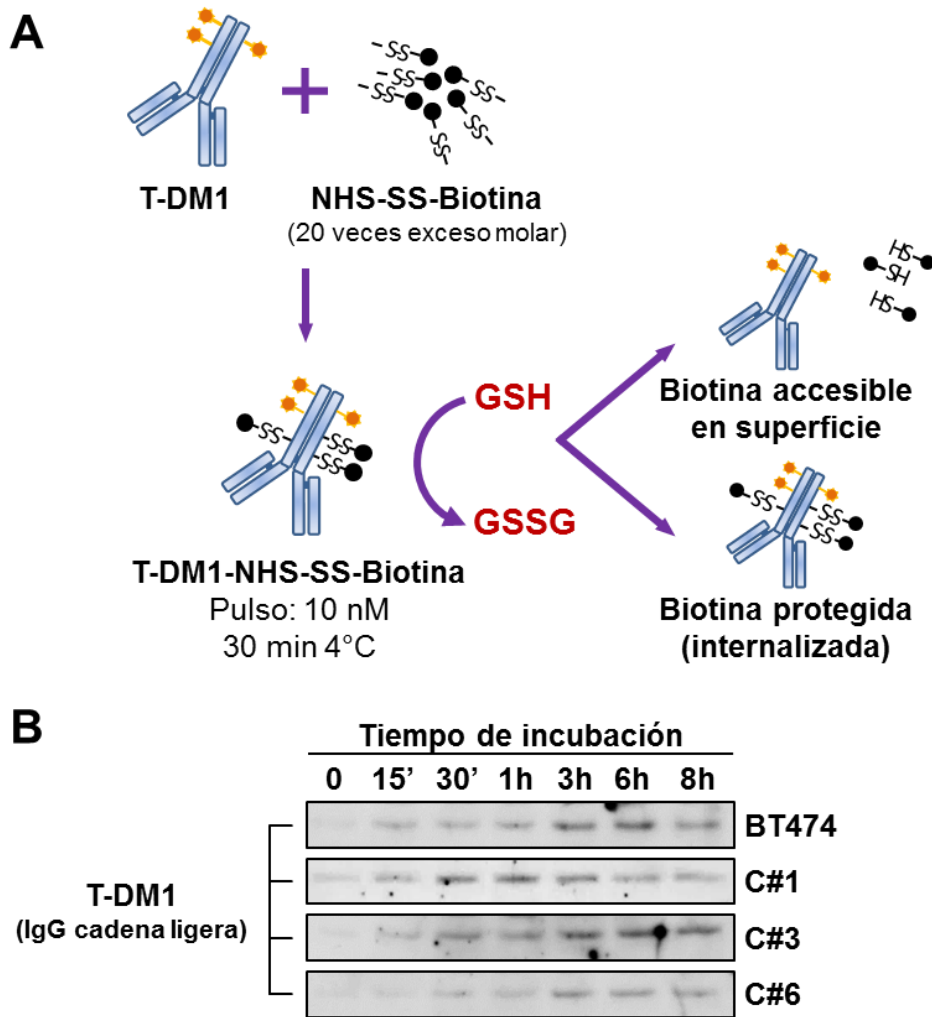




**Figura 24. Análisis de enriquecimiento por “componentes celulares” de los datos de expresión génica de los clones resistentes a T-DM1.** Se clasificaron los genes que cumplían los filtros ( $\geq 2$  de tasa de cambio y  $p$ -valor  $\leq 0,05$  de significación) usando como GO “componentes celulares”. La red representa los términos GO enriquecidos en los clones (bolas de colores) y la relación entre ellos.

### 2.3.2. Internalización de T-DM1 marcado con biotina

Para cuantificar la internalización de T-DM1, se marcó el fármaco con un compuesto de biotina reducible. Este agente contiene un puente disulfuro en su brazo espaciador, lo que permite que el fármaco marcado pueda ser reducido y liberado de la biotina tras el tratamiento con un agente reductor, como glutatión. Esto permite anular la señal correspondiente al T-DM1 residual que permanece unido a la membrana plasmática, detectando únicamente el T-DM1 que ha pasado a compartimentos intracelulares. Estos experimentos mostraron que el T-DM1 biotinilado era internalizado, tanto en las células BT474 como en los clones resistentes (Figura 25B).

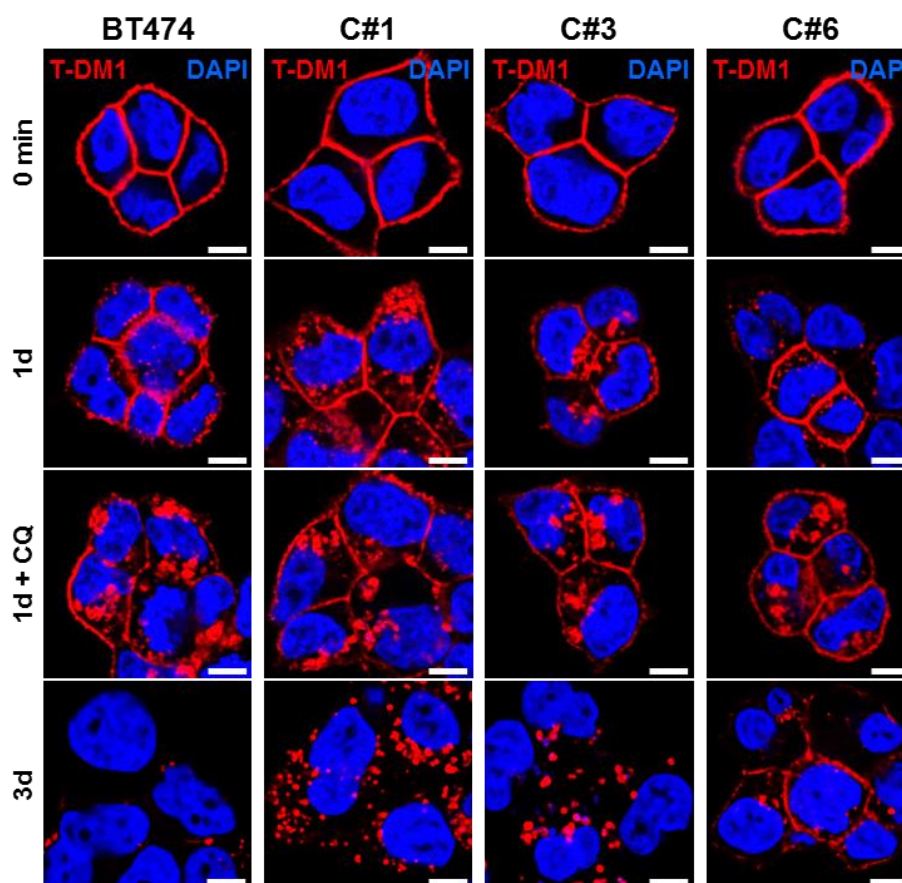


**Figura 25. Internalización de T-DM1 a lo largo del tiempo. (A)** Marcaje de T-DM1 con biotina reducible. **(B)** Se trataron las células con un pulso de 30 minutos a 4°C con 10 nM T-DM1-SS-biotina y se incubaron a 37°C los tiempos indicados. A continuación, la biotina accesible en la superficie celular se liberó mediante un tratamiento con glutatión, se lisaron las células, se precipitaron los extractos celulares con estreptavidina-sefarosa y se analizaron los niveles de T-DM1 por WB, usando un anticuerpo anti-humano-HRP. GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado.

### 2.3.3. Detección de T-DM1 por IF

Para profundizar en los estudios de internalización de T-DM1, se realizó un análisis por IF en todas las líneas celulares. Las células recibieron un pulso de T-DM1 y se permitió la internalización del fármaco durante distintos tiempos. La fijación y tinción de las células inmediatamente después del pulso mostró que la distribución de T-DM1 estaba restringida a la superficie celular (Figura 26, 0 min). Al cabo de un día, esta distribución superficial aún era apreciable, pero también se

observó una tinción punteada, que sugería acumulación intracelular de T-DM1. Esta acumulación resultó mucho más evidente cuando se usó cloroquina, un agente que causa el atrapamiento del material endocitado dentro de la célula (El-Sayed *et al.* 2009). Para confirmar la redistribución de T-DM1 desde la superficie celular a un patrón intracelular punteado, se realizó IF *in vivo*, mediante experimentos de *time lapse* (Rios-Luci *et al.* 2017). Al extender los tiempos de incubación, se observaron diferencias en el patrón de distribución de T-DM1 entre las distintas líneas celulares. Transcurridos tres días, la mayor parte del fármaco había desaparecido de la superficie de las células BT474 y solo quedaban unos pocos puntos intracelulares (Figura 26). Por el contrario, en los clones C#1 y C#3, una cantidad sustancial de T-DM1 permanecía en estructuras punteadas. En el caso del clon C#6, algo de T-DM1 era aún detectable en la superficie celular.



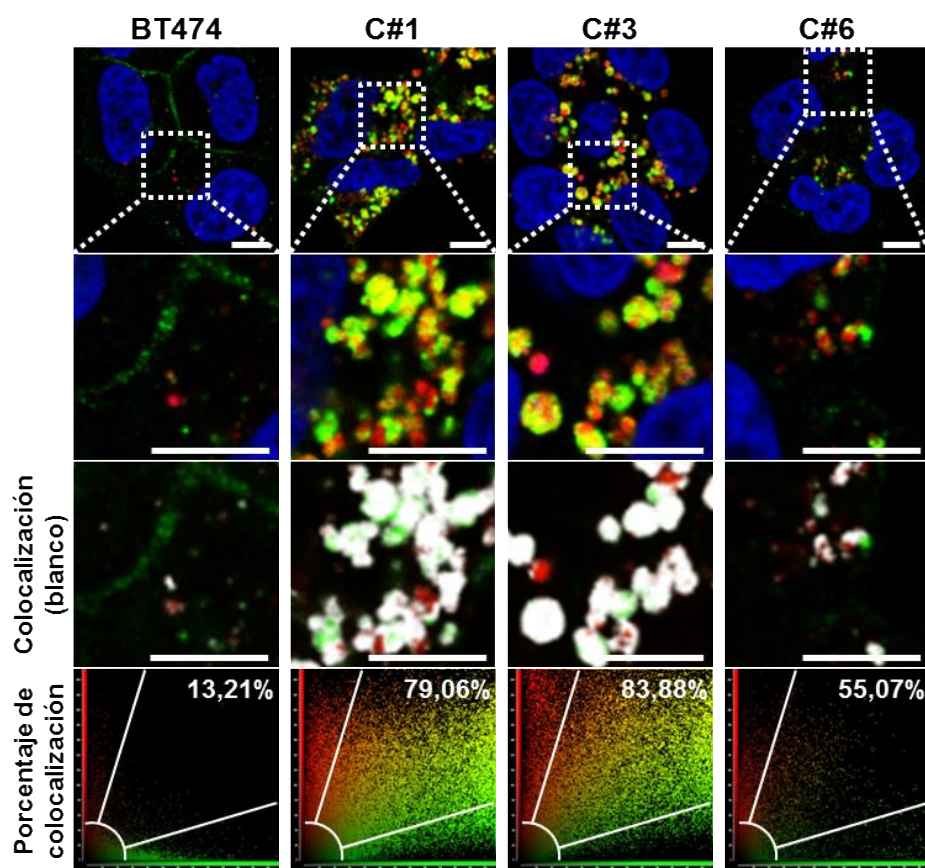
**Figura 26. IF de T-DM1 en las líneas celulares.** Se trataron las células con un pulso de 15 minutos a 37°C con 10 nM T-DM1 y se incubaron a 37°C los tiempos indicados. Posteriormente, se fijaron las células y se marcó T-DM1 (rojo), usando anti-humano-Cy3 como anticuerpo, y el DNA (azul). Escala: 7,5  $\mu$ m. CQ: 50 $\mu$ M cloroquina.

#### 2.3.4. Seguimiento de T-DM1 a tiempos largos (time-lapse)

Estas diferencias entre las líneas observadas tras 3 días de incubación, impulsaron la realización de IF *in vivo* a tiempos de incubación más largos, para determinar si los clones que mostraban acumulación del ADC terminaban procesándolo eventualmente. Los estudios de *time lapse* hasta 5 días mostraron una acumulación progresiva del fármaco en estas estructuras punteadas a lo largo del transcurso del tiempo del experimento en C#1. De manera contraria, en la línea parental BT474 la señal de T-DM1 prácticamente acababa desapareciendo (Rios-Luci *et al.* 2017).

#### 2.3.5. Colocalización con marcadores de la ruta endocítica

A continuación, se llevaron a cabo experimentos de colocalización con marcadores de orgánulos intracelulares con el objetivo de identificar el sitio de acumulación de T-DM1 en las células resistentes. En estos experimentos se detectó una colocalización sustancial entre T-DM1 y el marcador de vesículas ácidas *LysoTracker DND99* tras 3 días de incubación (Figura 27). El análisis cuantitativo de las imágenes adquiridas mostró una tasa de colocalización *LysoTracker*/T-DM1 de 13,21%, 79,06%, 83,88% y 55,07% en BT474, C#1, C#3 y C#6, respectivamente (Figura 27).

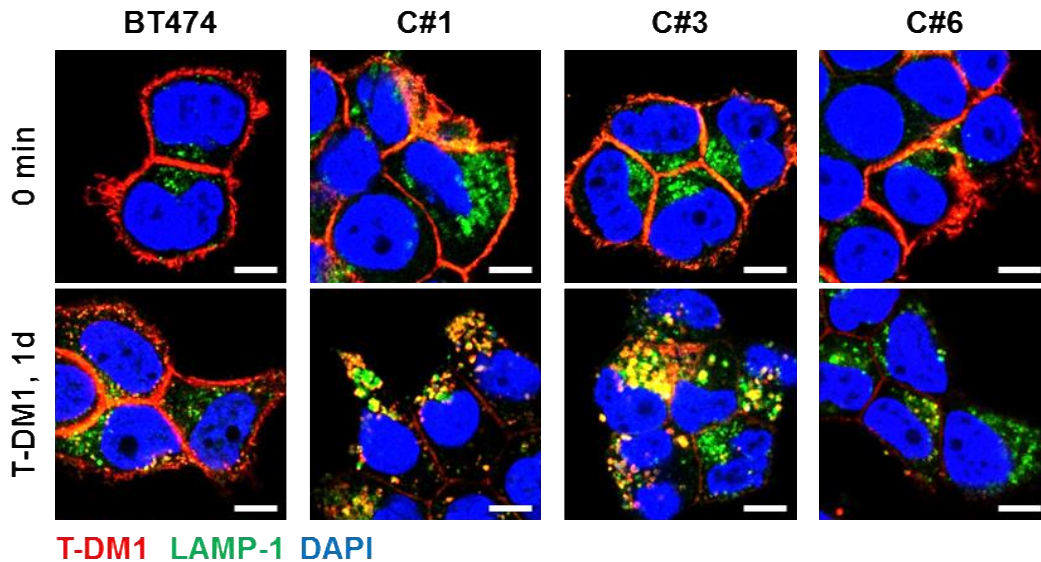


**Figura 27. Colocalización de T-DM1 con el marcador de vesículas ácidas, *LysoTracker*.** Se trataron las células con un pulso de 15 minutos a 37°C con 10 nM T-DM1 y se incubaron a 37°C durante 3 días. Posteriormente se fijaron las células y se marcó T-DM1 (verde), usando anti-humano-Dylight®488 como anticuerpo, vesículas ácidas (rojo), con un tratamiento de 30 minutos con *LysoTracker*, y el DNA (azul). El área punteada define la zona amplificada (segunda fila). Escala: 7,5  $\mu\text{m}$ . La colocalización entre T-DM1 y *LysoTracker* se muestra en blanco (tercera fila). Los gráficos de dispersión de la fluorescencia obtenidos a partir de las imágenes adquiridas se analizaron con el programa LAS AF (última fila). Los píxeles correspondientes a fluorescencia puramente roja o verde se encuentran entre los ejes de abscisas/ordenadas y las líneas blancas; los píxeles en los que colocalizan ambos colores se encuentran en la región central del gráfico (entre las líneas blancas). La tasa de colocalización *LysoTracker*/T-DM1, calculada como el ratio del área de señal de colocalización respecto al área total de fluorescencia, se indica en el gráfico.

Para precisar el tipo de vesículas ácidas en las que se encontraba atrapado T-DM1, se realizaron IF adicionales con marcadores y proteínas de fusión de la ruta endocítica. Se detectó colocalización con el marcador lisosomal LAMP1 (*lysosomal-associated membrane protein 1*, proteína 1 de membrana asociada a lisosoma), especialmente en los clones C#1 y C#3, donde la cantidad de T-DM1 retenido



dentro de la célula era muy abundante. Esta colocalización también estaba presente en la línea parental BT474 y el clon C#6, aunque en un grado mucho menor (Figura 28).

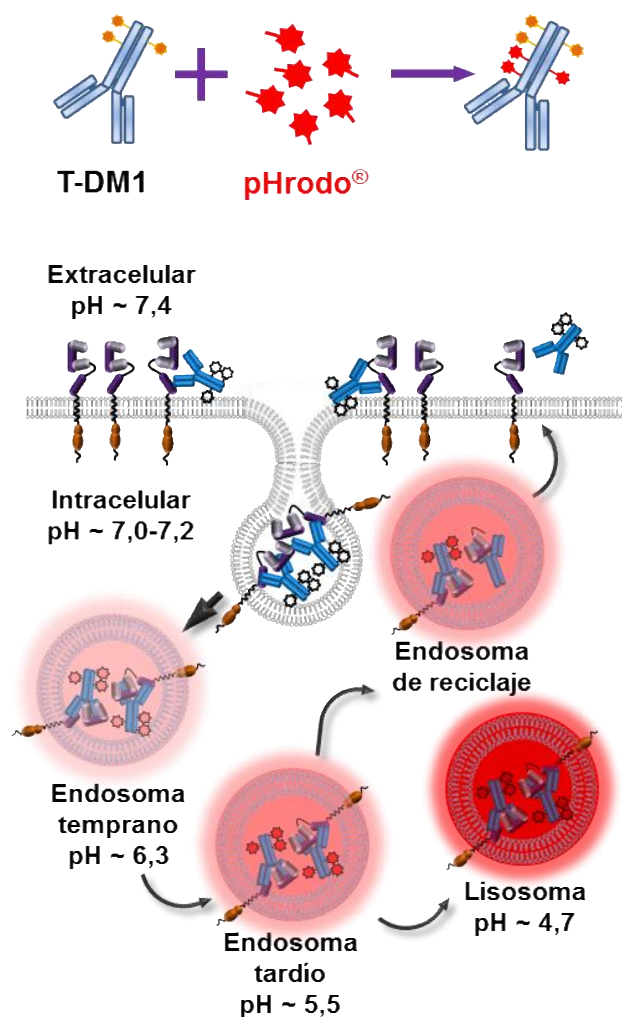


**Figura 28. Acumulación intracelular de T-DM1 en lisosomas.** Se trataron las células con un pulso de 15 minutos a 37°C con 10 nM T-DM1 y se incubaron a 37°C durante los tiempos indicados. Posteriormente se fijaron las células y se marcó T-DM1 (rojo), usando anti-humano-Cy3 como anticuerpo, lisosomas (verde), y el DNA (azul). Escala: 7,5  $\mu$ m.

## 2.4. Análisis de la degradación lisosomal de T-DM1

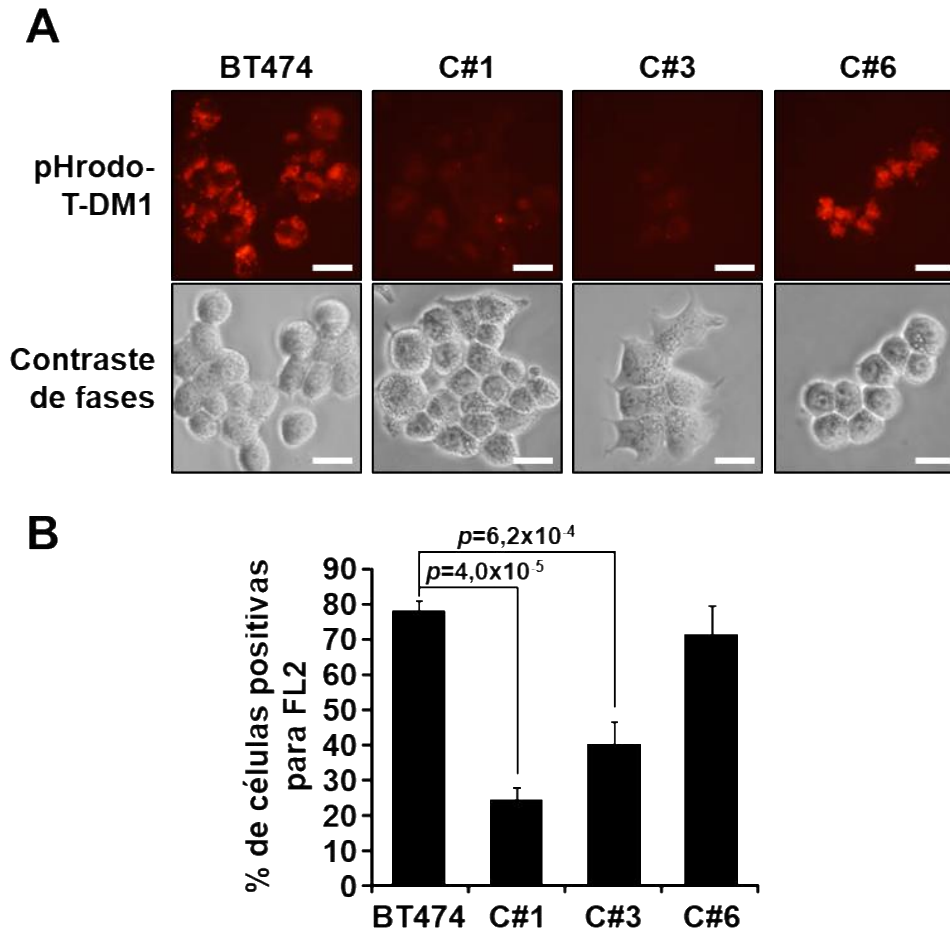
### 2.4.1. Análisis del pH lisosomal

La acumulación intracelular de T-DM1 en los clones C#1 y C#3 sugería que el mecanismo de resistencia al fármaco podría estar vinculado a un procesamiento deficiente de T-DM1, que tiene que degradarse completamente para liberar el citotóxico. Esta falta de procesamiento proteolítico podría deberse a una función lisosomal alterada. Dado que el pH ácido característico de los lisosomas es crucial para la función óptima de las enzimas proteolíticas lisosomales, se evaluó si T-DM1 alcanzaba ese ambiente ácido dentro de los lisosomas. Para ello, se marcó T-DM1 con pHrodo, un fluorocromo rojo que apenas es fluorescente a pH neutro, pero cuya fluorescencia se incrementa drásticamente en ambientes ácidos (Nath *et al.* 2016) (Figura 29).



**Figura 29. Marcateo de T-DM 1 con pHrodo y evolución de su fluorescencia a lo largo de la ruta endocítica.**

Se incubaron las células con 5 nM pHrodo-T-DM1 durante 24 horas y se analizaron las señales de fluorescencia mediante microscopía *in vivo* o por citometría de flujo. En las células BT474 y en el clon C#6, se detectó fluorescencia intracelular (Figura 30A). Por el contrario, en las células de los clones C#1 y C#3, la señal fluorescente fue mucho más débil. El análisis cuantitativo por citometría de flujo corroboró estas diferencias en la señal de fluorescencia en los clones C#1 y C#3 respecto a la línea parental (Figura 30B). Estos resultados apuntaron a que el pH en los compartimentos alcanzados por pHrodo-T-DM1 era sustancialmente más alto en los clones C#1 y C#3 en comparación con las células BT474.



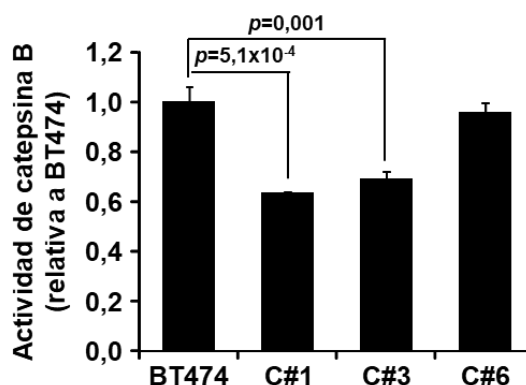
**Figura 30. Valoración del pH en los compartimentos intracelulares alcanzados por T-DM1. (A)** Se trataron las células con 5 nM pHrodo-T-DM1 durante 24 horas a 37°C y se analizaron por microscopía de epifluorescencia. Se tomaron imágenes representativas de la fluorescencia roja emitida por las distintas líneas celulares e imágenes de contraste de fases de los mismos campos (objetivo 40X). Escala: 50  $\mu$ m. **(B)** Se trataron las células como en (A), se recolectaron y se analizaron por citometría de flujo. Se representa el porcentaje de células positivas para fluorescencia roja como la media  $\pm$  d.e. de tres experimentos independientes.

#### 2.4.2. Análisis de la actividad proteolítica lisosomal

A continuación, se exploró la actividad proteolítica de los lisosomas usando como indicador la actividad de catepsina B (Chan *et al.* 2016). Como se muestra en la figura 31, la actividad de catepsina B de C#6 fue similar a la de la línea parental BT474. Sin embargo, se observaron actividades significativamente menores en los clones C#1 y C#3. En conjunto, estos datos indicaron que el pH lisosomal se encontraba más elevado en los clones C#1 y C#3, lo que probablemente derivó en



una actividad proteolítica global alterada, resultando en un procesamiento inadecuado de T-DM1, requisito indispensable para que el citotóxico ejerza su acción antitumoral.

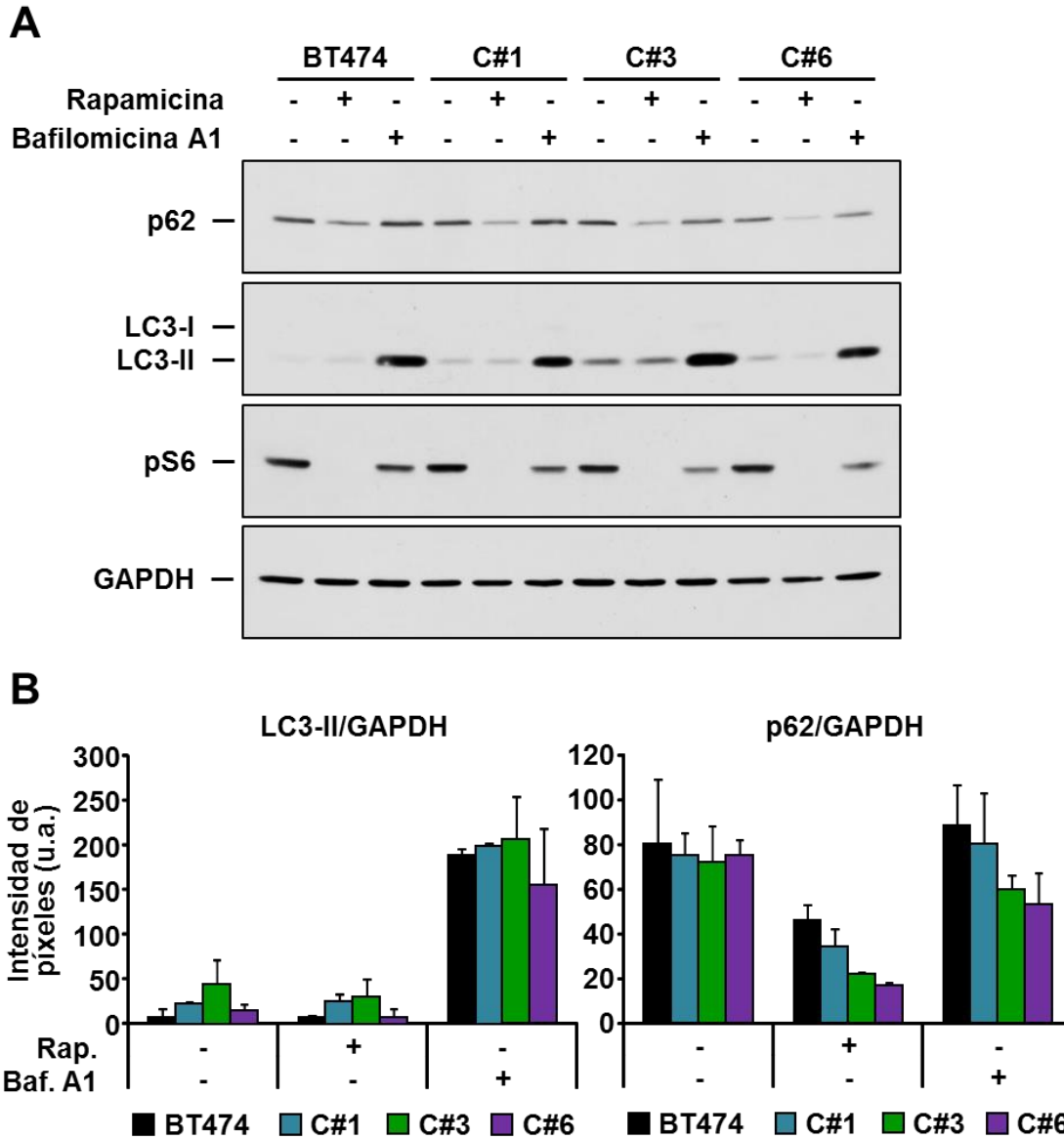


**Figura 31. Actividad proteolítica de la enzima lisosomal catepsina B.** Se representa la fluorescencia relativa a la de las células parentales como la media  $\pm$  d.e. de tres experimentos independientes.

#### 2.4.3. Análisis de la capacidad autofágica de los clones

Dado que la disfunción lisosomal podría ser consecuencia de algún defecto en el proceso de autofagia, se evaluó el flujo autofágico en todas las líneas celulares tras el tratamiento con inhibidores (bafilomicina A1) o inductores (rapamicina) del proceso. Para caracterizar el proceso de autofagia se analizaron los niveles de LC3-II y p62 por WB. La proteína LC3 tiene dos isoformas, LC3-I y LC3-II. Esta última isoforma se encuentra conjugada con fosfatidiletanolamina y está presente en las membranas de autofagosomas y autolisosomas. LC3-II se degrada durante la autofagia, sin embargo, esta degradación se puede evitar si se bloquea la fusión entre autofagosomas y lisosomas usando compuestos como bafilomicina A1 (Rodríguez-Arribas *et al.* 2017). Este fármaco es un inhibidor de la V-ATPasa lisosomal que causa un incremento en el pH lisosomal/vacuolar y, en última instancia, inhibe la autofagia (Klionsky *et al.* 2016). Como se muestra en la figura 32, el tratamiento con bafilomicina A1 provocó un incremento de LC3-II tanto en la línea parental como en los clones resistentes. Por otro lado, p62 es un sustrato de la autofagia que interacciona directamente con LC3 y se degrada durante el proceso autofágico (Rodríguez-Arribas *et al.* 2017). Como se observa en la figura

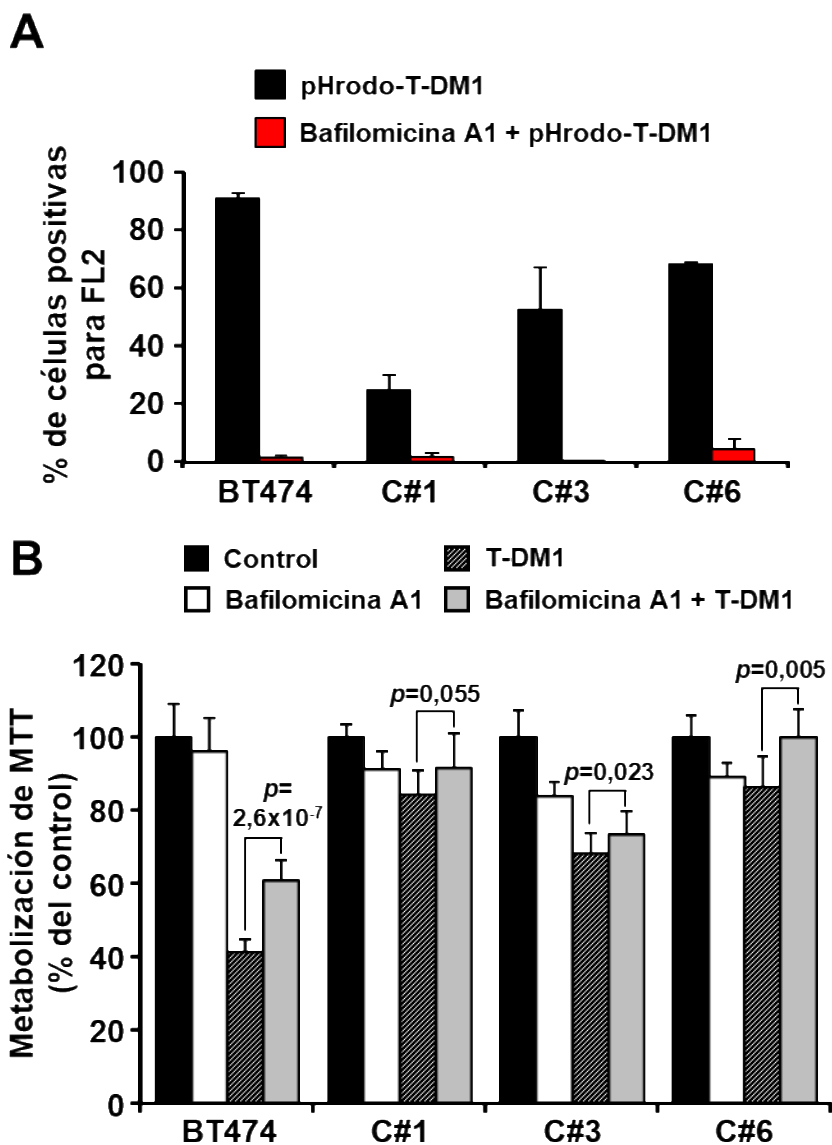
32, el tratamiento con rapamicina, un inhibidor de mTOR que provoca inducción de la autofagia, causó la disminución de los niveles de p62 en todas las líneas celulares. En conjunto, estos datos sugirieron que el proceso de autofagia se preservaba en todas las líneas celulares analizadas y, por tanto, no era responsable de la disfunción lisosomal observada.



**Figura 32. Proceso de autofagia en los clones resistentes a T-DM1. (A)** Se trataron las líneas celulares con 500 nM rapamicina o 100 nM bafilomicina A1 durante 18 horas para estimular o inhibir la autofagia, respectivamente. A continuación, se lisaron las células y se analizó la expresión de los marcadores de autofagia (LC3 y p62) mediante WB. Se utilizó la expresión de GAPDH como control de carga. **(B)** Análisis cuantitativo de la intensidad de banda de LC3-II y p62 relativa a la de GAPDH (control de carga). Los datos se representan como la media  $\pm$  d.e. de tres experimentos independientes.

#### **2.4.4. Manipulación del pH lisosomal para modular el efecto de T-DM1**

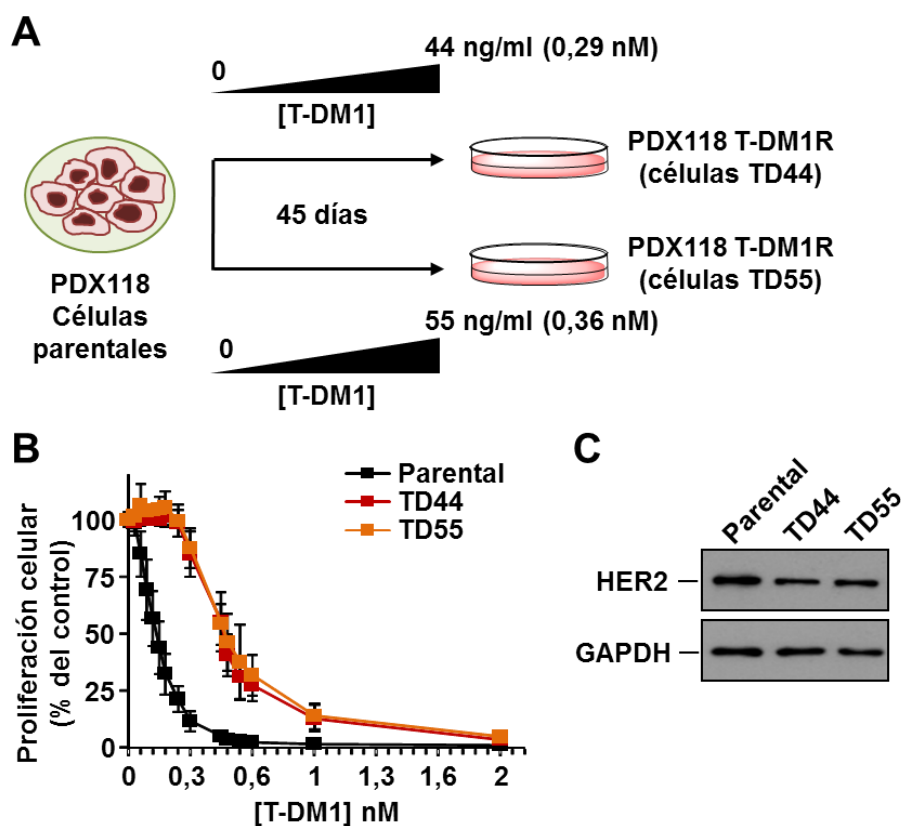
Si la disfunción lisosomal por alcalinización del pH tenía un papel relevante en la resistencia a T-DM1, se esperaría que la manipulación artificial del pH lisosomal en la línea parental sensible al fármaco revirtiera los efectos antiproliferativos de T-DM1, haciéndoles más resistentes al mismo. Para afrontar esta cuestión, se utilizó de nuevo el inhibidor de la V-ATPasa, bafilomicina A1. La preincubación con bafilomicina A1 provocó una disminución de la fluorescencia emitida por pHrodo-T-DM1, confirmando la alcalinización lisosomal (Figura 33A). Además, bafilomicina A1 revirtió parcialmente el efecto antiproliferativo de T-DM1 en la línea parental BT474 (Figura 33B).



**Figura 33. Efecto de la modulación del pH lisosomal en la acción de T-DM1. (A)** Efecto de bafilomicina A1 en el pH lisosomal. Se trataron las células con 5 nM pHrodo-T-DM1 durante 24 horas a 37°C, en presencia o ausencia de 10 nM bafilomicina A1, se recolectaron y se analizaron por citometría de flujo. Se representa el porcentaje de células positivas para fluorescencia roja como la media  $\pm$  d.e. de tres experimentos independientes. **(B)** Efecto de bafilomicina A1 en la sensibilidad de BT474 a T-DM1. Se trataron todas las líneas celulares con 5 nM T-DM1, 1 nM bafilomicina A1 o ambos y se evaluó la proliferación por metabolización de MTT a los 5 días. Los resultados se representan como el porcentaje de la media  $\pm$  d.e., relativo a la condición control (sin fármaco); n=3. Se muestra un experimento representativo que se repitió dos veces.

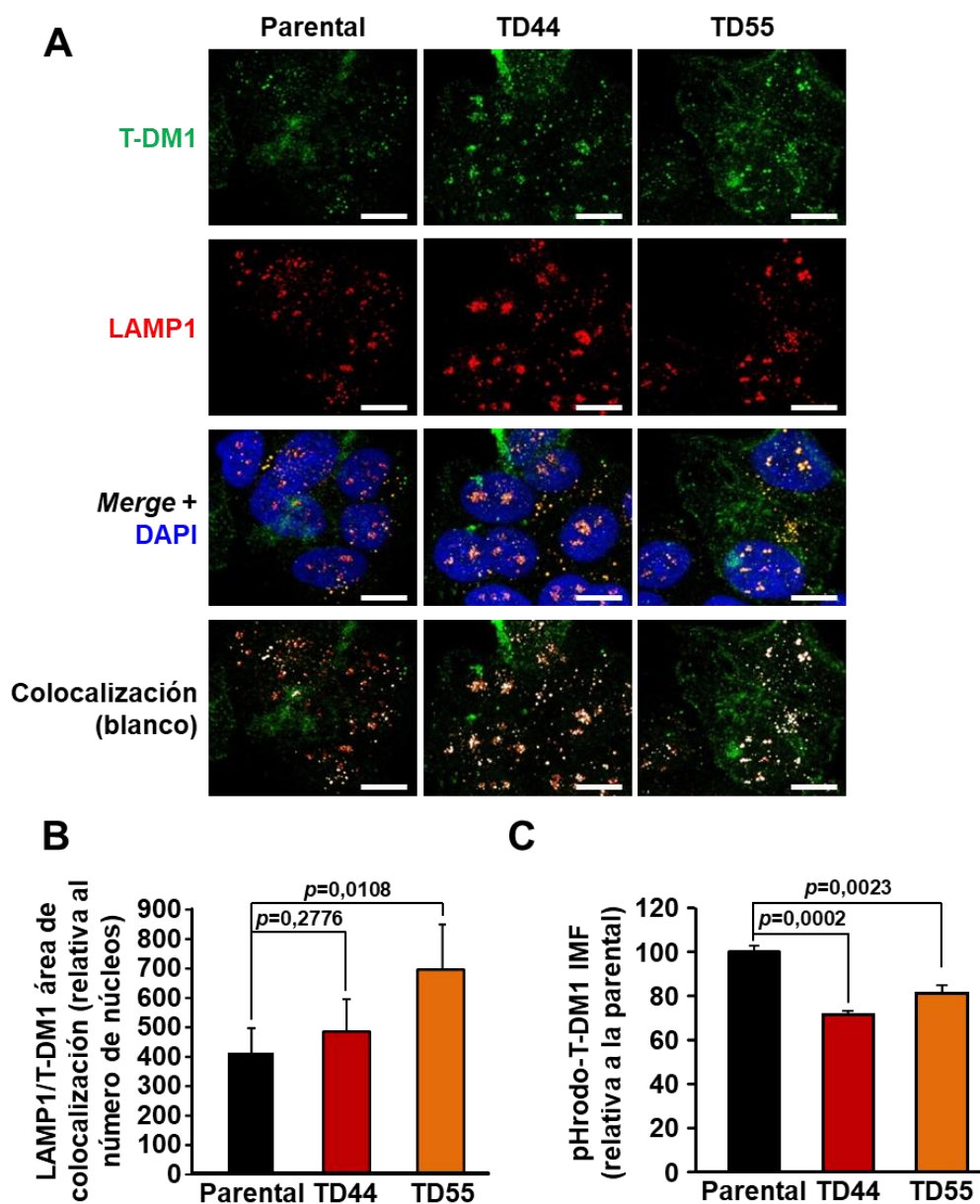
## 2.5. Validación del mecanismo de resistencia en un modelo de PDX

Finalmente, se exploró si el mecanismo de resistencia a T-DM1 descrito en células derivadas de BT474 también tenía lugar en material derivado de pacientes. Para ello, se usaron cultivos celulares establecidos a partir de un PDX HER2+ (PDX118) (Vicario *et al.* 2015). Estos cultivos celulares, inicialmente sensibles a T-DM1, se mantuvieron en presencia de concentraciones crecientes del fármaco, hasta obtener dos cultivos independientes (TD44 y TD55) (Figura 34A). Estas células fueron resistentes a la acción antiproliferativa de T-DM1, en comparación con las células parentales (Figura 34B). Además, los análisis de WB confirmaron el fenotipo HER2+ de todas ellas, aunque los clones resistentes presentaron niveles totales de HER2 más bajos que la línea parental (Figura 34C). Sin embargo, experimentos preliminares no mostrados indicaron que la resistencia a T-DM1 no se podía achacar a tal disminución de HER2.



**Figura 34. Caracterización de las líneas celulares derivadas del PDX118. (A)** Representación esquemática de la generación de las líneas celulares resistentes a T-DM1. Las células parentales se obtuvieron de un xenoinjerto HER2+ derivado de un paciente (PDX118), que se mantuvo mediante pases en ratones, y se cultivaron en presencia de dosis crecientes de T-DM1 durante 45 días hasta establecer dos cultivos celulares independientes (TD44 y TD55). **(B)** Las células se trataron con concentraciones crecientes de T-DM1 y se evaluó la proliferación por cristal violeta a los 7 días. Los resultados se representan como el porcentaje de la media  $\pm$  d.e., relativo a la condición control (sin fármaco) de 6 experimentos independientes. **(C)** Niveles totales de HER2 en las líneas celulares parental y resistentes analizados por WB. Se utilizó la expresión de GAPDH como control de carga.

En primer lugar se exploró por IF si T-DM1 llegaba y/o se acumulaba en los lisosomas en las líneas resistentes. Estos estudios demostraron una fuerte colocalización de T-DM1 y el marcador lisosomal LAMP1 (Figura 35A), que resultó ser significativamente superior, en comparación con la línea parental, en el caso de las células TD55 (Figura 35B). Para valorar el pH de los compartimentos intracelulares alcanzado por T-DM1, se repitió la estrategia empleada con los clones derivados de BT474, usando T-DM1 conjugado con pHrodo. La tinción mostró una disminución estadísticamente significativa en las células TD44 y TD55, en comparación con las células parentales (Figura 35C).



**Figura 35. Funcionalidad lisosomal en las líneas celulares derivadas del PDX118 resistentes a T-DM1.** (A) Se trataron las células con un pulso de 10 nM T-DM1 durante 30 minutos a 4°C y se incubaron a 37°C durante 4 días. A continuación, se fijaron y se marcó T-DM1 (verde), lisosomas (rojo) y el DNA (azul). Se muestran micrografías representativas de las proyecciones máximas de *z-stack*. Escala: 10  $\mu$ m. (B) Análisis de colocalización de T-DM1 con LAMP1 en las líneas celulares resistentes, realizado a partir de las imágenes adquiridas en (A), usando el programa *ImageJ*. El área de colocalización se calculó como el ratio del área de señal de doble fluorescencia (roja y verde) respecto al área total de la imagen, normalizada respecto al número de núcleos. Los datos se representan como la media  $\pm$  d.e. de 5 campos visuales no solapantes. (C) Se trataron las células con 100 ng/ml de pHrodo-T-DM1 durante 24 horas a 37°C, se recolectaron y se analizaron por citometría de flujo. Se representa la intensidad media de fluorescencia (IMF), relativa a las células parentales, como la media  $\pm$  d.e. de tres experimentos independientes.





## **CAPÍTULO II**



## **Capítulo II: Potencial terapéutico de T-DM1 en cáncer de ovario HER2 positivo**

### **1. IDENTIFICACIÓN DE HER2 COMO DIANA TERAPÉUTICA EN CÁNCER DE OVARIO**

A pesar de los avances en cirugía y quimioterapia, el cáncer de ovario metastásico sigue siendo una enfermedad incurable, debido en parte a la falta de estrategias terapéuticas efectivas. Por ello, se está poniendo mucho esfuerzo en definir dianas moleculares potenciales que pudieran aumentar la supervivencia de las pacientes con esta patología. Entre los diferentes tratamientos experimentales que se están probando en ensayos clínicos, los agentes que actúan sobre tirosina quinasas, por su importante papel como mediadoras de la señalización celular, han recibido una atención especial (Ocana y Pandiella 2013).

#### **1.1. Análisis del perfil de tirosina quinasas activas en muestras de pacientes con cáncer de ovario**

Las tirosina quinasas tienen un papel crucial en la iniciación y progresión del cáncer, por ello, se diseñó un estudio para evaluar el estado de activación de varias tirosina quinasas en cáncer de ovario. Se optó por estudiar el estado de activación en lugar de los niveles totales de expresión dado que este dato está ligado a la funcionalidad de las quinasas y, por tanto, resulta más preciso a la hora de determinar su potencial relevancia en la iniciación y progresión del cáncer (Lemmon y Schlessinger 2010). La actividad tirosina quinasa se puede analizar directamente mediante ensayos de actividad, pero es más frecuente determinarla mediante la fosforilación en determinados residuos de tirosina considerados marcas de activación. Otro prerrequisito del estudio fue analizar tirosina quinasas contra las cuales hubiera fármacos ya disponibles o en ensayos clínicos, con el

objetivo de trasladar rápidamente los hallazgos encontrados a la práctica clínica. Esto restringió el análisis a 22 tirosina quinasas, incluyendo RTKs y quinasas citosólicas. La lista de quinasas seleccionadas, así como los fármacos (aprobados por la FDA) que actúan contra ellas (Ursu *et al.* 2017) se muestra en la tabla 8. Se añadieron también al estudio otros tres RTKs: HER4, DTK y EPHA2. El primero se incluyó debido al papel tan relevante de los receptores ERBB en cáncer, aunque no hay agentes contra esta quinasa bajo desarrollo clínico. Las otras dos quinasas se espera que estén inactivas y se incluyeron como controles negativos.

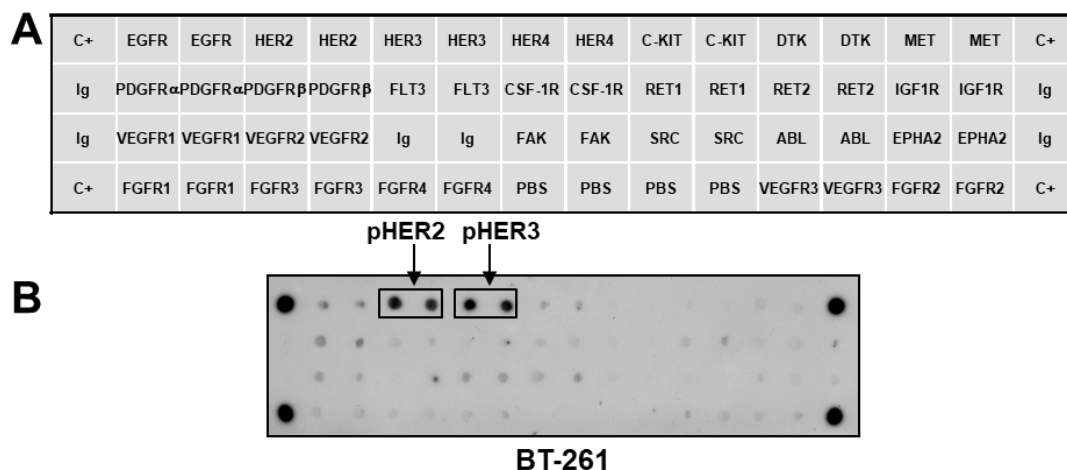
**Tabla 8. Tirosina quinasas analizadas y fármacos disponibles contra ellas.**

Nombre	Fármacos
<b>EGFR</b>	Neratinib, Olmutinib, Osimertinib, Gefitinib, Erlotinib, Lapatinib, Icotinib, Afatinib, Necitumumab, Panitumumab, Cetuximab
<b>HER2</b>	Trastuzumab, Lapatinib, Pertuzumab, T-DM1, Afatinib, Neratinib
<b>HER3</b>	MM-121*, Patritumab*
<b>C-KIT</b>	Axitinib, Dasatinib, Pazopanib, Imatinib, Sunitinib
<b>MET</b>	Cabozantinib, Crizotinib
<b>PDGFR<math>\alpha</math></b>	Olaratumab, Ponatinib, Axitinib
<b>PDGFR<math>\beta</math></b>	Axitinib, Sunitinib, Sorafenib
<b>FLT3</b>	Midostaurin, Sorafenib, Cabozantinib
<b>CSF-1R</b>	Pazopanib, Sunitinib
<b>RET1</b>	Cabozantinib, Alectinib, Sunitinib
<b>RET2</b>	Cabozantinib, Alectinib, Sunitinib
<b>IGF1R</b>	Sunitinib, Masoprocol
<b>VGFR1</b>	Axitinib, Pazopanib, Sunitinib, Nintedanib
<b>VGFR2</b>	Ramucirumab, Cabozantinib, Axitinib, Pazopanib, Regorafenib
<b>VGFR3</b>	Axitinib, Nintedanib, Pazopanib
<b>FAK</b>	GSK2256098*
<b>SRC</b>	Dasatinib, Bosutinib
<b>ABL</b>	Nilotinib, Imatinib, Radotinib, Dasatinib, Ponatinib, Bosutinib
<b>FGFR1</b>	Nintedanib, Pazopanib
<b>FGFR2</b>	Nintedanib
<b>FGFR3</b>	Nintedanib, Pazopanib
<b>FGFR4</b>	Nintedanib

\*En ensayos clínicos; aún no aprobados para uso comercial.

Debido a la falta de disponibilidad de *arrays* comerciales que cubrieran el conjunto de tirosina quinasas que se deseaba estudiar, se prepararon dichos *arrays* en el laboratorio, tras testar cuidadosamente los diferentes anticuerpos contra

cada antígeno para seleccionar los anticuerpos de captura óptimos que se usarían. Se adsorbieron por duplicado los anticuerpos en la membrana de nitrocelulosa y se hibridaron los lisados proteicos de los distintos tumores de ovario. La figura 36 detalla el mapa con la posición de los anticuerpos de captura usados en el *array*, así como un resultado representativo, generado tras la hibridación y el WB.



**Figura 36. Arrays de tirosina quinasa “caseros”.** (A) Mapa 2D que detalla la posición de los diferentes anticuerpos de captura usados en el *array*. C+: controles positivos. Ig o PBS: controles negativos. (B) Imagen de un *array* representativo de una muestra tumoral.

Se analizaron dieciséis muestras de tumores de ovario mediante estos *arrays* de anticuerpos. Las características de las pacientes se detallan en la tabla 9.

**Tabla 9. Características de las pacientes de cáncer de ovario.**

Edad	$\mu=60,37$ (43-77)	%	n=16
Tipo tumoral	Cistoadenocarcinoma	68,75%	n=11
	Tumor <i>borderline</i>	6,25%	n=1
	Carcinoma seroso	18,75%	n=3
	Indiferenciado	6,25%	n=1
Estadio	IA	6,25%	n=1
	IIIA	12,50%	n=2
	IIB	12,50%	n=2
	IIC	12,50%	n=2
	IIIC	56,25%	n=9
ECOG	0	7,70%	n=1
	1	61,50%	n=8
	2	23,10%	n=3
	4	7,70%	n=1

Al analizar los datos obtenidos tras hibridar todas las muestras con los *arrays*, se observó que las tirosina quinasas que se encontraban más frecuentemente activas eran HER2 (95% de los pacientes), HER3 (80%), EGFR (37%), FAK (37%) y HER4 (25%) (Figura 37A). Cabe destacar que estos análisis también revelaron que con frecuencia coexistían varias quinasas activas en un mismo tumor (Figura 37B).

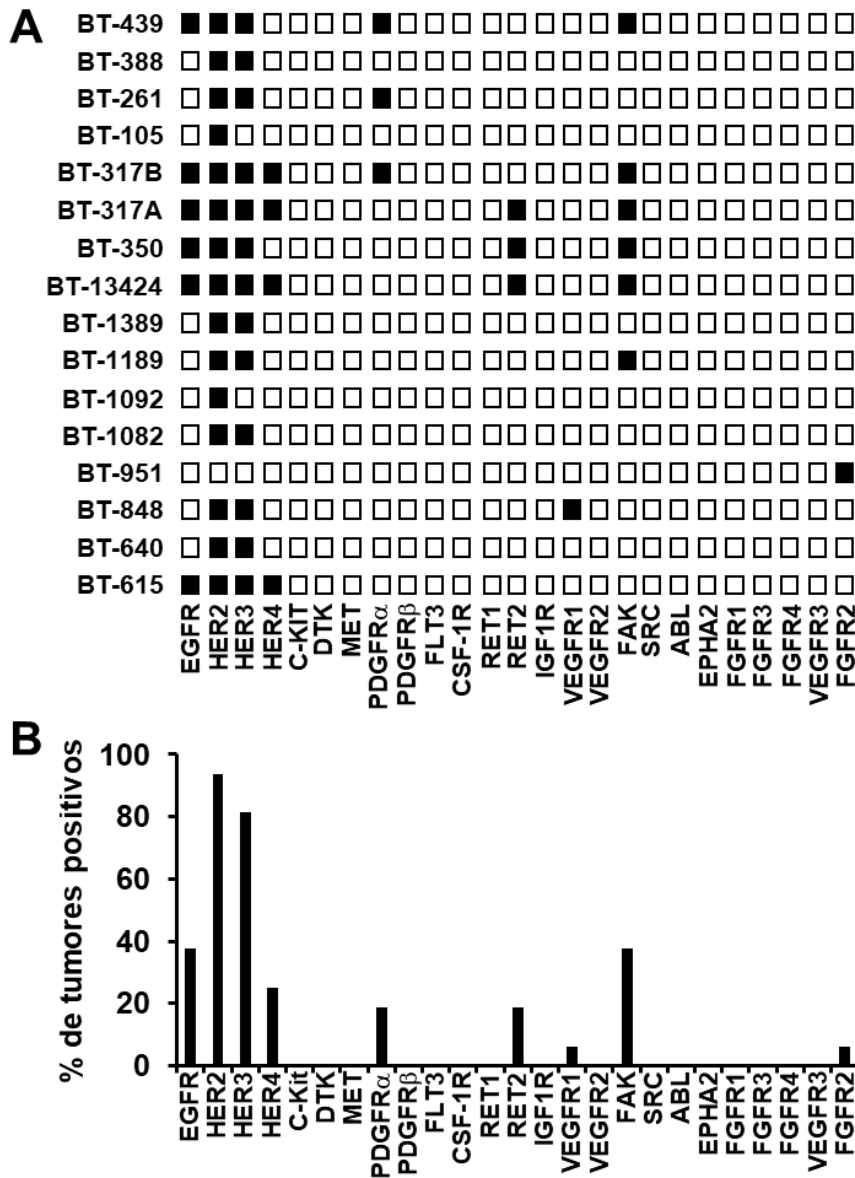
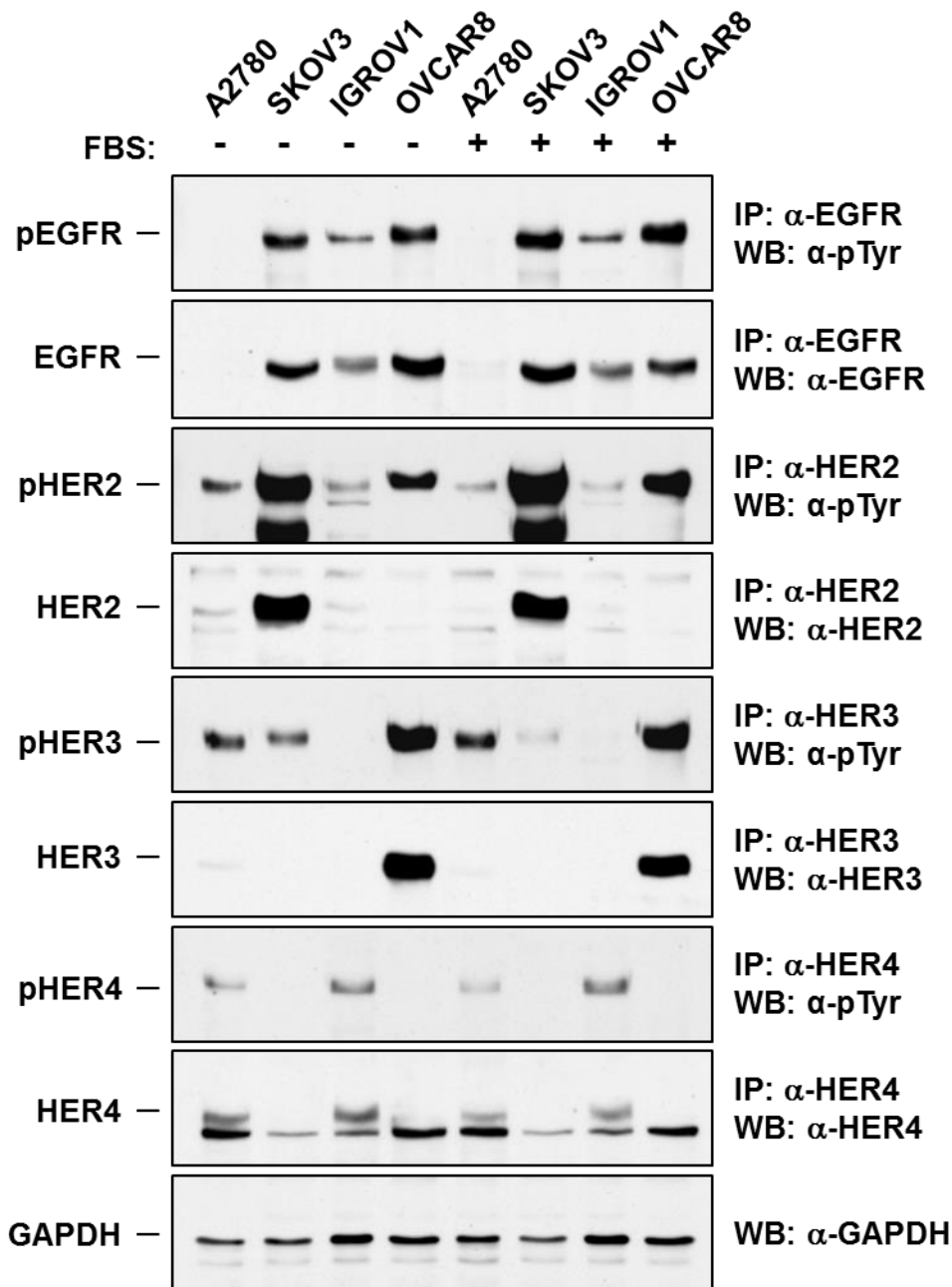


Figura 37. Perfil de tirosina quinasas activas en muestras tumorales de pacientes con cáncer de ovario. (A) Las tirosina quinasas fosforiladas en cada uno de los tumores se muestran como cuadrados negros. (B) Frecuencia de activación en el total de muestras tumorales de cada una de las tirosina quinasas analizadas.

## 1.2. Análisis del potencial de HER2 como diana terapéutica en cáncer de ovario

### 1.2.1. Efecto del silenciamiento de HER2 en la proliferación de células de cáncer de ovario

Los estudios anteriores indicaron que los receptores ERBB, en particular HER2, se encontraban constitutivamente activos en una gran proporción de las muestras de cáncer de ovario. Para investigar la relevancia de estos receptores en la proliferación celular, se usaron cuatro líneas celulares de carcinoma de ovario en las que se analizó en primer lugar el estado de activación de los receptores ERBB por WB. Como se observa en la figura 38, las líneas celulares SKOV3 y OVCAR8 expresaron formas activas de EGFR, HER2 y HER3, y dicha expresión no se vio sustancialmente afectada por la presencia de suero en el medio, cuya riqueza en factores de crecimiento tales como EGF podría desvirtuar el resultado del estado de activación de los receptores. Las células IGROV1 mostraron expresión y activación de los cuatro receptores ERBB. En comparación con las otras líneas celulares, las células A2780 e IGROV1 presentaron cantidades muy pequeñas de HER2 activo. La línea A2780 no expresó niveles detectables de EGFR, HER3 o HER4 activos. Cabe destacar que HER2 fue el único receptor de la familia HER que se expresaba y, además, se encontraba activo en las cuatro líneas celulares de carcinoma de ovario, aunque en distinto grado. Esta última observación va en consonancia con los datos obtenidos de las muestras de pacientes usando los *arrays* de anticuerpos, donde se detectó HER2 como la quinasa más frecuentemente activada.

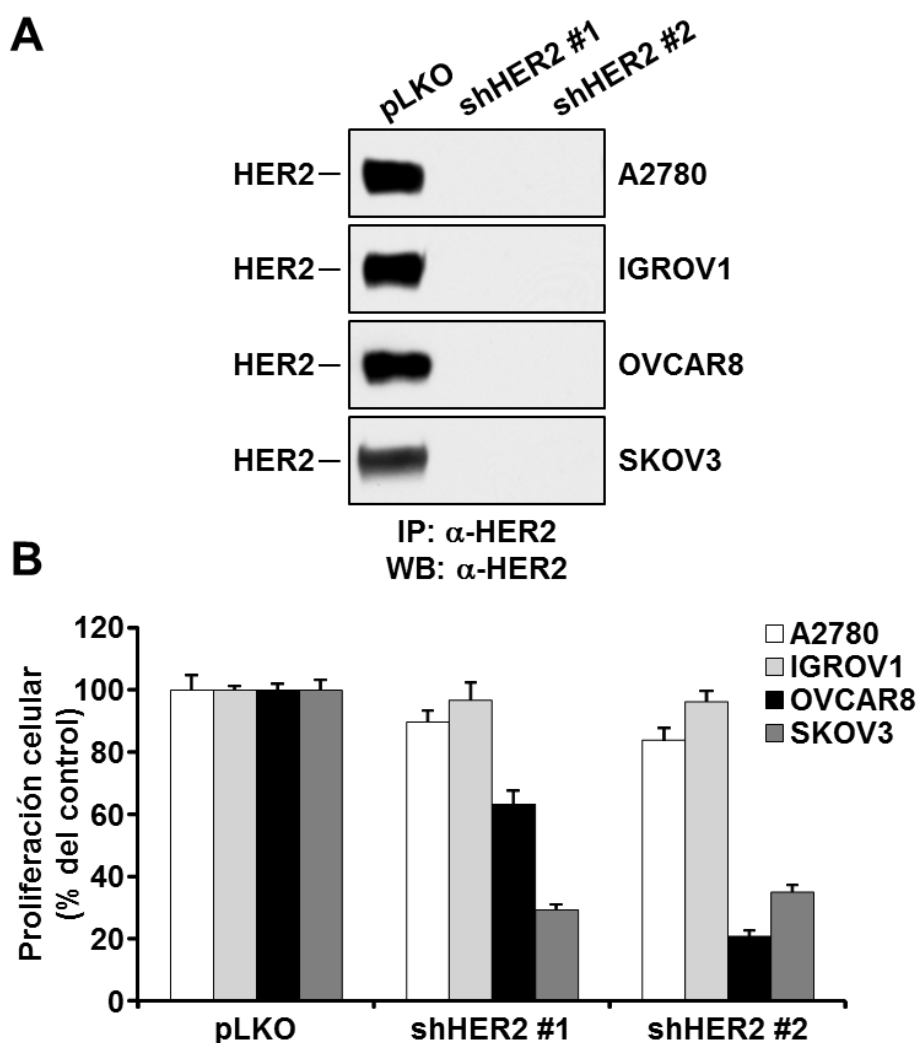


**Figura 38. Niveles de receptores ERBB totales y activos en líneas celulares de cáncer de ovario.** Las células se cultivaron durante 12 horas en presencia o ausencia de FBS, se lisaron y se inmunoprecipitaron con los anticuerpos contra cada uno de los receptores. Para ver activación, se utilizó un anticuerpo anti-fosfo-tirosina y para los niveles totales, anticuerpos específicos para cada receptor. Se usó GAPDH como control de carga.

Para explorar la relevancia de HER2 en el control de la proliferación de las líneas celulares de cáncer de ovario, se silenciaron los niveles de la proteína mediante shRNA. Se probaron cinco secuencias independientes y las dos que



produjeron un mayor nivel de silenciamiento se seleccionaron para llevar a cabo los ensayos funcionales. Como se muestra en la figura 39A, se obtuvo un silenciamiento eficiente de HER2 en las cuatro líneas celulares con los dos shRNAs usados. Esta reducción en los niveles de HER2 afectó profundamente la proliferación de las SKOV3 y OVCAR8. Por el contrario, el efecto en proliferación celular fue mucho menor en las células A2780 e IGROV1 (Figura 39B).

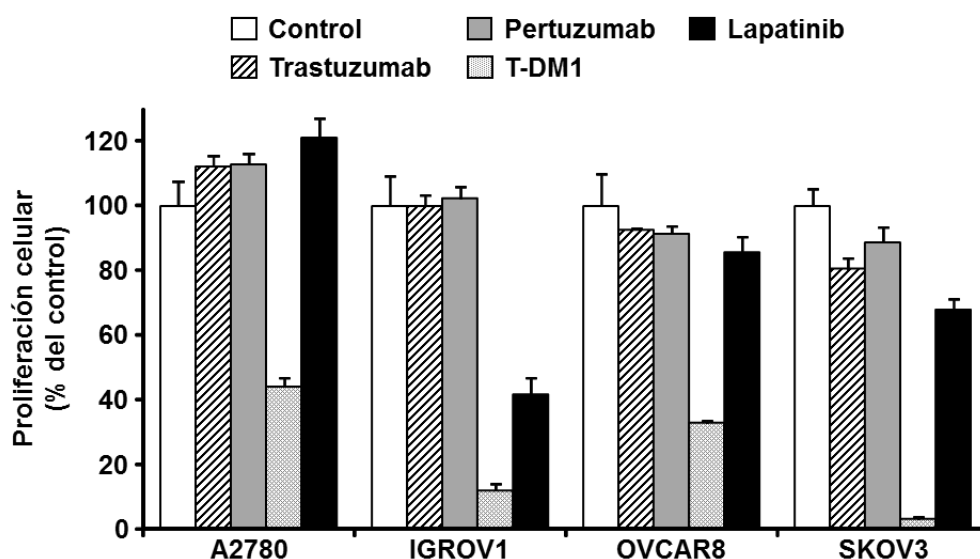


**Figura 39. Silenciamiento de HER2 en líneas celulares de cáncer de ovario. (A)** Se analizaron extractos celulares de las diferentes líneas celulares transducidas con shRNAs por IP seguida de WB, con un anticuerpo anti-HER2. **(B)** Efecto del silenciamiento de HER2 en la proliferación celular. Una vez comprobado el silenciamiento, se sembraron las células en placas de 6 pocillos y se contaron a los 5 días. Los resultados se representan como el porcentaje de la media  $\pm$  d.e., relativo a las células transducidas con un shRNA no codificante (pLKO); n=3. Se muestra un experimento representativo que se repitió dos veces.

### 1.2.2. Efecto de la inhibición farmacológica de HER2 in vitro

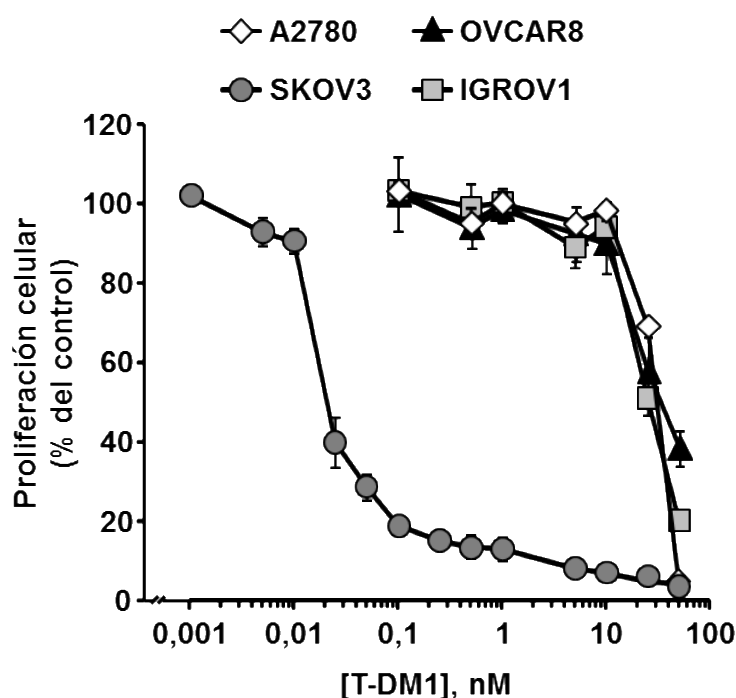
Los efectos antiproliferativos observados en las líneas celulares de ovario tras el bloqueo genético de HER2 sugerían que un bloqueo farmacológico del receptor podría ejercer una acción antitumoral en cáncer de ovario. Por ello, se evaluó el efecto de fármacos aprobados en terapias dirigidas contra HER2. Se trataron las cuatro líneas celulares con trastuzumab, pertuzumab, lapatinib o T-DM1 y se analizó la proliferación celular tras 7 días de tratamiento. Como se observa en la figura 40, la adición de trastuzumab o pertuzumab no afectó la proliferación en ninguna de las líneas estudiadas. Por el contrario, en todas ellas se observó un fuerte efecto antiproliferativo tras el tratamiento con T-DM1. La línea celular más sensible a T-DM1 fue SKOV3 y la más resistente, A2780. En lo que respecta al tratamiento con lapatinib, redujo ligeramente la proliferación en el caso de SKOV3, mientras que en OVCAR8 y A2780 el efecto del fármaco fue marginal. Curiosamente, lapatinib inhibió sustancialmente la proliferación de las células IGROV1, a pesar de que esta línea celular fue bastante insensible al silenciamiento de HER2. Estas células también fueron bastante sensibles a la acción de T-DM1.

140



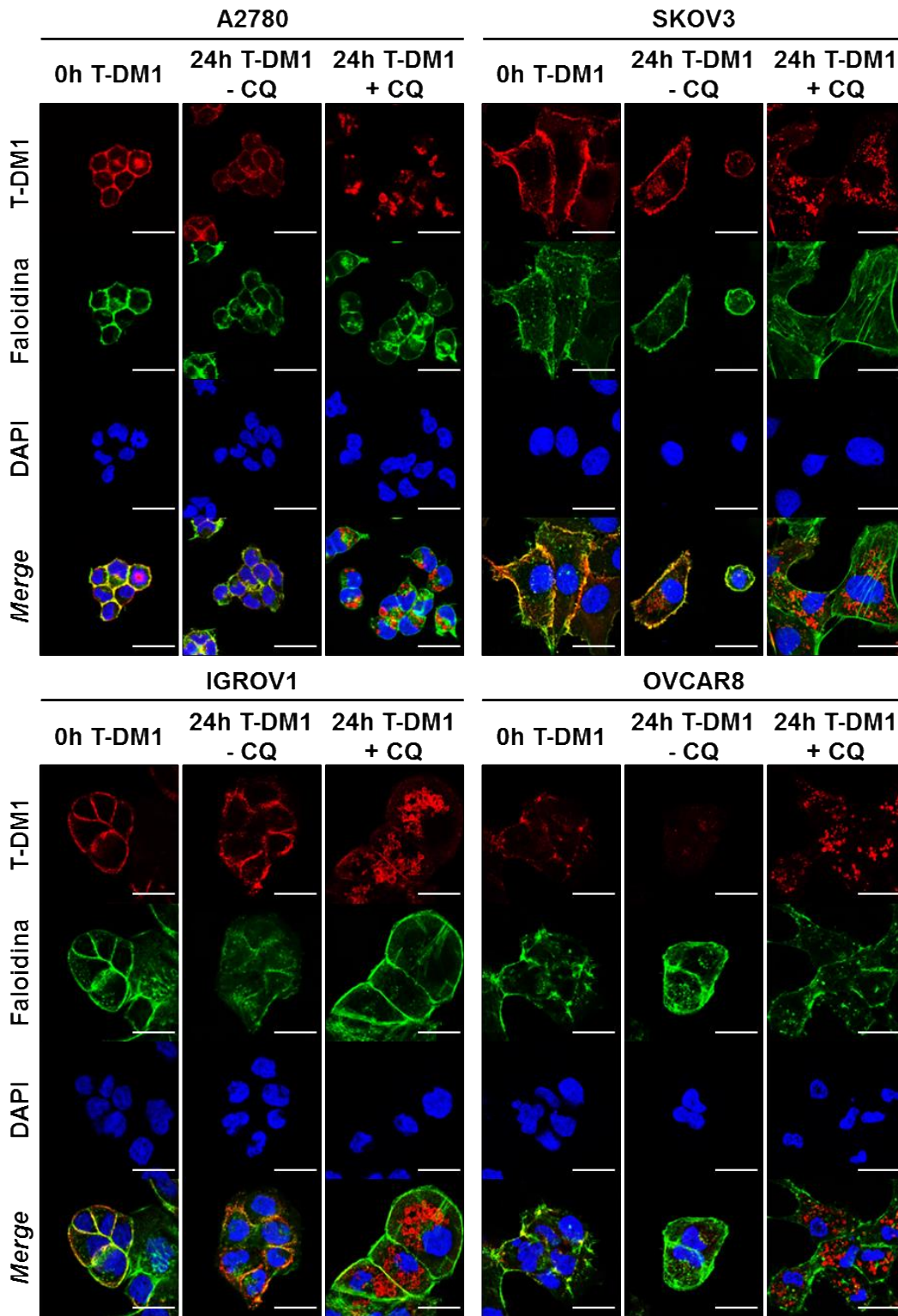
**Figura 40.** Efecto de diferentes fármacos usados en terapias dirigidas contra HER2 en la proliferación de líneas celulares de cáncer de ovario. Se trataron las células, sembradas en placas de 6 pocillos, con 1  $\mu$ M lapatinib y 50 nM del resto de los fármacos indicados durante 7 días y se contaron. Los resultados se representan como el porcentaje de la media  $\pm$  d.e., relativo a las células control (sin tratamiento); n=3. Se muestra un experimento representativo que se repitió dos veces.

A continuación, se llevaron a cabo estudios de dosis-respuesta a T-DM1 en todas las líneas. Los datos obtenidos confirmaron el alto grado de sensibilidad de la línea SKOV3 con respecto al resto (Figura 41). De hecho, en estas condiciones de tratamiento, el valor de  $IC_{50}$  de T-DM1 en células SKOV3 estaba en el rango picomolar ( $IC_{50}=20$  pM), mientras que para el resto de las líneas celulares de cáncer de ovario los valores de  $IC_{50}$  fueron  $>10$  nM.



**Figura 41. Dosis-respuesta a T-DM1 en las líneas de cáncer de ovario.** Se sembraron las células, se trataron con las dosis indicadas de T-DM1 y se contaron a los 5 días. Los resultados se representan como el porcentaje de la media  $\pm$  d.e., relativo a las células control (sin tratamiento);  $n=3$ . Se muestra un experimento representativo que se repitió dos veces.

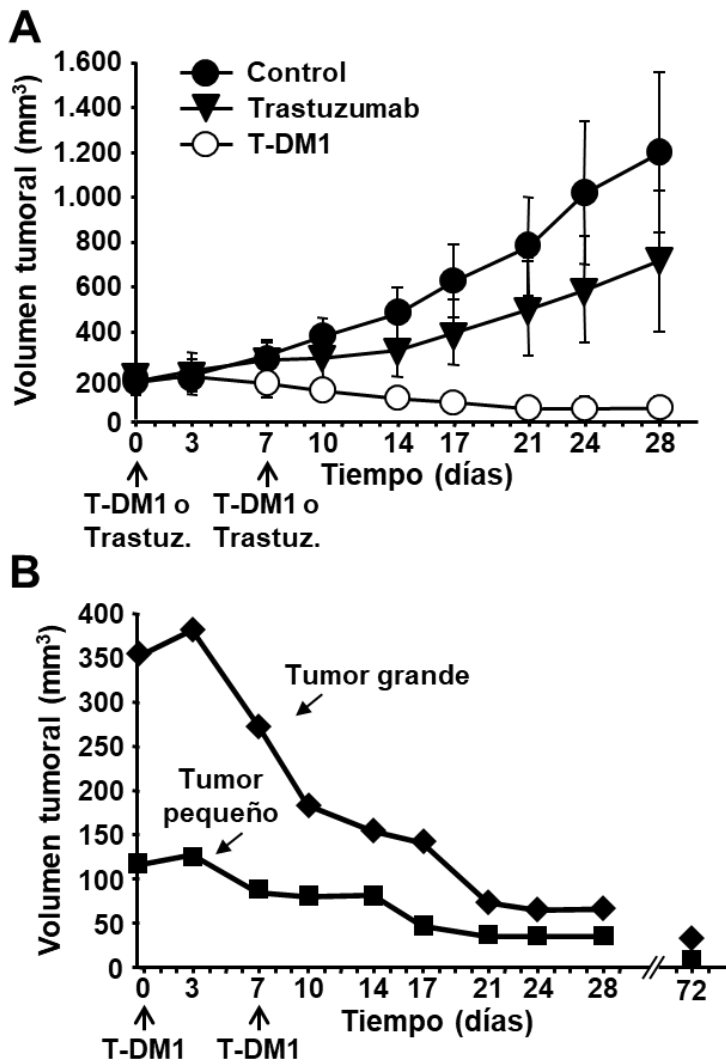
Estas diferencias en la sensibilidad a T-DM1 podrían estar ligadas a las diferencias en los niveles de HER2 presentes entre las distintas líneas celulares. Para comprobar si las células con niveles bajos de HER2 eran igual de eficientes en la internalización de T-DM1 como las líneas con niveles altos de la proteína, se llevaron a cabo experimentos de IF. Para evitar la degradación de T-DM1 y facilitar su visualización se usó cloroquina. Como se observa en la figura 42, todas las líneas celulares estudiadas fueron capaces de internalizar el fármaco.



**Figura 42. IF de T-DM1 en las líneas celulares de cáncer de ovario.** Se trataron las células con un pulso de 2 horas a 4°C con 50 nM T-DM1 y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se fijaron las células y se marcó T-DM1 (rojo), usando anti-humano-Cy3 como anticuerpo, actina (verde) y el DNA (azul). Escala: 25 µm. CQ: 50 µM cloroquina.

### 1.2.3. Efecto de la inhibición farmacológica de HER2 *in vivo*

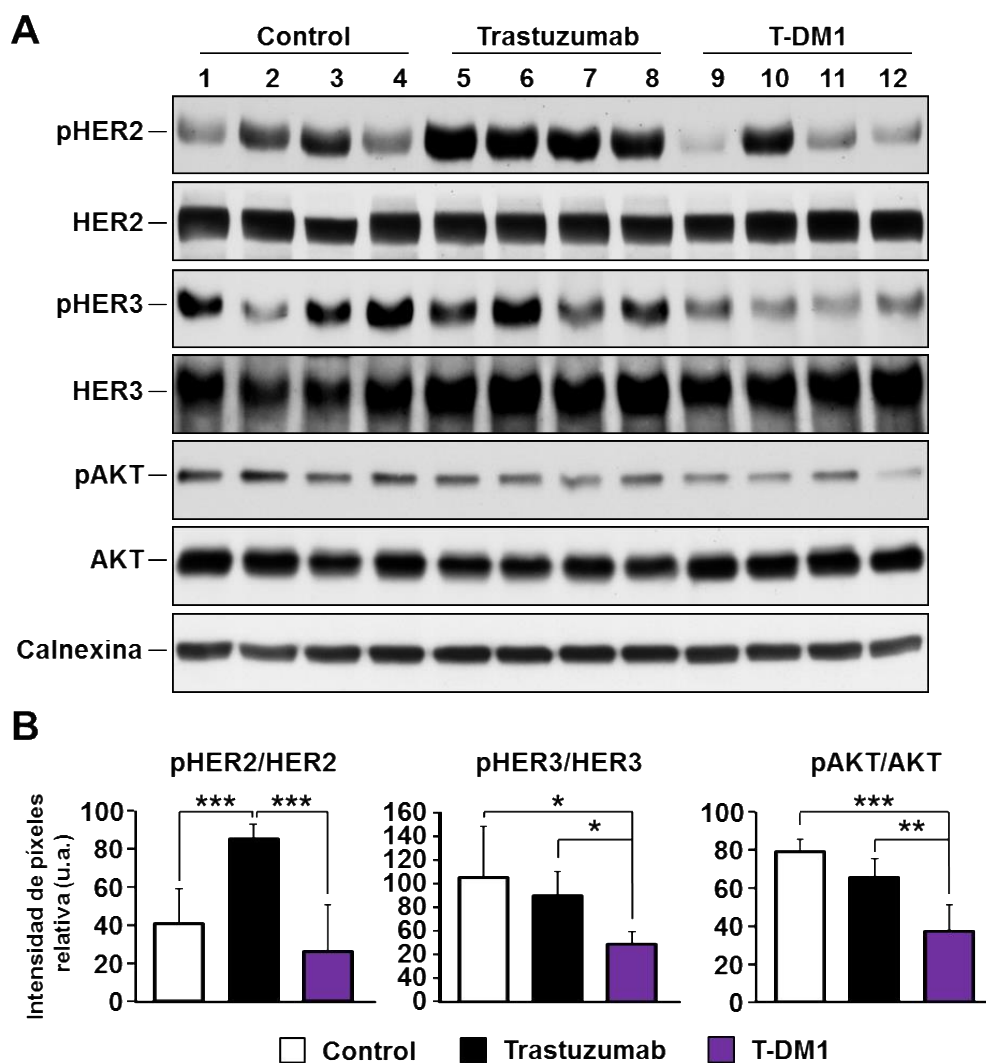
Parte del efecto antitumoral de trastuzumab se debe a mecanismos inmunológicos de ADCC (Clynes *et al.* 2000). Por lo tanto, es posible que su acción antitumoral en las células de ovario pudiera estar restringida a condiciones *in vivo*. Por ello, se llevaron a cabo experimentos para comparar el efecto *in vivo* de trastuzumab y T-DM1 en ratones inyectados de manera subcutánea con células SKOV3. Se seleccionó esta línea celular por sus altos niveles de receptores HER2 y su sensibilidad *in vitro* a T-DM1. Estos estudios mostraron que el tratamiento con trastuzumab ralentizó el crecimiento de los tumores, si se comparaban con los tumores de los ratones no tratados. Sin embargo, los tumores continuaron creciendo a lo largo del tiempo y no se observó regresión tumoral en ningún animal tratado con trastuzumab. Por otro lado, el tratamiento con T-DM1 no solo evitó el crecimiento tumoral, si no que provocó la regresión de los tumores (Figura 43A). De hecho, tras dos dosis de T-DM1, los tumores en algunos ratones llegaron a ser indetectables tras 21 días desde la inyección inicial del fármaco. Además, no se observaron recidivas en el sitio de inyección ni 65 días después de la interrupción del tratamiento, independientemente del tamaño inicial del tumor (Figura 43B).



**Figura 43. Efecto de trastuzumab y T-DM1 *in vivo* en ratones inyectados con células SKOV3. (A)** Los ratones recibieron dos dosis de fármacos (día 0 y 7 de tratamiento) y los tumores se midieron dos veces por semana. Los resultados se representan como la media  $\pm$  d.e. del volumen tumoral de los ratones de cada grupo;  $n=5$ , control;  $n=5$ , trastuzumab;  $n=5$ , T-DM1. Se llevaron a cabo análisis estadísticos de las mediciones obtenidas al final del experimento (día 28), con los siguientes resultados: control vs trastuzumab,  $p=0,504$ ; control vs T-DM1,  $p=0,0001$ ; trastuzumab vs T-DM1,  $p=0,004$ . Los  $p$  valores se calcularon mediante la prueba  $t$  de Student de dos colas. **(B)** Ausencia de recidivas en tumores grandes y pequeños tras la regresión provocada por el tratamiento con T-DM1. Los datos representados corresponden a las mediciones de dos tumores diferentes de dos animales distintos que se siguieron hasta 72 días desde el inicio del tratamiento (65 días después de la última inyección de T-DM1).

El análisis bioquímico de los tumores reveló que ni el tratamiento con trastuzumab ni con T-DM1 afectaba los niveles totales de HER2 (Figura 44A). T-DM1 provocó una disminución de la cantidad de pHER3 y pAKT en mayor grado

que trastuzumab. Por otro lado, se observaron mayores niveles de pHER2 en los tumores de ratones tratados con trastuzumab, al compararlos con los no tratados o tratados con T-DM1 (Figura 44B). En conjunto, estos datos indicaron que T-DM1 ejercía un importante efecto antitumoral en las células de cáncer de ovario, que claramente superó el efecto del trastuzumab.

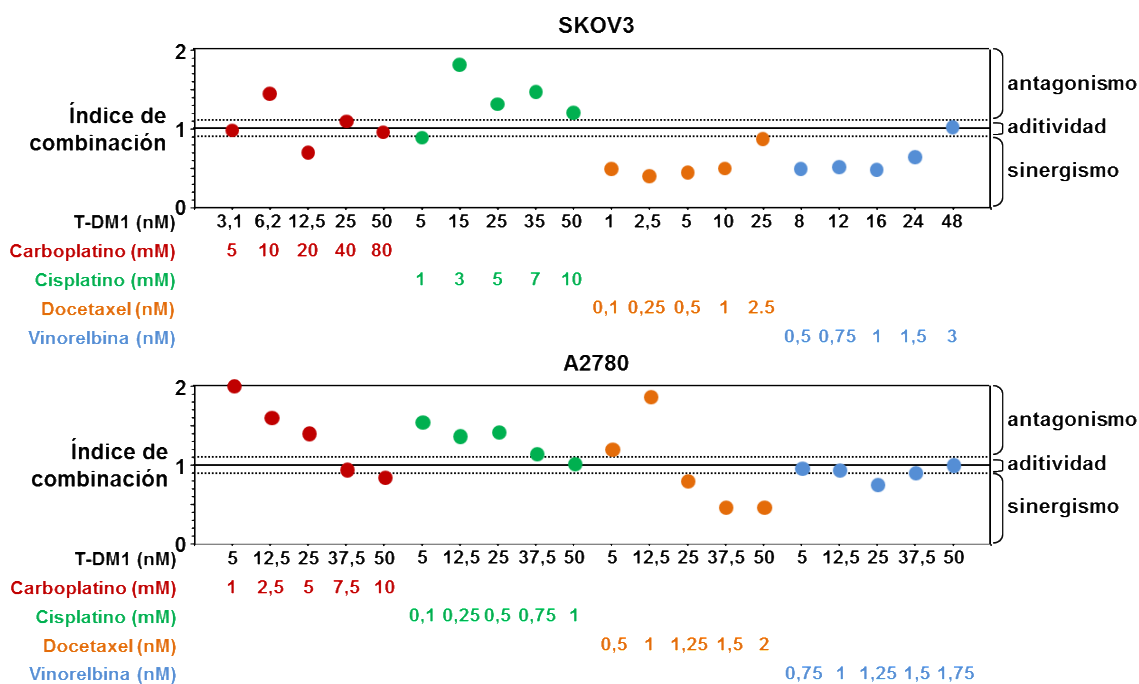


**Figura 44. Tumores de ratones control y tratados con trastuzumab y T-DM1 analizados a nivel bioquímico. (A)** Dos días después de la segunda dosis, se obtuvieron los tumores de ratones de los diferentes grupos y se congelaron en nitrógeno líquido. Tras obtener el extracto proteico, se analizó la expresión de pHER2, HER2, pHER3, HER3, pAKT, AKT y calnexina por WB. **(B)** Cuantificación de los niveles de las distintas proteínas en los tumores control y tratados. La gráfica muestra la media  $\pm$  d.e. de la intensidad de píxeles de la banda correspondiente a pHER2, pHER3 y pAKT, relativa a los niveles totales de la proteína correspondiente, para los distintos grupos de animales;  $n=4$  tumores. \* $p$  valor  $\leq 0,05$ , \*\* $p$  valor  $\leq 0,01$ , \*\*\* $p$  valor  $\leq 0,005$ .



### 1.2.4. Efecto de la combinación de T-DM1 con fármacos standard of care

La mayoría de los tratamientos antitumorales están basados en combinaciones de fármacos, que han demostrado una clara actividad antiproliferativa superior a los tratamientos individuales. Por ello, se probaron combinaciones de T-DM1 con cisplatino, carboplatino, docetaxel o vinorelbina en las células SKOV3 y A2780, y los resultados se analizaron con el algoritmo de Chou-Talalay (Chou *et al.* 1994). Un índice de combinación  $< 1$  indica que las dosis capaces de producir un efecto dado en combinación son más bajas que las dosis esperadas de aditividad y pueden ser, por tanto, interpretadas como sinergismo. De manera similar, un índice de combinación  $> 1$  indica que las dosis en combinación son superiores a las dosis esperadas para aditividad y pueden interpretarse como antagonismo. Como se observa en la figura 45, T-DM1 mostró un efecto sinérgico con docetaxel y vinorelbina, especialmente en la línea SKOV3.



**Figura 45. Efecto de la combinación de T-DM1 con agentes quimioterapéuticos usados en cáncer de ovario (carboplatino, cisplatino, docetaxel y vinorelbina).** Se trataron las células SKOV3 y A2780 con las dosis indicadas de los fármacos y se valoró su proliferación mediante ensayos de metabolización de MTT. Se obtuvieron y representaron los índices de combinación para los diferentes fármacos usando el programa *CalcuSyn*.



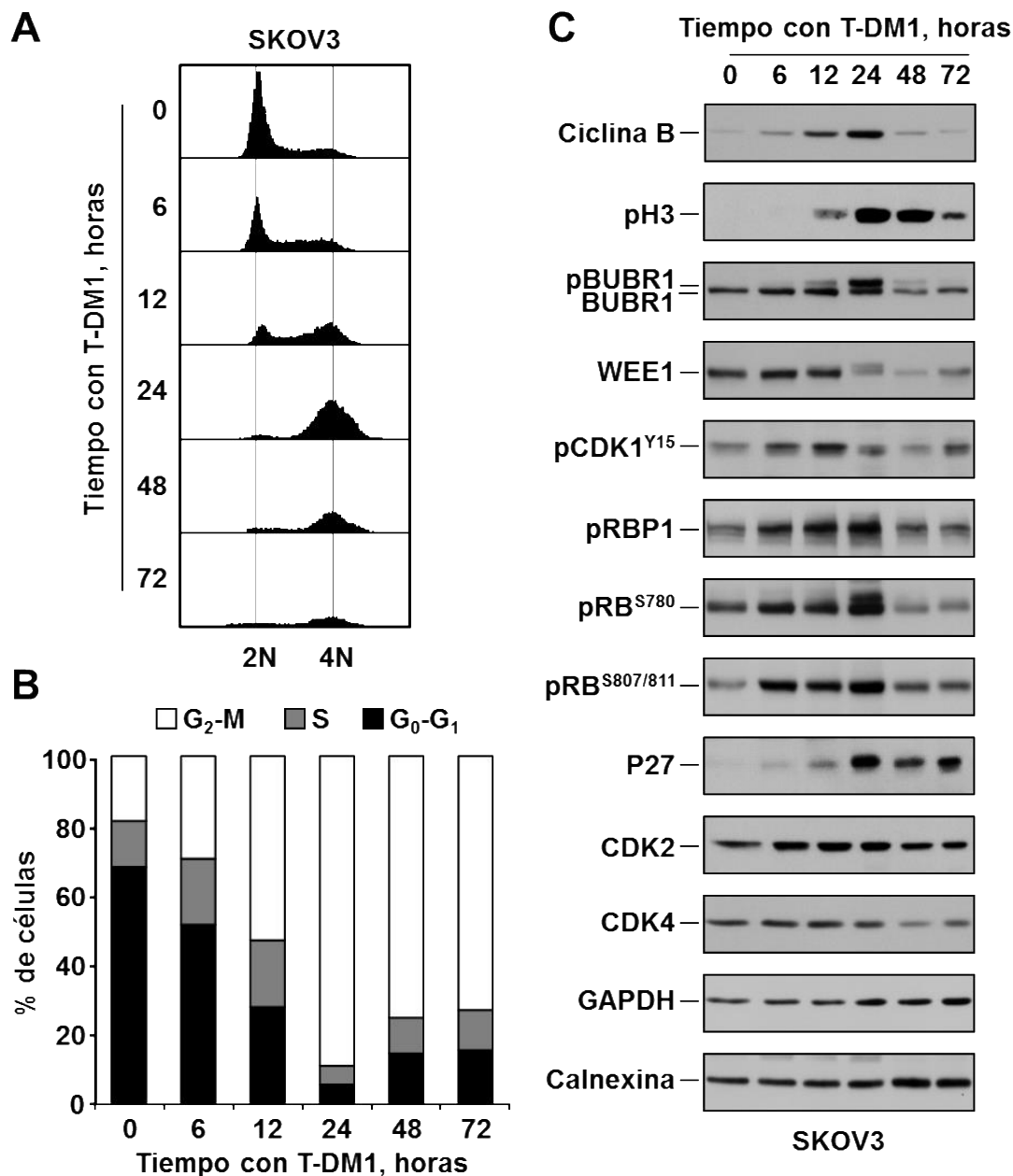
## 2. ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE T-DM1 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE OVARIO

### 2.1. Efecto de T-DM1 sobre el ciclo celular de células de cáncer de ovario

La disminución en el número de células provocada por el tratamiento con T-DM1 podría deberse a la inhibición de la proliferación, la estimulación de la muerte celular o ambas. Para investigar el mecanismo del efecto antiproliferativo observado en las líneas de cáncer de ovario, se tiñeron las células SKOV3 con PI y se analizó por citometría de flujo la distribución de las fases del ciclo celular a lo largo del tiempo de tratamiento con T-DM1. Como se observa en la figura 46A, T-DM1 provocó la acumulación de las células en la fase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular. Este efecto fue más evidente a las 24 horas de tratamiento, cuando el porcentaje de células en dicha fase fue superior al 80% (Figura 46B). A tiempos más largos, aunque también se observa la parada, este efecto resultó más difícil de apreciar, debido a la acción del fármaco sobre los perfiles del ciclo celular.

Para concretar si T-DM1 paraba las células SKOV3 en fase G<sub>2</sub> o M, se llevaron a cabo análisis bioquímicos de proteínas cuyos niveles marcan las diferentes fases del ciclo celular. Para ello, las SKOV3 se trataron con el fármaco durante distintos tiempos y se prepararon lisados celulares para analizar el estado de estos marcadores proteicos. El tratamiento con T-DM1 provocó la acumulación de los marcadores mitóticos fosfo-histona H3 y fosfo-BUBR1, alcanzando un pico a las 24 horas (Figura 46C). Además, a ese tiempo, se observó una desfosforilación de CDK1 y una disminución de WEE1, ambos eventos necesarios para la entrada de las células en mitosis (Lapenna y Giordano 2009). Por otro lado, también se detectó un incremento en ciclina B1, que actúa uniéndose a CDK1 para permitir la entrada de las células en mitosis y la progresión a lo largo de la profase y metafase. Curiosamente, los niveles de P27, una proteína inhibidora de las quinasas

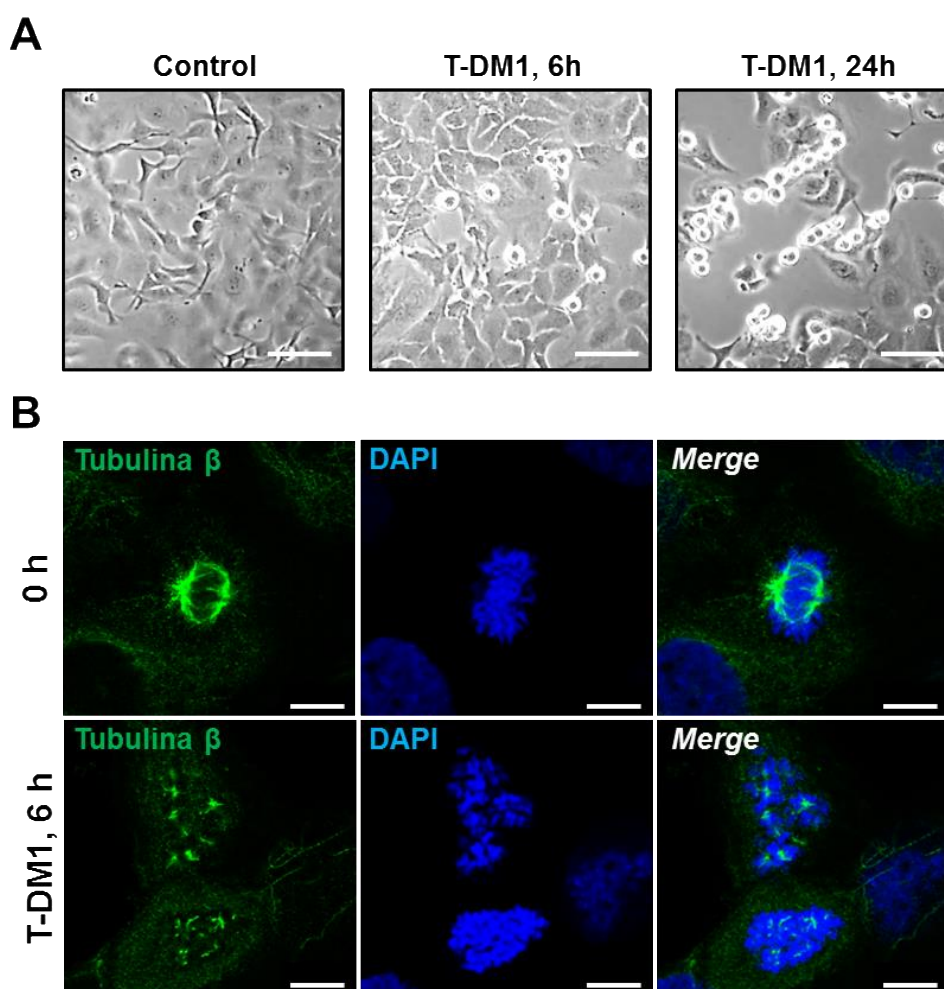
dependientes de ciclinas CDK2 y CDK4, también se vieron incrementados a partir de las 24 horas de tratamiento.



**Figura 46. Efecto de T-DM1 en el ciclo celular de células SKOV3.** Se trataron las células con 50 nM T-DM1 durante los tiempos indicados y se analizó la distribución de las fases del ciclo celular por tinción con PI y citometría de flujo. **(A)** Perfiles de ciclo celular. **(B)** Los resultados muestran el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo de un experimento representativo. **(C)** Se trataron las células con 50 nM T-DM1 y se lisaron en los tiempos indicados. Se determinó la expresión de las distintas proteínas por WB. Se utilizó la expresión de GAPDH y calnexina como control de carga.

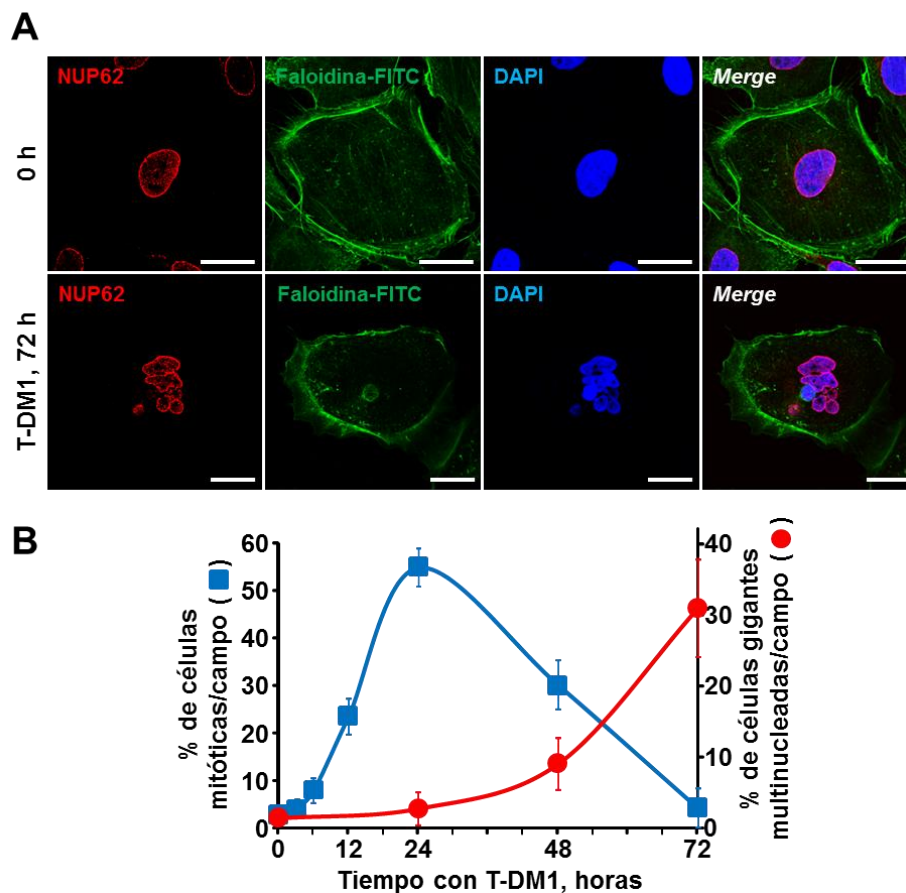
## 2.2. Efecto de T-DM1 sobre la muerte celular de células de cáncer de ovario

El análisis morfológico de las células tratadas con T-DM1 reveló que el fármaco provocaba un redondeo progresivo de los cultivos celulares, consistente con una acumulación de las células en mitosis (Figura 47A y Figura 47B). Además, los análisis de IF mostraron la aparición de husos mitóticos aberrantes tan solo 6 horas después de la adición de T-DM1 (Figura 47B).



**Figura 47. Parada en mitosis provocada por el tratamiento con T-DM1 de células SKOV3. (A)** Las células cultivadas en placas de 35 mm se trataron con 50 nM T-DM1 durante 6 o 24 horas y, a continuación, se tomaron imágenes de contraste de fases (objetivo 10X). Escala: 40  $\mu$ m. **(B)** IF del huso mitótico tras la acción de T-DM1. Se trataron las células con 50 nM T-DM1 durante 6 horas, se fijaron, se marcó tubulina  $\beta$  (verde) y el DNA (azul), y se tomaron imágenes representativas. Escala: 7,5  $\mu$ m.

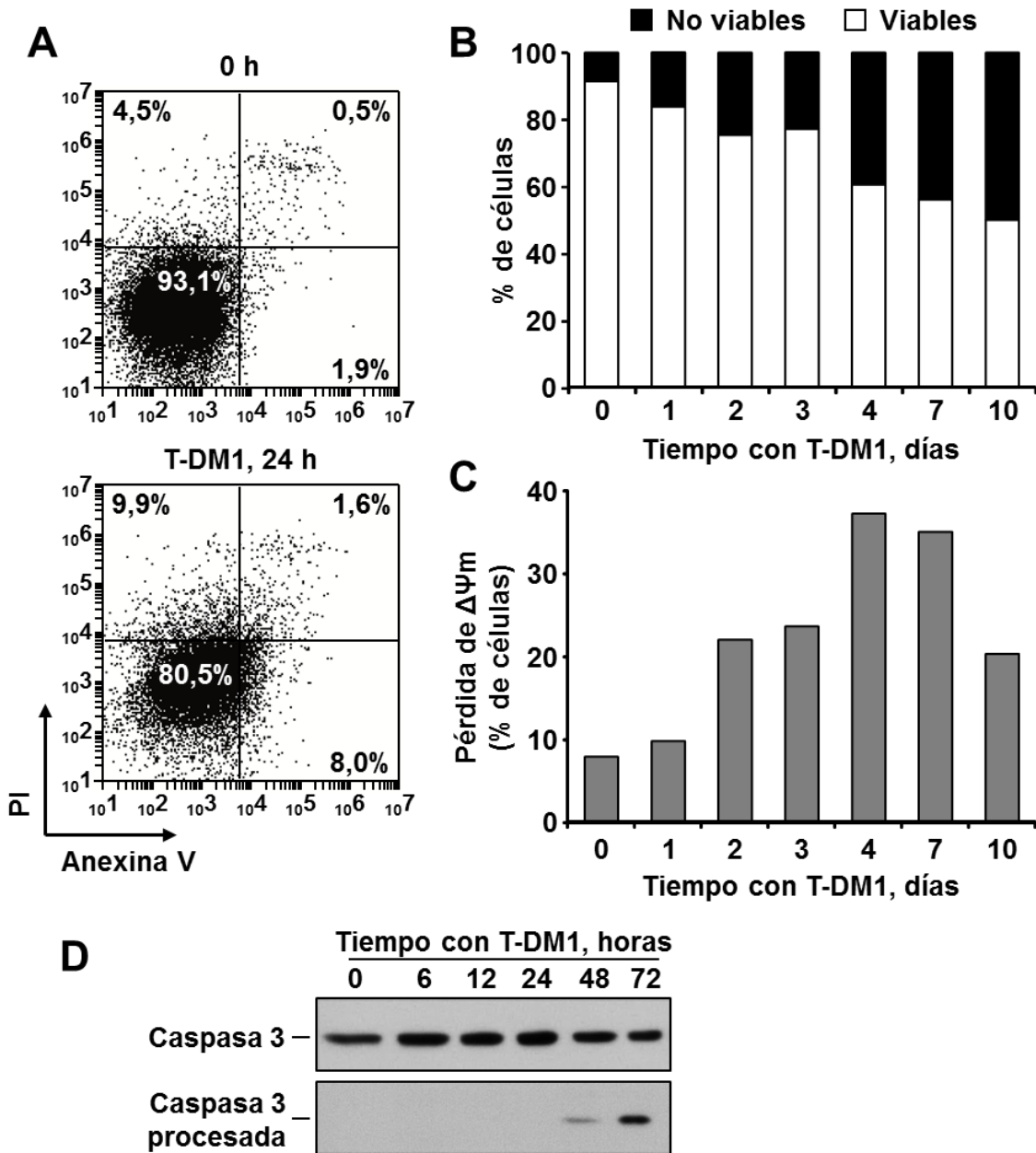
Aparte del efecto de T-DM1 en el ensamblaje y organización del huso mitótico, los análisis de IF también demostraron la aparición de células gigantes multinucleadas (GMC, *giant multinucleated cells*) a tiempos largos de incubación con el fármaco (48 y 72 horas) (Figura 48A). La cinética de aparición de estas células multinucleadas siguió un trascurso temporal inverso con respecto a la aparición de células mitóticas. La acumulación de células redondeadas alcanzó un pico a las 24 horas, tras lo que se produjo un descenso progresivo concomitante con la aparición de GMC (Figura 48B).



**Figura 48. Aparición de células gigantes multinucleadas tras el tratamiento con T-DM1 en células SKOV3. (A)** Detección por IF de GMC. Se trataron las células con 50 nM T-DM1 durante 72 horas, se fijaron, se marcó la membrana nuclear (rojo), actina (verde) y el DNA (azul), y se tomaron imágenes representativas. Escala: 25  $\mu$ m. **(B)** Porcentaje de células de aspecto mitótico y GMC, definidas como células con al menos tres núcleos, en los cultivos celulares de SKOV3. Se trataron las células con 50 nM T-DM1 durante 6 horas, se fijaron, se marcó tubulina  $\beta$  (verde) y el DNA (azul), y se contaron las células mitóticas y las GMC (objetivo 63X). Los resultados muestran el porcentaje de células mitóticas y de GMC respecto al total de células contadas, como la media  $\pm$  d.e. de 10 campos seleccionados arbitrariamente.

La presencia de GMC, causada probablemente por un ensamblaje aberrante del huso mitótico a consecuencia del derivado de la maitansina, fue indicativa de catástrofe mitótica, una forma de muerte celular disparada por una progresión deficiente a lo largo de la mitosis (Barok *et al.* 2011). Para indagar más en el mecanismo de muerte celular causado por T-DM1, se realizaron experimentos de doble tinción con anexina V/PI. Estos estudios indicaron que T-DM1 fue incapaz de incrementar de manera sustancial la muerte celular por apoptosis en las células SKOV3 a tiempos cortos de incubación (<24 horas) (Figura 49A). Sin embargo, la extensión de la incubación con el fármaco hasta 10 días provocó un incremento progresivo de la muerte celular (Figura 49B). Este tratamiento también causó una pérdida gradual del potencial de membrana mitocondrial (Figura 49C), indicativo de un incremento en la permeabilidad de la membrana externa de la mitocondria, un proceso que se ha ligado a muerte celular (Danial y Korsmeyer 2004). Este aumento de permeabilidad permite la liberación de proteínas desde el espacio intermembrana de la mitocondria, que podrían causar la activación de caspasas ejecutoras, importantes mediadores en procesos de muerte celular (Danial y Korsmeyer 2004). El tratamiento de SKOV3 con T-DM1 también se asoció a un procesamiento de caspasa 3 (Figura 49D). El incremento en caspasa 3 procesada se observó a las 48 y 72 horas de tratamiento con el fármaco, tiempos a los que la pérdida de potencial de membrana mitocondrial fue ya evidente.

En conjunto, estos datos indicaron que el tratamiento de células SKOV3 con T-DM1 provocó una parada del ciclo celular en mitosis, que progresó temporalmente a muerte celular por catástrofe mitótica.



**Figura 49. Efecto de T-DM1 en la muerte celular de células SKOV3.** (A) Se trataron las células con 50 nM T-DM1 durante 24 horas, se cotiñeron con anexina V-FITC y PI y se analizaron por citometría de flujo. Se representa el gráfico de dispersión, o *dotplot*, de la doble tinción. (B) Se trataron las células con 50 nM T-DM1 durante los tiempos indicados, se cotiñeron con anexina V-FITC y PI y se analizaron por citometría de flujo. Se representa el porcentaje de células viables (cuadrante anexina V-/PI-) y no viables (cuadrantes anexina V+/PI-, anexina V+/PI+ y anexina V-/PI+) de un experimento representativo. (C) Se trataron las células como en (B), se recolectaron y se tiñeron con TMRE para determinar el potencial de membrana mitocondrial. Se representa el porcentaje de células positivas para fluorescencia roja de un experimento representativo. (D) Se trataron las células como en (B), se lisaron y se analizaron los niveles de caspasa 3 total y caspasa 3 procesada por WB.

## **CAPÍTULO III**





## **Capítulo III: Dianas terapéuticas para ADCs en carcinoma renal de células claras**

### **1. IDENTIFICACIÓN DE EGFR Y SU LIGANDO TGF $\alpha$ COMO DIANAS TERAPÉUTICAS EN ccRCC**

Durante la última década, el tratamiento del carcinoma de células renales ha evolucionado desde una aproximación inmunológica no específica, basada en citoquinas, a terapias dirigidas, principalmente fármacos antiangiogénicos, y, más recientemente, nuevos agentes inmunoterápicos (Barata y Rini 2017). Aunque la tasa de supervivencia a 5 años ha mejorado, el pronóstico de los pacientes con ccRCC sigue siendo malo, especialmente en aquellos con enfermedad en estado avanzado. Por ello, resulta clave investigar nuevas dianas terapéuticas susceptibles de ser atacadas farmacológicamente con el fin de mejorar la respuesta de los pacientes al tratamiento sistémico del cáncer de riñón.

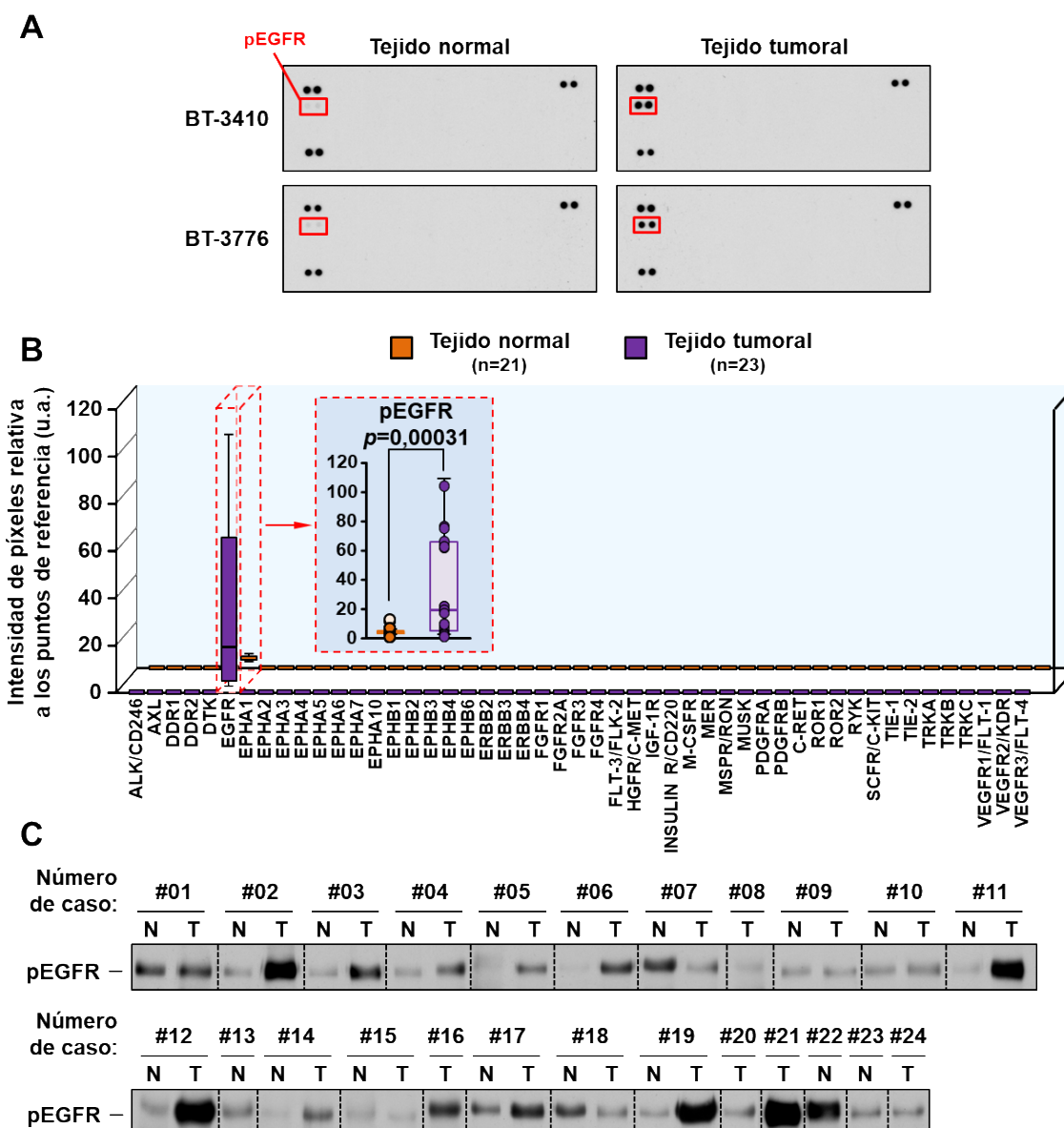
#### **1.1. Búsqueda de dianas terapéuticas en muestras tumorales de pacientes con ccRCC**

##### ***1.1.1. Análisis del perfil de receptores tirosina quinasa activos***

Ya se ha destacado el papel crucial que desempeñan las tirosina quinasas en la iniciación y progresión del cáncer. Dentro de esta familia de proteínas, los RTKs tienen una posición destacada, dado que, además de iniciar importantes rutas de señalización para la célula cancerígena, se localizan en la membrana plasmática, por lo que son proteínas accesibles contra las que dirigir de forma específica fármacos, como los ADCs. Por este motivo, se decidió evaluar el estado de activación de varios RTKs en ccRCC. En colaboración con el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Salamanca, se obtuvieron un total de 44 muestras procedentes de 24 pacientes con ccRCC (21 muestras de tejido renal

sano o normal y 23 muestras de tejido renal tumoral). De todas estas muestras, 20 casos fueron pareados, es decir, el tejido normal y el tejido tumoral correspondían al mismo paciente.

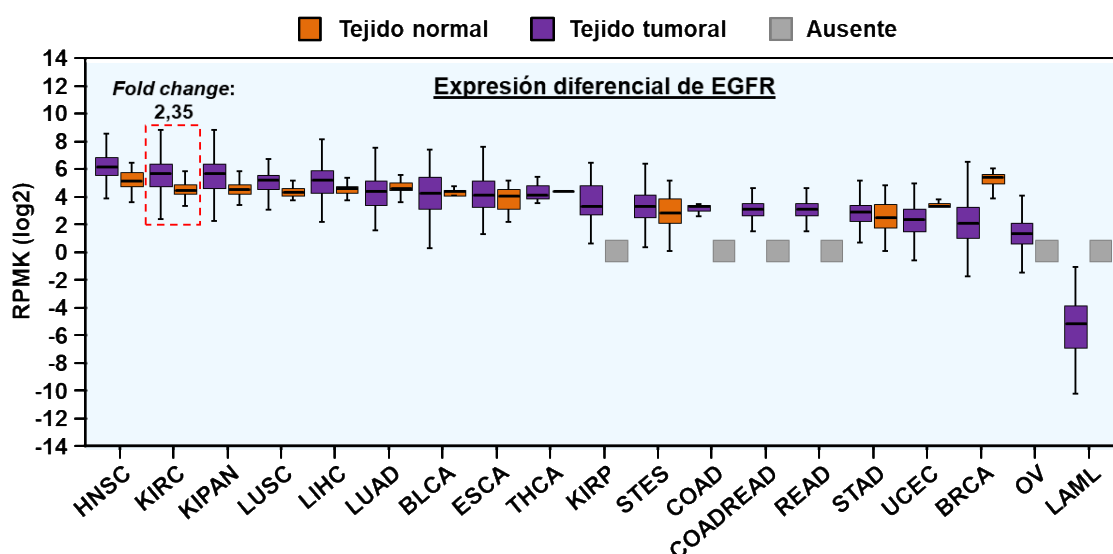
Al igual que en el caso de la búsqueda de dianas moleculares en cáncer de ovario (Capítulo II), se optó por estudiar el estado de activación de las proteínas, en lugar de los niveles totales de expresión, dado que este dato está ligado a su funcionalidad. Se utilizaron los *arrays* comerciales *Proteome Profiler Human Phospho-RTK*, que permiten evaluar de manera simultánea la fosforilación de 49 RTKs. La figura 50A muestra dos ejemplos representativos de *arrays* (procedentes de muestras de tejido normal y tejido tumoral de dos pacientes distintos) generados tras la hibridación y el WB. El análisis de los datos obtenidos tras hibridar todas las muestras con los *arrays* reveló que el único receptor que se encontraba activo en las muestras de pacientes con ccRCC era el EGFR (Figura 50B). Cabe destacar que el nivel de activación de EGFR en las muestras tumorales fue significativamente superior que en las muestras de tejido sano. Este resultado se validó posteriormente por IP y WB convencional (Figura 50C).



**Figura 50. Perfil de receptores tirosina quinasa activos en muestras de tejido sano y tejido tumoral de pacientes con ccRCC. (A)** Imagen de dos *arrays* representativos de una muestra de tejido sano y tumoral de riñón (correspondientes a dos pacientes distintos). **(B)** Nivel de fosforilación de los distintos RTKs, calculado como la intensidad media de píxeles de los duplicados de cada anticuerpo relativa a los puntos de referencia. Los datos se representan como diagramas de caja (mediana y rango intercuartílico) para el total de muestras de tejido sano (n=21) y de tejido tumoral (n=23). Recuadrado en rojo se muestra el análisis estadístico relativo al nivel de activación de EGFR en muestras de tejido sano y tumoral. El *p* valor se calculó mediante el test U de Mann-Whitney. **(C)** Nivel de fosforilación de EGFR en todas las muestras de pacientes con ccRCC, analizado por IP y WB convencional. Se inmunoprecipitaron 2 mg de extracto proteico con un anticuerpo anti-EGFR y se utilizó un anticuerpo anti-fosfo-tirosina para ver activación. N: tejido normal, T: tejido tumoral.

### **1.1.2. Estudio in silico de la expresión de EGFR en muestras de pacientes**

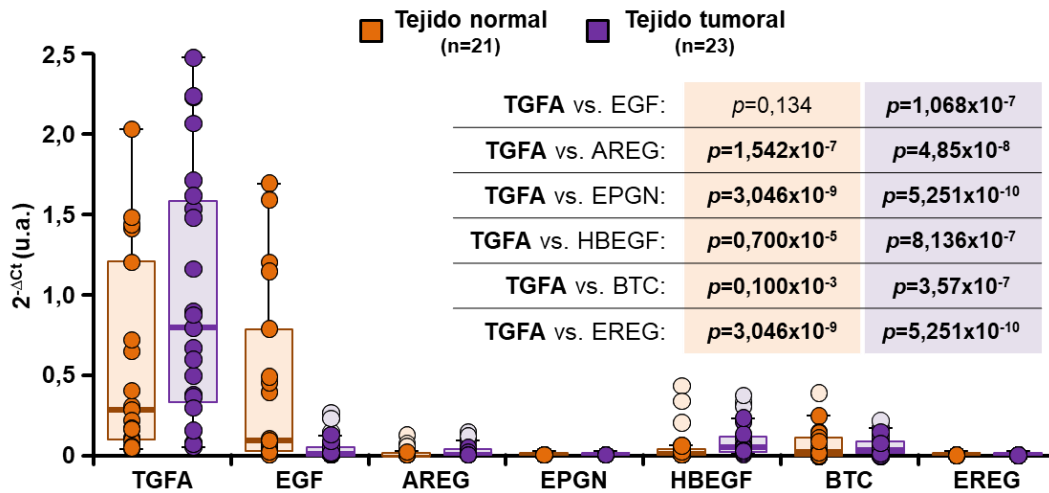
El hecho de que EGFR fuese el único RTK activo en las muestras de pacientes, junto con la mayor activación observada en tejido tumoral respecto al tejido sano resultó muy llamativo, por lo que se decidió hacer un análisis *in silico* de la expresión diferencial de esta proteína en distintos tipos de cáncer. Para ello, se recurrió a la base de datos *FireBrowse*, que estima los niveles de expresión de diferentes genes a partir de datos de mRNASeq de tejido normal y tumoral procedentes de pacientes con distintos tipos de cáncer. Los datos de expresión diferencial de EGFR obtenidos de *FireBrowse* corroboraron la alta expresión del receptor en carcinoma renal de células claras (Figura 51). Cabe destacar que fue el segundo tipo de cáncer donde mayor expresión se detectó, por detrás del carcinoma escamoso de cabeza y cuello, donde ya se ha descrito la importancia de EGFR y, de hecho, hay terapias dirigidas contra el mismo en uso clínico (Bonner *et al.* 2006). Además, la expresión fue 2,35 veces superior en tejido tumoral que en tejido sano (Figura 51).



**Figura 51. Expresión diferencial de EGFR en 19 tipos de cáncer distintos, tanto en tejido normal como en tejido tumoral.** Los datos representan el nivel de expresión del receptor obtenida a partir de datos de mRNASeq de acuerdo a las lecturas por kilobase del modelo de exón por millón de lecturas mapeadas. La medida RPKM de densidad de lectura refleja la concentración molar de un transcrito en la muestra de partida mediante la normalización por la longitud del RNA y por el número total de lecturas en la medida. Datos obtenidos de *FireBrowse*. Se resalta en rojo la expresión de EGFR correspondiente al carcinoma renal de células claras, indicando la tasa de cambio de expresión entre el tejido normal y el tejido tumoral. HNSC: *head and neck squamous cell carcinoma* (carcinoma escamoso de cabeza y cuello), KIRC: *kidney renal clear cell carcinoma* (carcinoma renal de células claras), KIPAN: *pan-kidney cohort* (cohorte de casos de carcinoma renal), LUSC: *lung squamous cell carcinoma* (carcinoma escamoso de pulmón), LIHC: *liver hepatocellular carcinoma* (carcinoma hepatocelular de hígado), LUAD: *lung adenocarcinoma* (adenocarcinoma de pulmón), BLCA: *bladder urothelial carcinoma* (carcinoma urotelial de vejiga), ESCA: *esophageal carcinoma* (carcinoma esofágico), THCA: *thyroid carcinoma* (carcinoma tiroideo), KIRP: *kidney renal papillary cell carcinoma* (carcinoma papilar de células renales), STES: *stomach and esophageal carcinoma* (carcinoma esofágico y de estómago), COAD: *colon adenocarcinoma* (adenocarcinoma de colon), COADREAD: *colorectal adenocarcinoma* (adenocarcinoma colorrectal), READ: *rectum adenocarcinoma* (adenocarcinoma rectal), STAD: *stomach adenocarcinoma* (adenocarcinoma estomacal), UCEC: *uterine corpus endometrial carcinoma* (carcinoma endometrial del cuerpo uterino), BRCA: *breast invasive carcinoma* (carcinoma invasivo de mama), OV: *ovarian serous cystadenocarcinoma* (cistadenocarcinoma seroso de ovario), LAML: *acute myeloid leukemia* (leucemia mieloide aguda).

### 1.1.3. Análisis de la expresión de los ligandos de EGFR

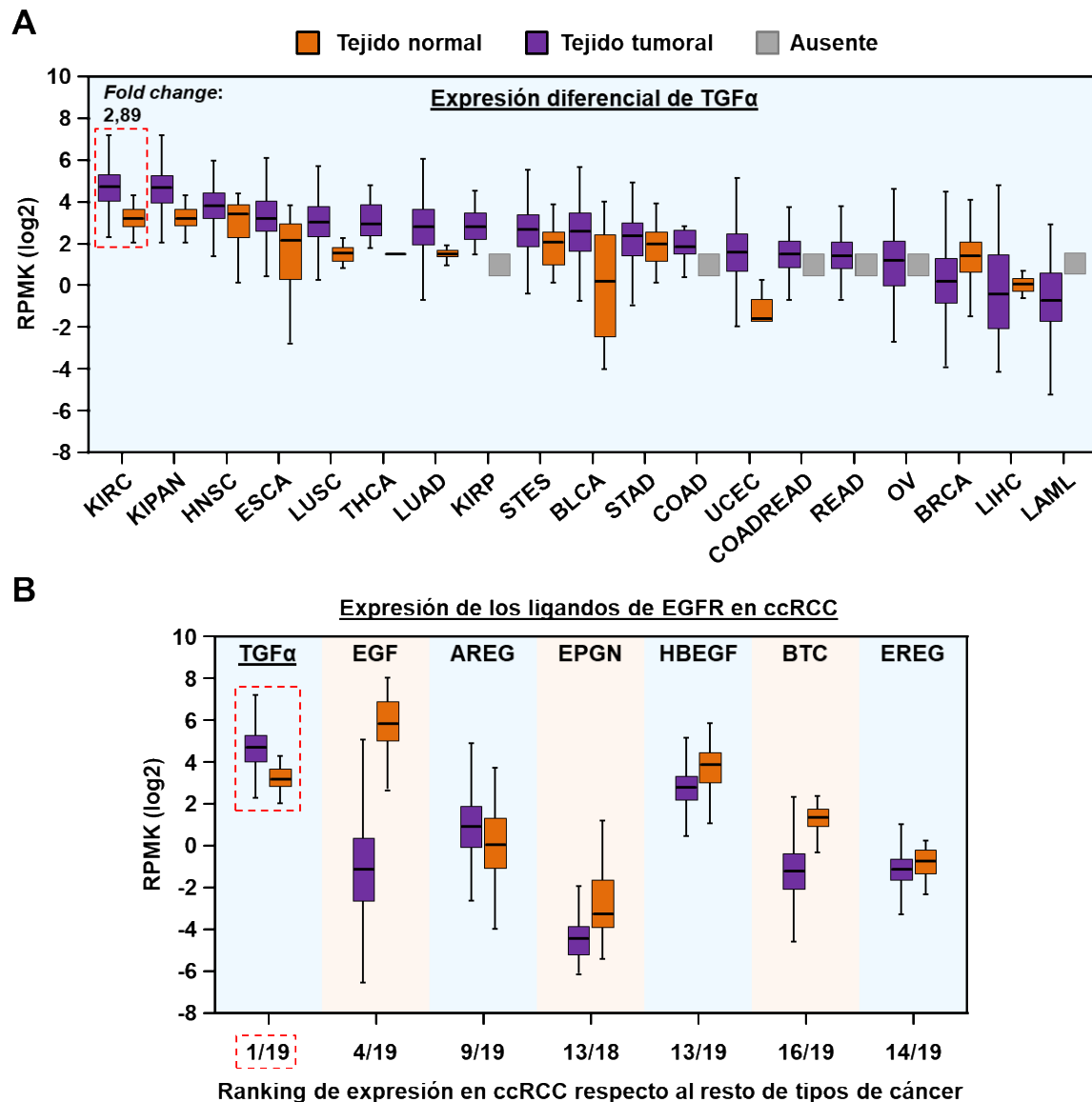
EGFR puede activarse por sobreexpresión del receptor (frecuente en cáncer), así como por mecanismos dependientes o independientes de ligando (Scaltriti y Baselga 2006). Existen 7 ligandos capaces de unirse y activar a EGFR. Toda esta familia de factores de crecimiento tiene como particularidad que inducen la señalización transmembrana tanto en su forma soluble como en su forma anclada a membrana (Singh y Harris 2005). Como proteínas de membrana pueden unirse a receptores en la superficie de otras células, apoyar la adhesión y estimulación célula-célula, y dar lugar, mediante procesamiento, a factores de crecimiento solubles (Massague y Pandiella 1993). Además, ser proteínas de membrana los convierte en potenciales dianas terapéuticas para ADCs. Por todo ello, se estudió el nivel de expresión génica de los distintos ligandos de EGFR a partir del mRNA de las muestras de pacientes con ccRCC, mediante qRT-PCR. De todos los ligandos, TGF $\alpha$  fue el que presentó una expresión mayor, tanto en tejido sano como en tejido tumoral (Figura 52). Los niveles de TGF $\alpha$  fueron significativamente superiores a los del resto de ligandos en ambos tipos de tejido, con la única excepción de EGF en tejido normal (Figura 52).



**Figura 52. Expresión de los ligandos de EGFR en muestras de tejido sano y tejido tumoral de pacientes con ccRCC.** La expresión génica se expresa como  $2^{-\Delta Ct}$  (en unidades arbitrarias) para cada gen de interés, normalizada respecto a la expresión de PP1A (proteín phosphatase 1A, proteína fosfatasa 1A). Los datos se representan como diagramas de caja (mediana y rango intercuartílico) para el total de muestras de tejido sano (n=21) y de tejido tumoral (n=23). En la tabla se muestra el análisis estadístico del nivel de expresión de TGF $\alpha$  respecto al resto de ligandos en muestras de tejido sano y tumoral. El p valor se calculó mediante el test U de Mann-Whitney.

#### **1.1.4. Estudio in silico de la expresión de TGF $\alpha$ en muestras de pacientes**

Para corroborar si estas diferencias tan notables entre TGF $\alpha$  y el resto de ligandos detectadas en las muestras de pacientes con ccRCC se reproducían en cohortes más grandes de pacientes, así como para determinar si estas diferencias eran específicas del ccRCC o se daban en otros tipos de cáncer, se recurrió de nuevo a la base de datos *FireBrowse*. Los datos de expresión diferencial de TGF $\alpha$  obtenidos *in silico* confirmaron que, de todos los ligandos, TGF $\alpha$  era el que tenía una mayor expresión en carcinoma renal de células claras. También se reprodujeron los datos de alta expresión de EGF en tejido normal (Figura 53A y B). Por otro lado, y como dato más relevante, de todos los tipos de cáncer recogidos en la base de datos, el ccRCC fue el que presentó mayor expresión de TGF $\alpha$ . Además, en línea con lo que ocurría para EGFR, la expresión fue 2,89 veces superior en tejido tumoral que en tejido sano (Figura 53A).



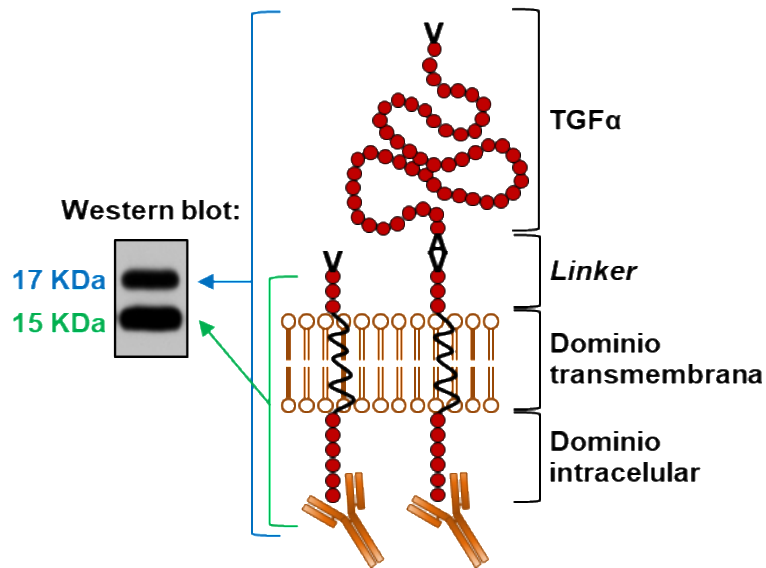
**Figura 53. Análisis de la expresión de TGF $\alpha$ , en relación con otros ligandos de EGFR, en distintos tipos de cáncer. (A)** Expresión diferencial de TGF $\alpha$  en 19 tipos de cáncer distintos, tanto en tejido normal como en tejido tumoral. Los datos se representan igual que en el caso de la figura 51 para EGFR. **(B)** Expresión de todos los ligandos de EGFR en ccRCC, tanto en tejido normal como en tejido tumoral. Para cada uno de los ligandos, se muestra la posición o *ranking* de expresión en ccRCC en relación con los 19 tipos de cáncer analizados.



### 1.1.5. Análisis de los niveles proteicos de TGF $\alpha$

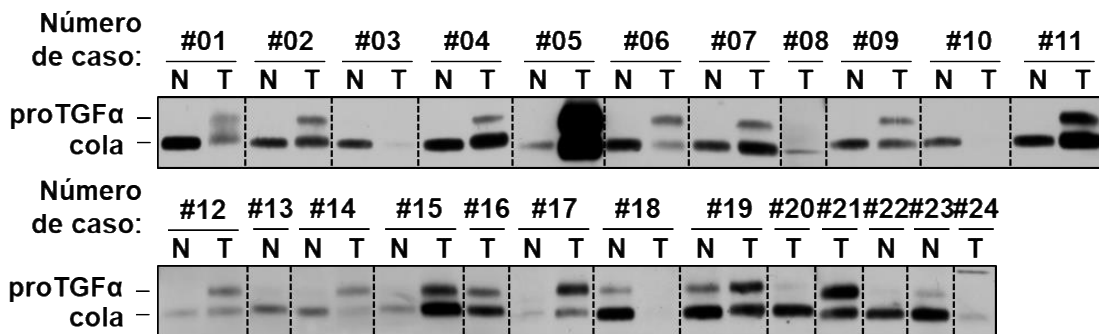
Tanto los estudios de expresión génica por qRT-PCR en muestras de pacientes como los estudios *in silico* destacaron TGF $\alpha$  no solo como el ligando de EGFR que presentaba una mayor expresión en ccRCC, sino como un gen que podría tener un papel relevante en dicha patología. Por todo ello, se quiso analizar los niveles proteicos del ligando en las muestras tumorales, dado que, en el caso de que pudiera resultar una diana terapéutica interesante, las terapias dirigidas irían contra la proteína presente en la superficie de las células cancerígenas.

Hay que mencionar que TGF $\alpha$  puede detectarse en diversas formas, dado que se trata de una proteína que sufre procesamiento en la membrana plasmática. TGF $\alpha$  deriva de un precursor transmembrana de 20-22 kDa (proTGF $\alpha$ ), que sufre varias modificaciones postraduccionales, como glicosilación y palmitilación (Pandiella y Massague 1991). Esta forma más grande de la proteína soporta un primer procesamiento a nivel del extremo N-terminal (entre Ala<sup>39</sup> y Val<sup>40</sup>), dando lugar a una forma de proTGF $\alpha$  asociada a la membrana de 17 kDa que contiene la secuencia madura de TGF $\alpha$ . Para liberar la forma soluble del factor de crecimiento, tiene lugar un segundo procesamiento a la altura del péptido que une TGF $\alpha$  al resto de la molécula precursora (entre Ala<sup>89</sup> y Val<sup>90</sup>). Este procesamiento resulta en la generación de un fragmento soluble, de 6 kDa, (TGF $\alpha$  maduro) y un fragmento residual terminal asociado a la membrana celular (cola), de 15 kDa (Pandiella y Massague 1991). En la figura 54 se muestra un esquema de las distintas formas asociadas a membrana de TGF $\alpha$ , así como una imagen representativa de cómo se detectan por WB.



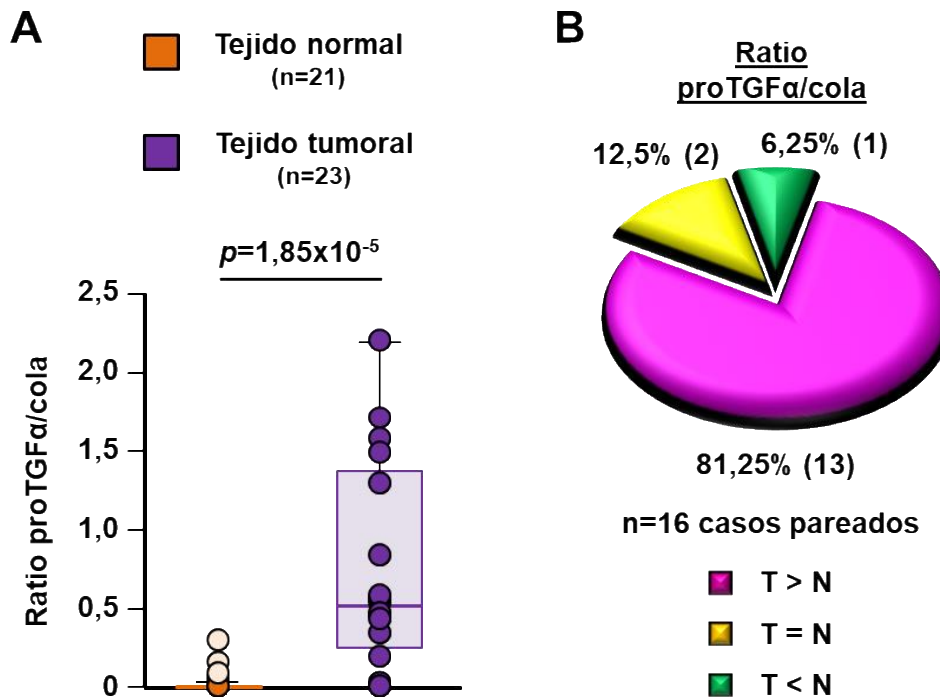
**Figura 54. Esquema ilustrativo de la estructura de TGFα.** Se representan los distintos dominios de la proforma de TGFα (a la derecha), así como el resultado de su procesamiento (a la izquierda). También se muestra la detección de ambas formas (completa y procesada) por WB, mediante anticuerpos dirigidos contra el extremo C-terminal.

Para el análisis de los niveles de TGFα en las muestras tumorales por IP y WB convencional, se utilizó un anticuerpo contra el dominio intracelular de la proteína, que permitía detectar tanto la proforma como la cola. Estos estudios confirmaron que, también a nivel proteico, la expresión de TGFα era muy elevada en pacientes con ccRCC (Figura 55).



**Figura 55. Expresión a nivel proteico de TGFα en muestras de tejido sano y tejido tumoral de pacientes con ccRCC.** Nivel de la proforma de TGFα (proTGFα) y de la forma procesada (cola) en todas las muestras de pacientes con ccRCC, analizados por IP y WB convencional. Se inmunoprecipitaron 2 mg de extracto proteico con un anticuerpo contra el dominio intracelular de TGFα y se utilizó el mismo anticuerpo para su detección por WB. N: tejido normal, T: tejido tumoral.

El resultado de los WB de TGF $\alpha$  en pacientes resultó muy llamativo. Parecía que en la mayoría de los casos, el tejido normal presentaba únicamente la forma procesada de TGF $\alpha$  (cola), de 15 kDa, mientras que en las muestras de tejido tumoral se detectaban las dos formas, proTGF $\alpha$ , de 17 kDa, y la cola. Para tener un dato más preciso, se cuantificaron los WB y se analizó el ratio entre la forma completa y la forma procesada, que ha perdido el factor de crecimiento. Al comparar todos los casos de muestras de tejido normal y tumoral, se observó que el ratio proTGF $\alpha$ /cola era significativamente muy superior en el caso de las muestras de tumor (Figura 56A). Como parte de este análisis, se aislaron los casos pareados, es decir, aquellos casos en los que había disponible tejido sano y tumoral procedente del mismo paciente, y se evaluó el ratio proTGF $\alpha$ /cola. Este dato resultaría muy relevante dado que sería más indicativo de que existe una característica diferencial entre el tumor y el tejido sano circundante y, por tanto, se podría dirigir una terapia específicamente contra las células cancerígenas. De manera importante, el 81,25% de los casos presentaron un ratio superior en el tejido tumoral respecto al normal (Figura 56B), lo que significa que los niveles de la forma más grande de TGF $\alpha$ , con capacidad de estimulación, ya sea anclada a membrana o liberando el factor soluble, eran mayores en las células tumorales. En general, las muestras de tejido sano carecían de la forma madura de TGF $\alpha$  y, como consecuencia, no tendrían capacidad estimuladora.



**Figura 56. Relación entre las formas completa y procesada de TGF $\alpha$  en muestras de tejido sano y tejido tumoral de pacientes con ccRCC. (A)** Ratio entre proTGF $\alpha$  y el fragmento de la cola, calculado como la intensidad media de píxeles de la banda superior (de 17 kDa) respecto a la banda inferior (de 15 kDa) de los WB mostrados en la figura 55. Los datos se representan como diagramas de caja (mediana y rango intercuartílico) para el total de muestras de tejido sano (n=21) y de tejido tumoral (n=23). El  $p$  valor se calculó mediante el test U de Mann-Whitney. **(B)** Diagrama de sectores que representa el porcentaje de casos pareados (tejido sano y tumoral procedente del mismo paciente) en los que el tejido tumoral tiene mayor ratio proTGF $\alpha$ /cola que el tejido normal (en rosa), en los que el tejido tumoral y el normal tienen el mismo ratio (en amarillo), y en los que el tejido tumoral tiene menor ratio que el tejido normal (en verde).

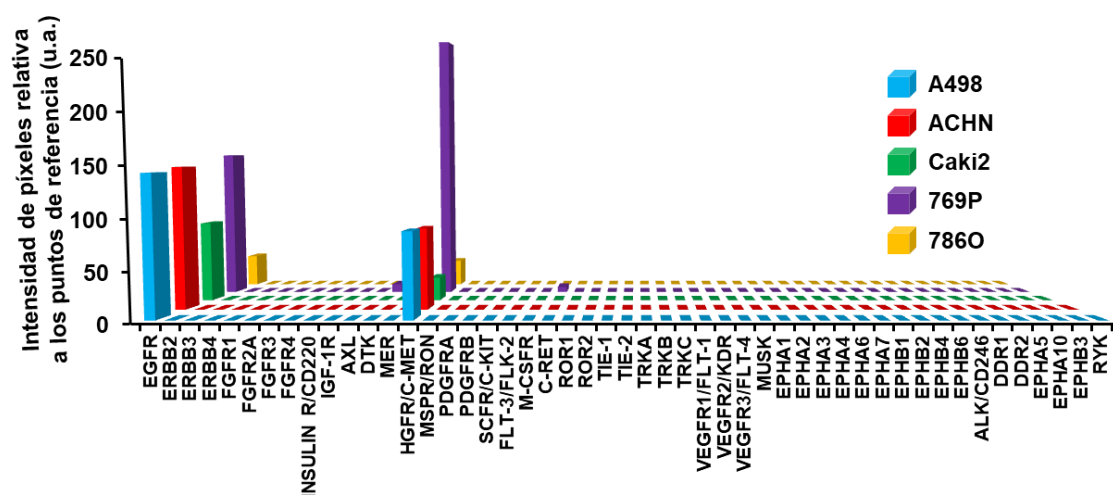
En conjunto, todos los datos procedentes de pacientes revelaron que EGFR y, más concretamente, su ligando TGF $\alpha$  podrían ser dianas terapéuticas relevantes en carcinoma renal de células claras.

## 1.2. Búsqueda de dianas terapéuticas en modelos celulares de ccRCC

Una vez identificados EGFR y TGF $\alpha$  como potenciales dianas terapéuticas en pacientes con ccRCC, se quiso comprobar si el mismo análisis en modelos celulares de esta patología conducía a un resultado semejante.

### 1.2.1. Análisis del perfil de receptores tirosina quinasa activos

Para evaluar el estado de activación de varios RTKs en líneas celulares de ccRCC, se utilizaron los *arrays* comerciales *Proteome Profiler Human Phospho-RTKs*. Al igual que ocurría en las muestras de pacientes, el análisis de los datos obtenidos tras hibridar los extractos proteicos de las líneas celulares con los *arrays* reveló que EGFR se encontraba activo en todas ellas (Figura 57). Hay que mencionar que, en este caso, no fue el único fosfo-RTK detectado. Las cinco líneas celulares estudiadas también presentaron activación de c-Met, cuya expresión en estos modelos celulares ya se ha descrito previamente (Harshman y Choueiri 2013).

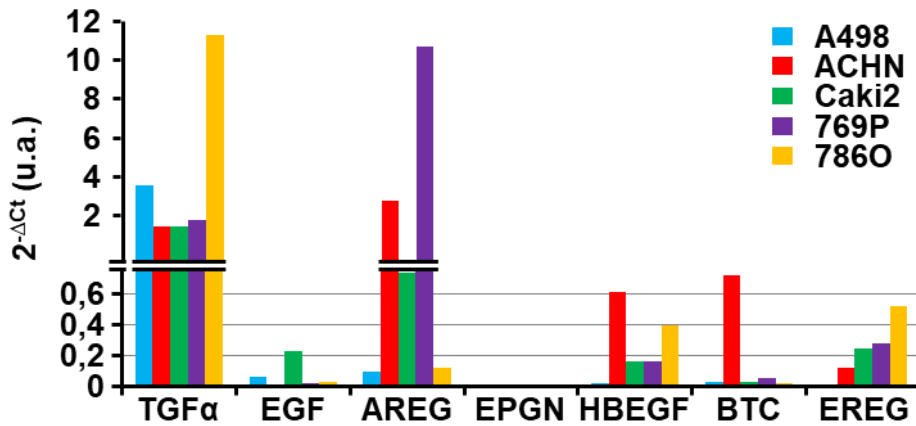


**Figura 57. Perfil de receptores tirosina quinasa activos en líneas celulares de ccRCC.** El nivel de fosforilación de los distintos RTKs se calculó como la intensidad media de píxeles de los duplicados de cada anticuerpo relativa a los puntos de referencia, en cada una de las líneas celulares.

### 1.2.2. Análisis de la expresión de los ligandos de EGFR

A continuación, se estudió el nivel de expresión génica de los distintos ligandos de EGFR a partir del mRNA de las líneas celulares de ccRCC, mediante qRT-PCR. De nuevo, TGF $\alpha$  fue el ligando que presentó mayor expresión en todas las líneas estudiadas (Figura 58). Cabe destacar que en las líneas ACHN y 769P la expresión de AREG también fue elevada. Sin embargo, a diferencia de lo que

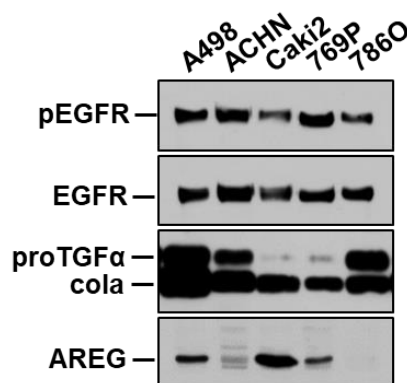
ocurría con TGF $\alpha$ , la expresión de AREG fue muy heterogénea entre las distintas líneas celulares.



**Figura 58. Expresión de los ligandos de EGFR en líneas celulares de ccRCC.** La expresión génica se expresa como  $2^{-\Delta Ct}$  (en unidades arbitrarias) para cada gen de interés, normalizada respecto a la expresión de PP1A (*protein phosphatase 1A*, proteína fosfatasa 1A), en cada una de las líneas celulares.

### 1.2.3. Validación de la expresión de EGFR y sus ligandos a nivel proteico

El análisis de los niveles proteicos por IP y WB convencional confirmó que el receptor de EGF se encontraba presente y activo en todas las líneas de ccRCC (Figura 59). Adicionalmente, también se detectó una alta expresión de TGF $\alpha$  en todas ellas, aunque el ratio entre la proforma y la cola fue más variable. De todas, A498, 7860 y, en menor medida, ACHN presentaron los niveles más altos de proTGF $\alpha$ , mientras que Caki2 y 769P parecían tener mayor procesamiento basal (Figura 59). Por último, algunas de las líneas expresaron AREG, aunque los niveles no correlacionaron con lo observado en la qRT-PCR (Figura 58).



**Figura 59. Niveles de EGFR total y activo, y de dos de sus ligandos en líneas celulares de ccRCC.** Se lisaron las células y se inmunoprecipitaron 2 mg de extracto proteico con los anticuerpos contra cada una de las proteínas indicadas. Para ver activación, se utilizó un anticuerpo anti-fosfo-Tyr.

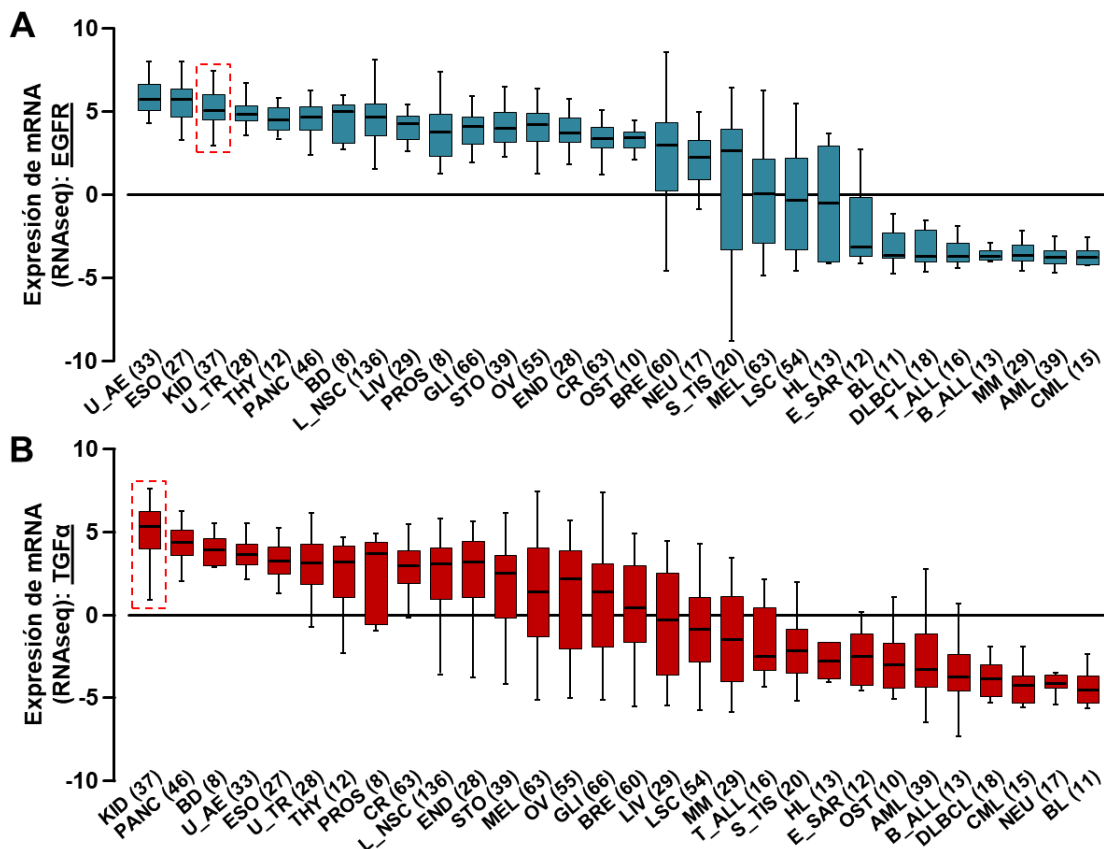
#### 1.2.4. Estudio *in silico* de la expresión de EGFR y TGF $\alpha$ en líneas celulares

En línea con el estudio *in silico* llevado a cabo para muestras de paciente, de nuevo se recurrió a herramientas bioinformáticas con el objetivo de corroborar si la expresión destacada tanto de EGFR como de su ligando TGF $\alpha$  se reproducía en cohortes más grandes de líneas celulares, así como para determinar su expresión en las líneas de carcinomas renales y de otros tipos de cáncer. En este caso se utilizó la base de datos *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE), que proporciona una caracterización genética detallada (número de copias de DNA, expresión de mRNA, mutaciones, etc) de un gran panel de líneas celulares humanas (más de 1000) (Barretina *et al.* 2012, *Cancer Cell Line Encyclopedia and Genomics of Drug Sensitivity in Cancer* 2015).

Los datos de expresión de mRNA de EGFR obtenidos de CCLE demostraron la alta expresión del receptor en líneas celulares de riñón (Figura 60A), siendo el tercer tejido con mayor expresión del receptor, por detrás de tejidos de tracto aerodigestivo superior y de esófago. Por su parte, al igual que pasaba al evaluar la expresión de TGF $\alpha$  en distintos tipos de cáncer con muestras humanas, a nivel de líneas celulares, TGF $\alpha$  se expresaba mayormente en líneas de riñón (Figura 60B).

En conjunto, los datos procedentes de líneas celulares confirmaron los resultados obtenidos en muestras de pacientes, indicando que EGFR y,

especialmente, su ligando TGF $\alpha$  podrían tener un potencial terapéutico en carcinoma renal de células claras.



**Figura 60. Expresión diferencial de EGFR (A) y de TGF $\alpha$  (B) en líneas celulares tumorales de distintos tejidos.** Los datos representan el nivel de expresión del mRNA de los dos genes obtenida a partir de datos de RNA-Seq. Entre paréntesis se indica el número de líneas celulares estudiado para cada tejido. Datos obtenidos de *Cancer Cell Line Encyclopedia*. Recuadrado en rojo se resalta la expresión de EGFR y TGF $\alpha$  correspondiente a líneas celulares tumorales de riñón. U\_AE: *upper aerodigestive* (aerodigestivo superior), ESO: *esophagus* (esófago), KID: *kidney* (riñón), U\_TR: *urinary tract* (tracto urinario), THY: *thyroid* (tiroides), PANC: *pancreas* (páncreas), BD: *bile duct* (conducto biliar), L\_NSC: *lung non small cell carcinoma* (carcinoma de pulmón no microcítico), LIV: *liver* (hígado), PROS: *prostate* (próstata), GLI: *glioma* (glioma), STO: *stomach* (estómago), OV: *ovary* (ovario), END: *endometrium* (endometrio), CR: *colorectal* (colorrectal), OST: *osteosarcoma* (osteosarcoma), BRE: *breast* (mama), NEU: *neuroblastoma* (neuroblastoma), S\_TIS: *soft tissue* (tejidos blandos), MEL: *melanoma* (melanoma), LSC: *lung small cells* (carcinoma de pulmón microcítico), HL: *Hodgkin lymphoma* (linfoma de Hodgkin), E\_SAR: *Ewing sarcoma* (sarcoma de Ewing), BL: *Burkitt lymphoma* (linfoma de Burkitt), DLBCL: *diffuse large B-cell lymphoma* (linfoma de células B difuso), T\_ALL: *T-cell acute lymphoid leukemia* (leucemia linfoide aguda de células T), B\_ALL: *B-cell acute lymphoid leukemia* (leucemia linfoide aguda de células B), MM: *multiple myeloma* (mieloma múltiple), AML: *acute myeloid leukemia* (leucemia mieloide aguda), CML: *chronic myeloid leukemia* (leucemia mieloide crónica).



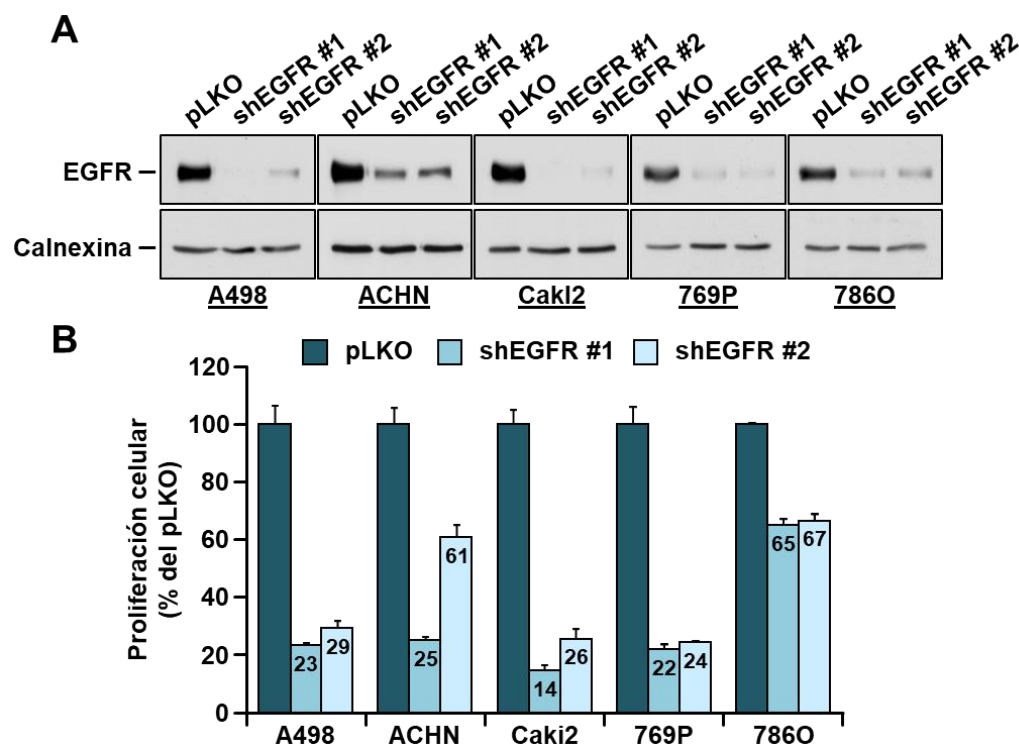
## 2. VALIDACIÓN DE TGF $\alpha$ COMO DIANA TERAPÉUTICA DE ADCs EN ccRCC

Una vez identificados EGFR y TGF $\alpha$  como posibles dianas terapéuticas en ccRCC, se pasó a validar su potencial. Para ello, se usaron modelos celulares de esta patología en los que se estudió, mediante ensayos funcionales, el efecto de inhibir genética o farmacológicamente TGF $\alpha$  y su receptor, de manera similar a lo realizado con HER2 en carcinoma de ovario (Capítulo II).

### 2.1. Efecto antiproliferativo de la inhibición del receptor de TGF $\alpha$

#### 2.1.1. *Inhibición genética de EGFR*

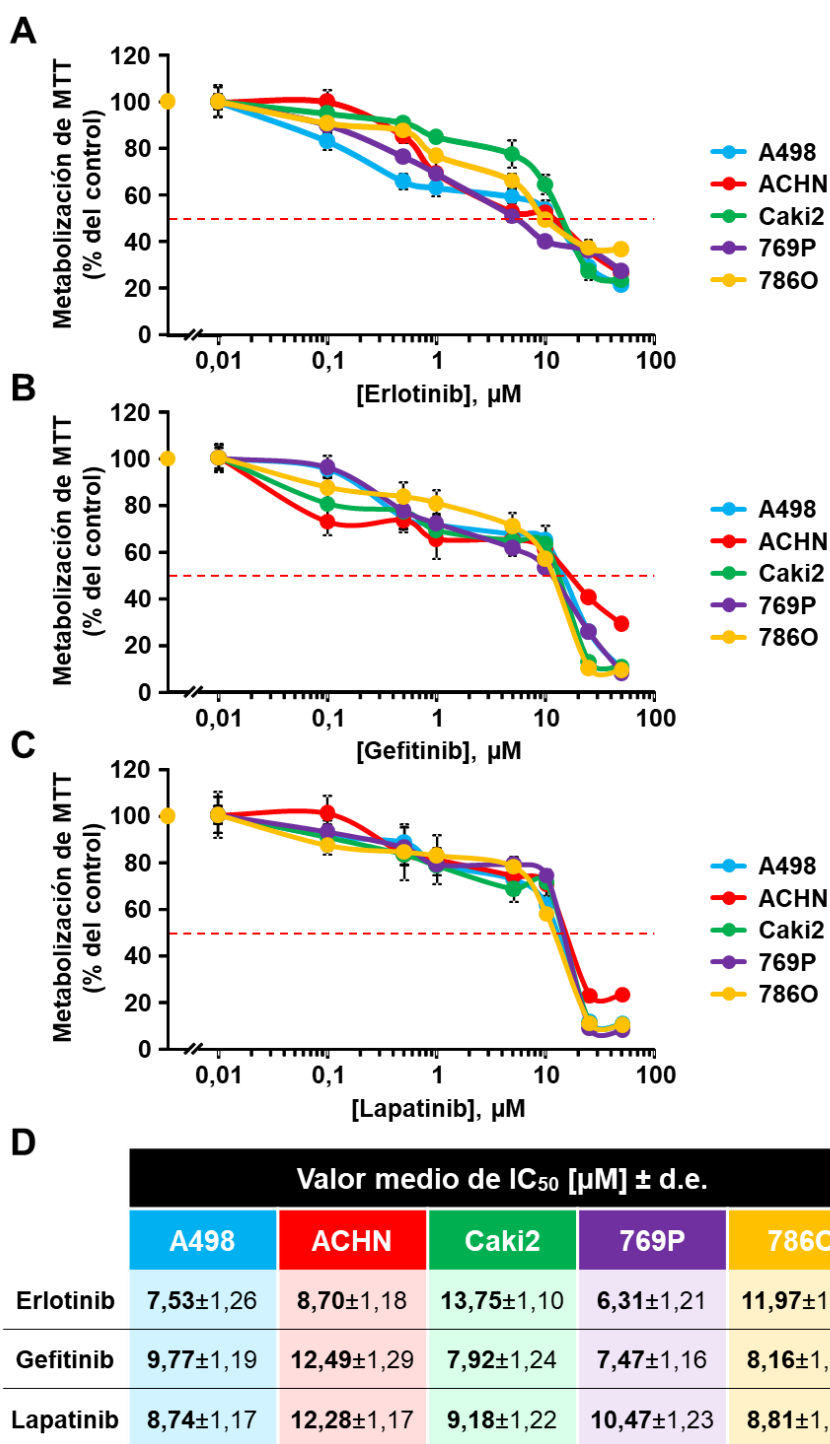
Para explorar la relevancia de EGFR en el control de la proliferación de las líneas celulares de ccRCC, se silenciaron los niveles de la proteína mediante secuencias de shRNA. Se probaron cinco secuencias independientes y las dos que produjeron un mayor nivel de silenciamiento se seleccionaron para llevar a cabo los ensayos funcionales. Como se muestra en la figura 61A, se obtuvo un buen silenciamiento de EGFR en las cinco líneas celulares con los dos shRNA usados. Esta reducción en los niveles de EGFR afectó profundamente la proliferación de las células A498, Caki2 y 769P. Por otro lado, el efecto en proliferación celular fue mucho menor en 786O. Por su parte, las células ACHN, aunque su proliferación se vio reducida, mostraron un comportamiento más heterogéneo (Figura 61B), posiblemente debido a que fue la línea celular en la que el silenciamiento de EGFR resultó menos eficiente.



**Figura 61. Silenciamiento de EGFR en las líneas celulares de ccRCC. (A)** Se analizaron extractos celulares de las diferentes líneas celulares transducidas con shRNAs para EGFR por IP y WB, con un anticuerpo anti-EGFR o anti-calnexina, como control de carga. **(B)** Efecto del silenciamiento de EGFR en la proliferación celular. Una vez comprobado el silenciamiento, se sembraron las células en placas de 6 pocillos y se contaron a los 5 días. Los resultados se representan como el porcentaje de la media  $\pm$  d.e., relativo a las células transducidas con un shRNA no codificante (pLKO);  $n=3$ . Se muestra un experimento representativo que se repitió dos veces.

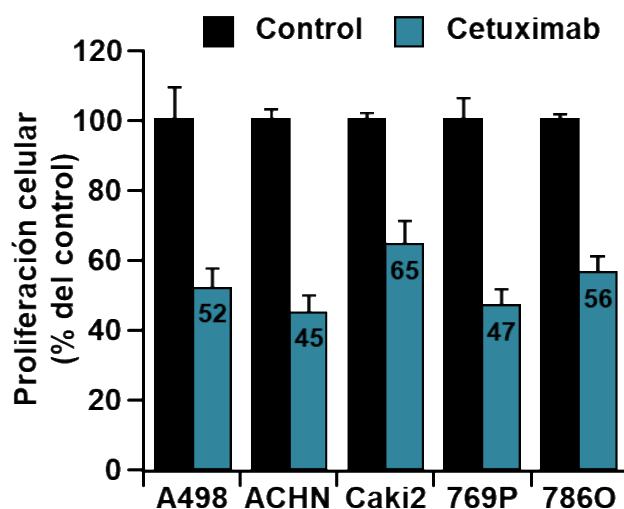
### 2.1.2. Inhibición farmacológica de EGFR

Los efectos antiproliferativos observados en las líneas celulares de riñón tras el bloqueo genético de EGFR sugerían que un bloqueo farmacológico del receptor podría ejercer una acción antitumoral en ccRCC. Por ello, se evaluó el efecto de fármacos aprobados en terapias dirigidas contra EGFR. En primer lugar, se probaron moléculas pequeñas TKIs. Para ello, se llevaron a cabo estudios de dosis-respuesta a erlotinib (Figura 62A), gefitinib (Figura 62B) y lapatinib (Figura 62C) en todas las líneas. Los datos obtenidos mostraron que ninguna de las líneas celulares era especialmente sensible al tratamiento con estos inhibidores. Todas presentaron valores de  $IC_{50}$  del orden micromolar (Figura 62D), lo cual supone una dosis muy elevada tratándose de este tipo de fármacos.



**Figura 62. Efecto de distintos TKIs contra EGFR en la proliferación de líneas celulares de ccRCC.** Se trataron las células con las dosis indicadas de erlotinib (A), gefitinib (B), y lapatinib (C) durante 3 días y se valoró su proliferación mediante ensayos de metabolización de MTT. Los resultados se representan como el porcentaje de la media  $\pm$  d.e., relativo a la condición control (sin fármaco); n=3. Se muestra un experimento representativo que se repitió dos veces. (D) Valores de  $\text{IC}_{50}$  para los distintos fármacos, calculados con el programa Prism 5.

A continuación, se trataron las cinco líneas celulares con cetuximab, un anticuerpo monoclonal contra EGFR usado en clínica para diversos tipos de cáncer (Bonner *et al.* 2006, Van Cutsem *et al.* 2009). A pesar de que el tratamiento con TKIs contra EGFR no resultó eficaz, la adición de cetuximab afectó la proliferación de todas las líneas estudiadas de forma similar (Figura 63). Las líneas celulares más sensibles a cetuximab fueron ACHN y 769P, y la más resistente, Caki2. Este grado de sensibilidad podría tener alguna correlación con el grado de fosforilación basal del receptor (Figura 59).



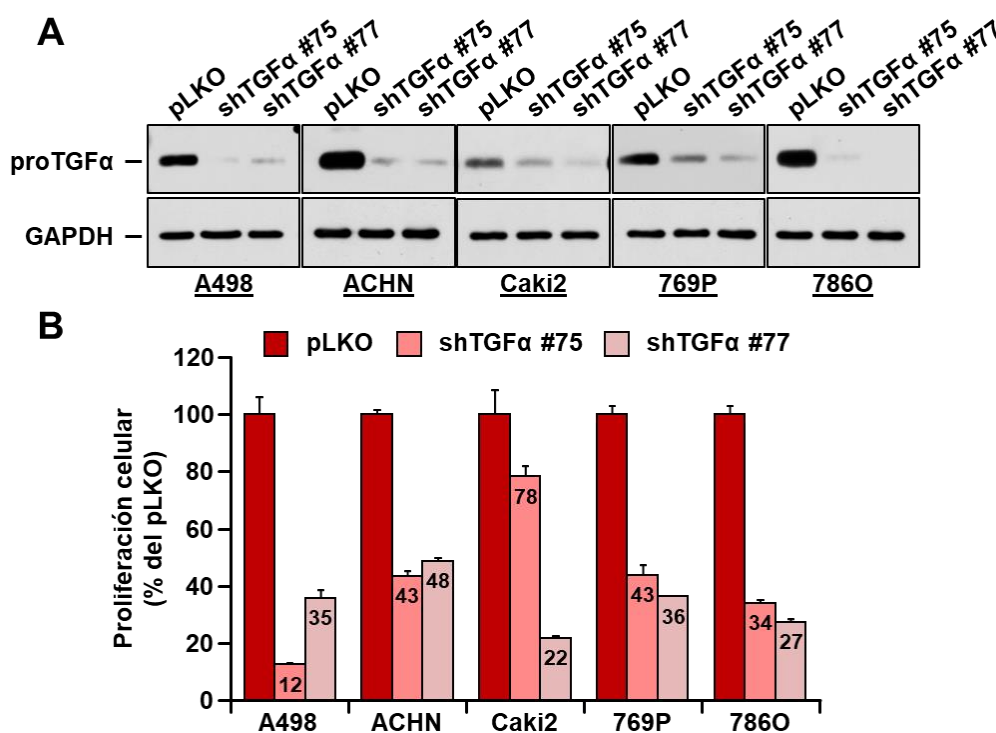
**Figura 63.** Efecto de cetuximab en la proliferación de líneas celulares de ccRCC. Se trataron las células, sembradas en placas de 6 pocillos, con 10 nM cetuximab durante 5 días y se contaron. Los resultados se representan como el porcentaje de la media  $\pm$  d.e., relativo a las células control (sin tratamiento);  $n=3$ . Se muestra un experimento representativo que se repitió dos veces.

## 2.2. Efecto anti-proliferativo de la inhibición de TGF $\alpha$

### 2.2.1. Inhibición genética de TGF $\alpha$

Los datos anteriores mostraron que EGFR tiene relevancia en el control de la proliferación de las líneas celulares de ccRCC, pero su ligando TGF $\alpha$  podría desempeñar un papel incluso más relevante, atendiendo a los datos de expresión observados *in silico* y en muestras de pacientes. Del mismo modo que con el receptor, se silenciaron los niveles de TGF $\alpha$  mediante secuencias de shRNA. De

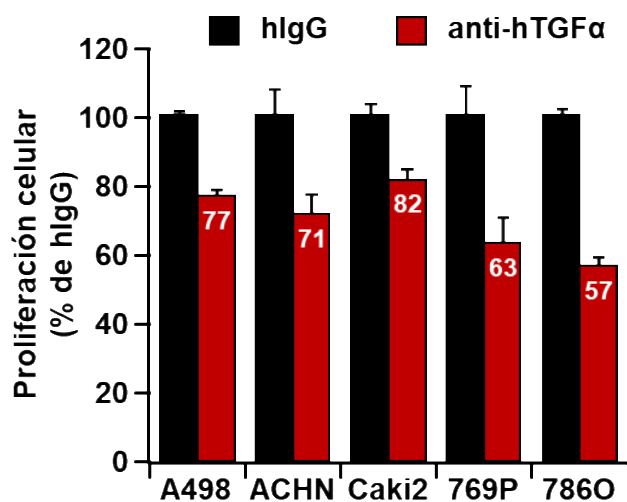
nuevo, se probaron cinco secuencias independientes y las dos que produjeron un mayor nivel de silenciamiento se seleccionaron para llevar a cabo los ensayos funcionales. Como se muestra en la figura 64A, se obtuvo un buen silenciamiento de TGF $\alpha$  en casi todas las líneas con los dos shRNA elegidos. Esta reducción en los niveles de TGF $\alpha$  afectó profundamente la proliferación de las células A498 y 7860, que son las que presentan mayores niveles de proTGF $\alpha$  (Figura 59). Las células ACHN y 769P también se vieron bastante afectadas por el silenciamiento de la proteína. Por su parte, las células Caki2 mostraron un comportamiento más heterogéneo (Figura 64B); la secuencia de shRNA que dio lugar a un silenciamiento más eficiente (shTGF $\alpha$  #77) afectó sustancialmente su proliferación, sin embargo, con la otra secuencia (shTGF $\alpha$  #75), tanto el silenciamiento de la proteína como el efecto en proliferación fueron menores (Figura 64A y B).



**Figura 64. Silenciamiento de TGF $\alpha$  en las líneas celulares de ccRCC. (A)** Se analizaron extractos celulares de las diferentes líneas celulares transducidas con shRNAs para TGF $\alpha$  por IP y WB, con un anticuerpo anti-TGF $\alpha$  (dominio extracelular) o anti-GAPDH, como control de carga. **(B)** Efecto del silenciamiento de TGF $\alpha$  en la proliferación celular. Una vez comprobado el silenciamiento, se sembraron las células en placas de 6 pocillos y se contaron a los 5 días. Los resultados se representan como el porcentaje de la media  $\pm$  d.e., relativo a las células transducidas con un shRNA no codificante (pLKO); n=3. Se muestra un experimento representativo que se repitió dos veces.

### 2.2.2. Inhibición de $TGF\alpha$ con anticuerpos bloqueantes

A diferencia de EGFR, para el cual se dispone de numerosos fármacos aprobados usados en terapias dirigidas, para  $TGF\alpha$  no existe actualmente ningún agente terapéutico aprobado ni en desarrollo clínico. Para utilizar una aproximación similar a la empleada con EGFR y valorar el efecto de la inhibición de la proteína en la proliferación de líneas celulares de ccRCC, se decidió utilizar un anticuerpo policlonal contra la parte extracelular de  $TGF\alpha$ . En este caso, el tratamiento con anti-human $TGF\alpha$  no resultó tan eficaz como el silenciamiento genético, aunque sí afectó moderadamente la proliferación de las líneas celulares, especialmente de 786O y 769P (Figura 65).



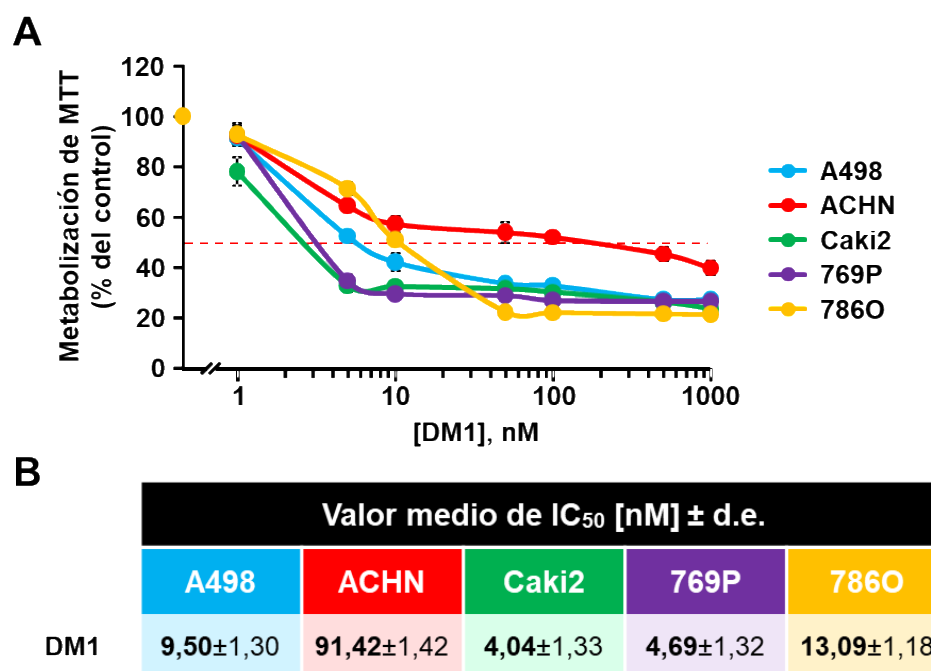
**Figura 65.** Efecto de un anticuerpo bloqueante contra  $TGF\alpha$  en la proliferación de líneas celulares de ccRCC. Se trataron las células, sembradas en placas de 6 pocillos, con 10 nM anti-human $TGF\alpha$  durante 5 días y se contaron. Los resultados se representan como el porcentaje de la media  $\pm$  d.e., relativo a las células control (tratadas con anti-humanIgG); n=3. Se muestra un experimento representativo que se repitió dos veces.

## 2.3. Evaluación de un ADC para bloquear $TGF\alpha$

### 2.3.1. Generación de ADCs con DMI como agente citotóxico

Para llevar a cabo una prueba de concepto de que  $TGF\alpha$  puede ser una buena diana terapéutica contra la que desarrollar un ADC, se decidió conjugar el anticuerpo policlonal contra la parte extracelular de  $TGF\alpha$  a un agente citotóxico y

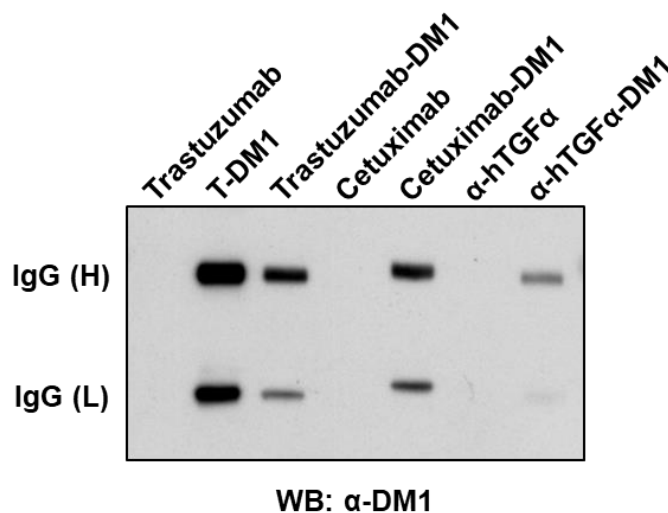
evaluar su efecto en las distintas líneas celulares. Se eligió el *linker*-citotóxico SMCC-DM1 para la conjugación, considerando su extendido uso en ADCs ya aprobados, como T-DM1 (Lewis Phillips *et al.* 2008), así como en desarrollo clínico (Beck *et al.* 2017). Teniendo en cuenta que el carcinoma renal se caracteriza por resistencia a la quimioterapia (Hartmann y Bokemeyer 1999), en primer lugar se evaluó si el fármaco DM1 libre era capaz de inhibir la proliferación de las líneas celulares de ccRCC. Para ello, se llevó a cabo un estudio de dosis-respuesta a DM1 en todas las líneas (Figura 66A). Los datos obtenidos mostraron que todas ellas eran sensibles al tratamiento, presentando valores de IC<sub>50</sub> en torno a 10 nM (Figura 66B). La línea ACHN presentó un valor de IC<sub>50</sub> superior (91 nM), pero que sigue estando en el rango habitual de dosis del fármaco (Lopus *et al.* 2010).



**Figura 66. Efecto de mertansina o DM1 en la proliferación de líneas celulares de ccRCC. (A)** Se trataron las células con las dosis indicadas de fármaco durante 3 días y se valoró su proliferación mediante ensayos de metabolización de MTT. Los resultados se representan como el porcentaje de la media ± d.e., relativo a la condición control (sin fármaco); n=3. Se muestra un experimento representativo que se repitió dos veces. **(B)** Valores de IC<sub>50</sub> para DM1, calculados con el programa *Prism 5*.

De manera adicional al anticuerpo anti-TGF $\alpha$  humano, se conjugaron los anticuerpos monoclonales cetuximab y trastuzumab, tal y como se describe en

“Materiales y Métodos”. Para confirmar que se produjo el acoplamiento y valorar la cantidad de DM1 acoplado a los distintos anticuerpos se llevó a cabo un Western blot cargando cantidades equivalentes de cada molécula y utilizando un anticuerpo producido en el laboratorio contra el fármaco libre, DM1 (Figura 67). Como control negativo se usaron los mismos anticuerpos “desnudos” y como control positivo, T-DM1 comercial, que contiene una media de 3,5 moléculas de DM1 por cada molécula de trastuzumab (Lewis Phillips *et al.* 2008). La figura 67 muestra que la conjugación de SMCC-DM1 se consiguió en todos los casos, aunque con distinta efectividad, en comparación a la conjugación química presente en un ADC comercial. El acoplamiento en el caso de los anticuerpos monoclonales (cetuximab y trastuzumab) fue aproximadamente del 50% respecto al nivel alcanzado en T-DM1. En el caso del anticuerpo policlonal de cabra contra TGF $\alpha$ , la eficacia fue aún menor, en torno a un 15-20%, posiblemente debido a la heterogeneidad del anticuerpo de partida.



**Figura 67. Conjugación del agente citotóxico DM1 a tres anticuerpos distintos: trastuzumab (mAb), pertuzumab (mAb) y anti-TGF $\alpha$  humano (policlonal de cabra).** Tras la conjugación química de los anticuerpos, se cuantificaron los ADCs en el Nanodrop y se cargaron 50 ng en un gel de poliacrilamida al 12%. Se analizó por WB la cantidad de DM1 conjugado en cada una de las cadenas de los anticuerpos. Como control negativo se usaron los anticuerpos desnudos (carriles 1, 4 y 6) y como control positivo, T-DM1 comercial (carril 2). H: cadena pesada de la IgG, L: cadena ligera de la IgG.

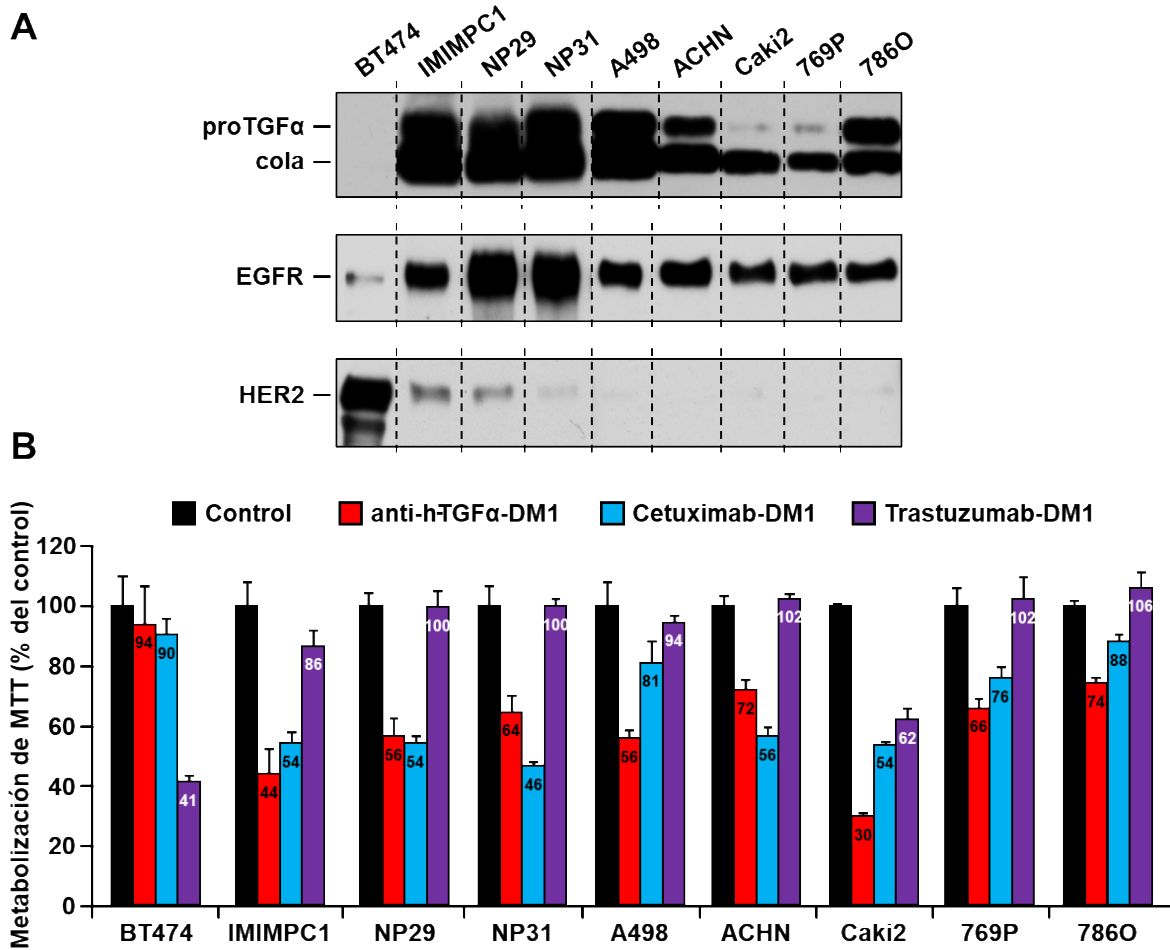


### 2.3.2. Efecto antiproliferativo de los diferentes mAb-DM1 generados

Una vez obtenidos los diferentes ADCs, se analizó su acción antiproliferativa en varias líneas celulares con diferentes niveles de expresión de los antígenos contra los que están dirigidos los mAbs: TGF $\alpha$ , EGFR y HER2, para anti-hTGF $\alpha$ , cetuximab y trastuzumab, respectivamente (Figura 68A). Además de las líneas de ccRCC utilizadas a lo largo de este trabajo, se seleccionó una línea de carcinoma de mama HER2+ (BT474) que expresa niveles elevados de dicha proteína, mientras que carece de TGF $\alpha$  y presenta muy baja expresión de EGFR (Figura 68A). Por otro lado, se eligieron 3 líneas celulares de carcinoma de páncreas (IMIM-PC1, NP-29 y NP-30), caracterizadas por una prominente expresión de TGF $\alpha$ , altos niveles de EGFR y baja expresión de HER2 (Figura 68A).

Para compensar la diferencia en la cantidad de DM1 acoplado a cada anticuerpo se utilizaron dosis distintas: 20 nM para trastuzumab-DM1 y cetuximab-DM1, y 50 nM para anti-hTGF $\alpha$ -DM1. Como cabía esperar, trastuzumab-DM1 redujo considerablemente la proliferación de las células BT474, mientras que apenas tuvo efecto en el resto de líneas celulares (con niveles mucho menores de HER2). De manera similar, cetuximab-DM1, y anti-hTGF $\alpha$ -DM1 apenas redujeron la proliferación de las BT474 (Figura 68B), cuyos niveles de EGFR y TGF $\alpha$  son muy bajos. Esto indicó que ninguno de los 3 ADCs penetraba de manera inespecífica en las células. Cabe destacar que las líneas de carcinoma de páncreas mostraron bastante sensibilidad tanto al ADC dirigido contra EGFR, como al dirigido contra TGF $\alpha$  (Figura 68B), acorde a sus niveles de ambas proteínas, lo cual apoyaría las terapias dirigidas contra la señalización a través de TGF $\alpha$  en patologías que muestran sobreexpresión de la proteína. Por último, en las líneas de ccRCC el tratamiento con anti-hTGF $\alpha$ -DM1 redujo moderadamente la proliferación celular y, en general, resultó más eficaz que el tratamiento con cetuximab-DM1 (Figura 68B). A diferencia de lo observado con otros tratamientos previos, la línea celular de ccRCC más sensible resultó ser la Caki-2. Sin embargo, el efecto antiproliferativo de trastuzumab-DM1 en esta línea, considerando que no expresa HER2, sugiere que

podría estar internalizando los ADCs de manera inespecífica, posiblemente por un proceso de pinocitosis (Kalim *et al.* 2017).



**Figura 68. Efecto de anticuerpos contra EGFR, HER2 y TGFα conjugados a SMCC-DM1 en la proliferación de diversas líneas celulares. (A)** Niveles proteicos de TGFα, EGFR y HER2 en diferentes líneas celulares de carcinoma de mama HER2+ (BT474), de carcinoma de páncreas (IMIMPC1, NP29 y NP31) y de carcinoma de células renales (A498, ACHN, Caki2, 769P y 786O) analizados por IP (2 mg de extracto) y WB, con anticuerpos contra dichas proteínas. Las líneas de puntos indican que los carriles no son contiguos dentro de un mismo gel, si no que se han recortado las bandas correspondientes a las líneas celulares de interés de varios WB procedentes de un panel de 80 líneas celulares analizadas en el laboratorio. Se utilizaron controles positivos para cada uno de los antígenos con el fin de elegir un grado de exposición semejante en todos los WB. **(B)** Se trataron las células con 50 nM de anti-hTGFα-DM1 o 20 nM de cetuximab-DM1 y trastuzumab-DM1 durante 5 días y se valoró su proliferación mediante ensayos de metabolización de MTT. Los resultados se representan como el porcentaje de la media ± d.e., relativo a la condición control (sin fármaco); n=3.

# **DISCUSIÓN**



## I. RESISTENCIA A T-DM1 EN CÁNCER DE MAMA

El tratamiento con T-DM1 en cáncer de mama HER2+ metastásico ha generado muy buenos resultados, mejorando sustancialmente la supervivencia de las pacientes (Verma *et al.* 2012, Amiri-Kordestani *et al.* 2014). Sin embargo, como ocurre frecuentemente en el tratamiento del cáncer, se acaban desarrollando resistencias al fármaco. En el caso de T-DM1, los modelos preclínicos y mecanismos de resistencia descritos son muy escasos; por ello, se decidió iniciar un estudio para identificar la mecánica celular que conduce a la aparición de resistencias. Para satisfacer este objetivo, se desarrollaron y caracterizaron modelos celulares de resistencia en la línea celular de cáncer de mama HER2+ BT474.

Uno de los mecanismos de resistencia a quimioterapia más frecuentes es la eliminación de los fármacos del citoplasma por transportadores ABC. Estas bombas de expulsión también podrían contribuir a la resistencia a ADCs, dado que muchos de los agentes citotóxicos empleados, entre ellos DM1, son sustratos de estos transportadores (Yu *et al.* 2013). De hecho, se ha descrito en varios modelos preclínicos la aparición de resistencias a ADCs, incluyendo T-DM1, como consecuencia de la sobreexpresión de proteínas de esta familia, como PgP/MDR1 (Lambert y Chari 2014). Para estudiar esta posibilidad, se evaluaron los niveles de mRNA de todos los miembros de la familia en los clones resistentes pero no se detectó sobreexpresión de ninguno de ellos. Del mismo modo que el transporte excesivo del citotóxico desde el citoplasma hacia el medio extracelular impediría una acción antiproliferativa eficaz, un transporte defectuoso desde el lisosoma hacia el citoplasma acarrearía las mismas consecuencias. Por ello, también se evaluó la expresión de SLC46A3, una proteína de la membrana lisosomal encargada de transportar los catabolitos resultantes de la degradación de ADCs como T-DM1 (Hamblett *et al.* 2015). Sin embargo, tampoco se detectaron diferencias en su expresión. Por último, aunque los dos procesos anteriores se encontrasen intactos y los niveles de DM1 citoplasmático fuesen los adecuados,

alteraciones moleculares en tubulina  $\beta$  podrían dificultar la unión del citotóxico, impidiendo la inhibición de la polimerización de microtúbulos. La secuenciación de tubulina  $\beta$ , el análisis de husos mitóticos, así como los experimentos con DM1 libre y otros agentes antimicrotúbulos demostraron que la funcionalidad de tubulina  $\beta$  estaba intacta en los clones resistentes.

Una vez descartadas las alteraciones en procesos relacionados con la tubulina  $\beta$ , se decidió evaluar sistemáticamente la ruta seguida por T-DM1 para ejercer su acción antitumoral. Se estudió la unión con el antígeno de superficie HER2, la subsecuente internalización y tráfico intracelular hasta alcanzar los lisosomas, la degradación proteolítica del anticuerpo, así como la diana molecular intracelular, dado que una alteración en cualquiera de los pasos anteriormente citados podría conferir resistencia al ADC (Barok *et al.* 2014).

El primer proceso que lleva a cabo T-DM1 para ejercer su efecto antitumoral es la unión a HER2. En este sentido, se pueden evaluar dos aspectos diferentes. Por un lado, el receptor actúa como punto de anclaje del ADC, por lo que una disminución de los niveles de la proteína, así como una perturbación en la unión antígeno-anticuerpo, debida a alteraciones moleculares, truncación o enmascaramiento de HER2, podría conducir a resistencia. De hecho, todas estas anomalías en HER2 han sido descritas como mecanismos de resistencia a trastuzumab (Nagy *et al.* 2005, Scaltriti *et al.* 2007) y, por lo tanto, podrían ser compartidas por un ADC que consta de ese mismo anticuerpo como uno de sus componentes. De hecho, se han generado modelos preclínicos en los que la adquisición de resistencia a T-DM1 se debía a una pérdida de HER2 (Loganzo *et al.* 2015). Los experimentos enfocados a elucidar esta posibilidad no demostraron cambios en los niveles de HER2, ni totales ni en la superficie celular, en ninguno de los tres clones resistentes. Además, corroboraron que la unión de T-DM1 al antígeno se preservaba en todos ellos. Aparte de ser la diana a la que se une T-DM1, HER2 es un oncogén que al estar sobreexpresado en las células de cáncer de mama las mantiene en un estado proliferativo elevado. De hecho, la pérdida de la

dependencia oncogénica o la sobreactivación de rutas de señalización “aguas abajo” del receptor en células cancerígenas se han ligado a resistencia a trastuzumab (Nagata *et al.* 2004, Eichhorn *et al.* 2008). Los experimentos de silenciamiento génico de HER2 mostraron que los clones resistentes a T-DM1 mantenían la dependencia oncogénica del receptor, excluyendo así la posibilidad de que la resistencia fuera debida a una pérdida de la funcionalidad de la proteína. Finalmente, el estudio del estado de activación de varias cascadas de señalización iniciadas por HER2 no reveló ninguna alteración significativa o sobreactivación que pudiera justificar la pérdida de función. Este primer punto de evaluación indicó, por tanto, que la resistencia a T-DM1 en los clones no estaba debida a alteraciones en el antígeno, ya fuesen cambios en los niveles, en la molécula o en la señalización dependiente de HER2.

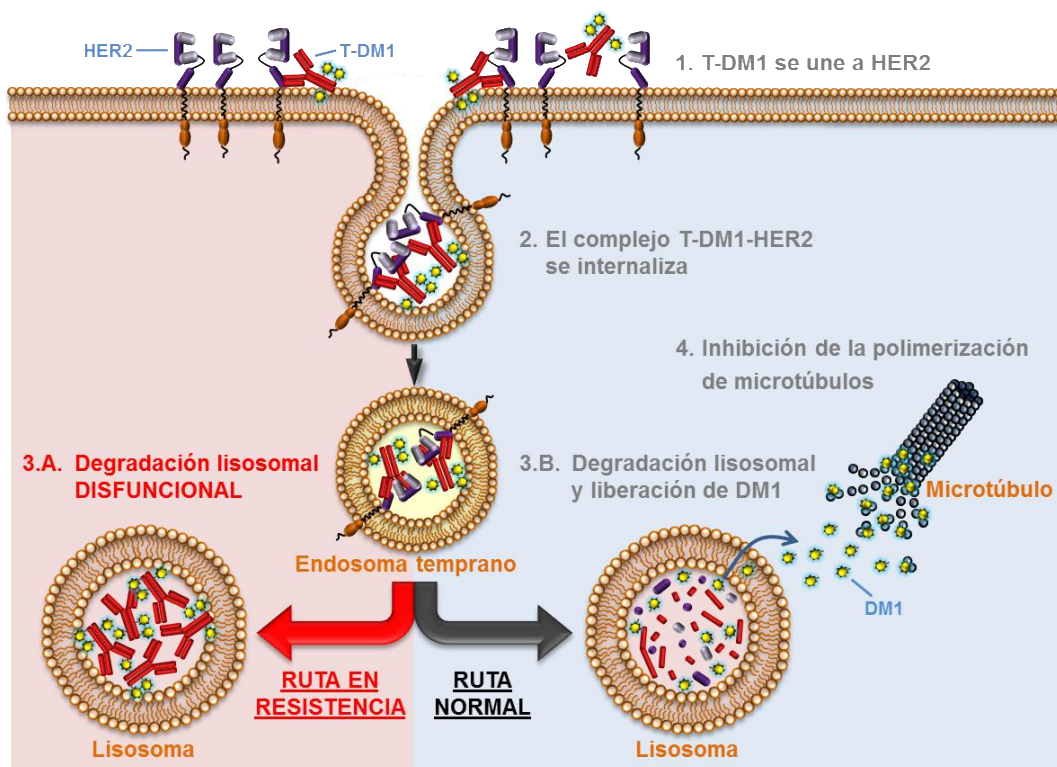
Una vez que un ADC, como T-DM1, se une a su molécula diana en la superficie celular, tiene que ser internalizado, dado que es en el interior de la célula donde sufrirá el procesamiento que dará lugar a la liberación del citotóxico. Se trata por tanto de un paso crucial que depende de varios factores, entre otros, del propio antígeno. Hay proteínas de membrana que se internalizan de manera muy eficiente y otras, como HER2, que tienen una tasa de internalización muy lenta (Sorkin y Goh 2008), lo que podría favorecer la aparición de resistencias. De hecho, dentro de las nuevas estrategias empleadas en el desarrollo de ADCs, se han generado anticuerpos biperatópicos contra dos epítomos distintos de HER2, que favorecen la agregación de receptores, promoviendo así su internalización y degradación (Li *et al.* 2016). Por otro lado, una internalización diferente a la canónica, por ejemplo a través de vesículas de caveolina, podría alejar los complejos T-DM1-HER2 de la ruta hacia lisosomas, impidiendo en última instancia su acción antitumoral. Un mecanismo de resistencia a T-DM1 descrito recientemente se basa, precisamente, en la internalización a través de vesículas de caveolina (Sung *et al.* 2017). Los análisis bioinformáticos realizados a partir de los datos de expresión génica de los clones resistentes apuntaron a las rutas endocítica y lisosomal como componentes celulares que podrían estar alterados con respecto a la línea parental, por lo que se

llevaron a cabo varios experimentos para caracterizar estos procesos. Los ensayos de internalización con T-DM1 unido a biotina procesable mostraron que la tasa de internalización era similar en todas las líneas celulares. Además, el seguimiento *in vivo* de T-DM1 marcado con fluorocromos no reveló ningún defecto en las primeras etapas de la internalización, lo que sugería que este proceso se mantenía en los clones resistentes a niveles similares a los de la línea parental. Sin embargo, los experimentos en células vivas y los estudios por inmunofluorescencia a tiempos más largos sí que mostraron diferencias en la distribución subcelular de T-DM1. Se observó que T-DM1 se acumulaba en compartimentos intracelulares en las células C#1 y C#3, pero no en C#6. Esta acumulación tan llamativa se observó también *in vivo*, especialmente en los tumores derivados de ratones inyectados con las células del clon C#1. Los estudios realizados para identificar la localización intracelular donde T-DM1 quedaba atrapado en los dos clones resistentes mostraron una fuerte colocalización con (i) el marcador de vesículas ácidas *LysoTracker*, (ii) anticuerpos contra LAMP1 y (iii) proteínas de fusión GFP-LAMP1, todos ellos considerados marcadores lisosomales.

Cuando el ADC llega a los lisosomas sufre un procesamiento proteolítico que conduce a la liberación del agente citotóxico. En el caso de T-DM1, donde DM1 se encuentra unido a trastuzumab a través de un *linker* no procesable, la parte del anticuerpo tiene que degradarse por completo para que el derivado de mantansina quede libre. Un defecto en este proceso comprometería la acción antitumoral de T-DM1. Por ello, se evaluó tanto el pH lisosomal como la actividad proteasa observándose que ambos procesos se encontraban alterados en las células C#1 y C#3 con respecto a la línea parental o al clon C#6. El pH lisosomal estaba incrementado en dichos clones, lo cual podría restringir la actividad proteínica intrínseca de las enzimas lisosomales, impidiendo de este modo el procesamiento de T-DM1 endocitado. Se corroboró además que esta disfunción lisosomal no era consecuencia de algún defecto en el proceso de autofagia. Por otro lado, la manipulación artificial del pH lisosomal, mediante inhibidores de la V-ATPasa, revirtió parcialmente los efectos antiproliferativos de T-DM1 en la línea



sensible, confirmando de este modo la relevancia de esta alteración en la adquisición de la resistencia. De manera importante, cabe destacar que este desequilibrio en la función lisosomal que conducía a la ineficacia de T-DM1 se detectó también en un tumor derivado de un paciente HER2+ que se mantuvo como PDX. Este hecho no solo traslada los descubrimientos a un ámbito más clínico, sino que también confirma que este mecanismo de resistencia no es exclusivo del modelo celular derivado de BT474.



**Figura 69. Representación esquemática del modelo de resistencia a T-DM1 propuesto.** T-DM1 se une a HER2 en la membrana plasmática, lo que impulsa la entrada de los complejos HER2-T-DM1 al interior celular por un proceso de endocitosis mediada por receptor. Los complejos internalizados quedan contenidos inicialmente en vesículas endocíticas que se fusionan dando lugar a endosomas tempranos. La carga de estos endosomas puede ser reciclada de nuevo a la membrana plasmática o progresar en la ruta endocítica, hasta fusionarse con los lisosomas. En la ruta convencional que acontece en células sensibles a T-DM1, las proteasas lisosomales ácidas degradan el anticuerpo del ADC, liberando el citotóxico, unido al *linker* y a un residuo de lisina. El Lys-MCC-DM1 intracelular inhibe la polimerización de los microtúbulos, induciendo parada del ciclo celular en mitosis, apoptosis, catástrofe mitótica y disrupción del tráfico intracelular. En la ruta alterada, presente en las células resistentes a T-DM1, el pH lisosomal alterado restringiría la actividad de las enzimas lisosomales, dificultando el procesamiento proteolítico de T-DM1 endocitado. El ADC quedaría así retenido en el interior de los lisosomas y el agente citotóxico no podría alcanzar su diana molecular en el citoplasma.

Los estudios llevados a cabo en esta parte del trabajo permiten extraer varias conclusiones importantes. Por un lado, los modelos de resistencia basados en líneas celulares de cáncer de mama HER2+ son capaces de adaptarse y sobrevivir a la acción de T-DM1 mediante varios mecanismos de resistencia, uno de los cuales está ligado a una actividad lisosomal deficiente. Esta alteración en la función lisosomal impediría el correcto procesamiento de T-DM1, limitando así su acción antitumoral. Existen varios datos experimentales que apoyan la existencia de diversos mecanismos de resistencia a T-DM1, que incluyen (i) los análisis de expresión génica, que indicaron diferencias en los genes expresados diferencialmente entre los distintos clones con respecto a la línea parental; (ii) los estudios *in vivo*, que mostraron la variedad en las cinéticas de crecimiento y respuesta a T-DM1 de los tumores de los animales inyectados con las diversas líneas celulares; y (iii) los datos biológicos, que revelaron la acumulación lisosomal de T-DM1 y la alteración de la función proteolítica en dos de los tres clones resistentes. Estas diferencias interclonales demuestran, al igual que ocurre para otras terapias anti-HER2 (Gagliato *et al.* 2016), que la resistencia al tratamiento se adquiere por diversos mecanismos, lo cual, aunque esperable, no deja de ser desafortunado desde un punto de vista clínico. Esta heterogeneidad apoya la importancia de entender y desentrañar todos los mecanismos que llevan a las células cancerígenas a dejar de responder al tratamiento a la hora de diseñar estrategias efectivas para combatir la resistencia a T-DM1.

Por otro lado, la descripción de esta alteración lisosomal podría tener importantes implicaciones generales, más allá de su mera identificación como mecanismo de resistencia a T-DM1. Los ADCs son un tipo de terapia en expansión que está demostrando ser muy eficaz, con 4 fármacos aprobados para su uso en clínica y más de 60 en ensayos clínicos (Beck *et al.* 2017). Dentro de este tipo de moléculas compuestas, existen varios ADCs que precisan de una correcta función lisosomal para ser procesados adecuadamente, liberando el agente citotóxico: (i) los ADCs que contienen *linkers* no procesables (por ejemplo, T-DM1 (Amiri-Kordestani *et al.* 2014)) requieren que la parte del anticuerpo sea completamente

degradada por las proteasas lisosomales para que el citotóxico, unido al *linker* y a un residuo de un aminoácido del anticuerpo, se transporte desde el lumen lisosomal al citoplasma; (ii) los ADCs con *linkers* procesables sensibles a enzimas lisosomales (por ejemplo, brentuximab vedotina (Senter y Sievers 2012)) necesitan de proteasas lisosomales para romper el enlace que mantiene unido el agente citotóxico a la parte del anticuerpo; y (iii) los ADCs con *linkers* procesables sensibles a pH (por ejemplo, gemtuzumab ozogamicina (Appelbaum y Bernstein 2017) o inotuzumab ozogamicina (Kantarjian *et al.* 2016)) tienen que alcanzar un pH ácido para que el citotóxico se suelte del anticuerpo. Todos estos fármacos, usados actualmente en varios tipos de cáncer, podrían dar lugar a la aparición de resistencias por medio de un proceso como el descrito en este trabajo. La posibilidad de que alteraciones en la función lisosomal causen resistencias a ADCs en pacientes se puede apoyar en un precedente clínico, como son las enfermedades de almacenamiento lisosómico o de depósito lisosomal, una clase de desórdenes metabólicos provocados por alteraciones en proteínas críticas para la función lisosomal. El mal funcionamiento de estas proteínas provoca la acumulación de moléculas no digeridas (Schultz *et al.* 2011). Por último, estos hallazgos sugieren la posibilidad de manipular el pH lisosomal para potenciar o restaurar las propiedades antitumorales de T-DM1 y otros ADCs. Actualmente ya existe tecnología enfocada a ese objetivo, como el uso de nanopartículas fotoactivables capaces de incrementar el pH intralisosomal (Trudeau *et al.* 2016). Este tipo de estrategias podría mejorar las terapias basadas en ADCs.

## II. POTENCIAL TERAPÉUTICO DE T-DM1 EN CÁNCER DE OVARIO HER2+

El carcinoma de ovario es la causa más común de muerte por cáncer ginecológico en las mujeres (Yap *et al.* 2009). Debido a la ausencia de síntomas clínicos evidentes y a la falta de pruebas adecuadas, la mayoría de las pacientes se diagnostican en estadios avanzados de la enfermedad, lo cual se asocia con una alta mortalidad y morbilidad. Actualmente, el tratamiento del cáncer de ovario se basa

en cirugía y quimioterapia, lo cual conduce a un porcentaje de curación bastante bajo (Banerjee y Kaye 2013). Además, la tasa de supervivencia a los 5 años no ha mejorado en los últimos años. Este pronóstico tan desalentador resalta la necesidad de identificar nuevas opciones de tratamiento, más efectivas, para pacientes con cáncer de ovario avanzado o recurrente. En este ámbito, la identificación de nuevas dianas terapéuticas susceptibles de ser atacadas farmacológicamente resulta crucial. Considerando la relevancia de las tirosina quinasas en la iniciación y progresión del cáncer, así como los beneficios que han tenido en otras enfermedades oncológicas las terapias dirigidas contra estas proteínas (Ocana *et al.* 2013), se decidió evaluar el estado de activación de varias tirosina quinasas en muestras tumorales extraídas quirúrgicamente de pacientes con cáncer de ovario.

Los análisis con *arrays* de anticuerpos en las muestras de tumores de ovario indicaron que una gran proporción de los mismos expresaba formas activas de los receptores de la familia ERBB, en particular, HER2. La sobreexpresión de HER2 (3+ por inmunohistoquímica) se ha observado en menos de un 10% de los tumores de ovario (Yap *et al.* 2009), aunque se ha descrito expresión baja o moderada del receptor (es decir, 2+ o 1+ por inmunohistoquímica) en un porcentaje considerablemente mayor (50% de los casos) (Tuefferd *et al.* 2007). Los datos obtenidos del análisis de los *arrays* revelaron que el 90% de los tumores tenía fosforilación en residuos de tirosina de HER2, lo que indicaría que el número de tumores en los que HER2 estaba activo podría ser superior al esperado de los estudios de expresión. Además, si HER2 resultase importante en la patofisiología de estos tumores, una gran proporción de pacientes podría beneficiarse de terapias dirigidas contra dicha proteína, cuyo uso está perfectamente establecido para otras patologías como el cáncer de mama (Amiri-Kordestani *et al.* 2014). Por todo ello, se llevaron a cabo estudios para definir la relevancia biológica de HER2 en cáncer de ovario, analizando líneas celulares de cáncer de ovario. En todas las líneas estudiadas, se detectó expresión y activación de HER2, aunque a distintos niveles.

Los estudios de inhibición genética de HER2, mediante shRNA, mostraron que en las células SKOV3 y OVCAR8 el silenciamiento de HER2 inhibía sustancialmente la proliferación celular, a diferencia de lo ocurrido en A2780 e IGROV1. Esta variabilidad en la sensibilidad al silenciamiento del receptor sugería que ciertas líneas (SKOV3 y OVCAR8) podrían ser dependientes de la señalización a través de HER2, mientras que en otras (A2780 e IGROV1) HER2 no contribuiría significativamente a su proliferación. El efecto de lapatinib en IGROV1, que resultó insensible al silenciamiento, podría deberse a una acción no específica del fármaco, como ya se ha descrito en otros sistemas (Doloff *et al.* 2011). De estos experimentos de silenciamiento de HER2 se pueden extraer varias consideraciones relevantes desde el punto de vista terapéutico. SKOV3 podría considerarse un modelo de tumor de ovario sobreexpresor HER2, por lo que podría ser óptimo para la intervención terapéutica mediante terapias anti-HER2. Sin embargo, hay otros factores más allá de la sobreexpresión de HER2 que podrían contribuir a la dependencia de HER2 en cáncer de ovario y que explicarían el efecto observado en OVCAR8, como la sobreexpresión de ligandos de los receptores ERBB, por ejemplo, NRG. De hecho, se ha descrito que el bloqueo de este ligando impide la proliferación de células de carcinoma de ovario (Sheng *et al.* 2010).

Los análisis *in vitro* del efecto en líneas celulares de cáncer de ovario de varios agentes anti-HER2 aprobados para su uso en clínica mostraron una eficacia limitada de trastuzumab y pertuzumab, en línea con otros estudios *in vivo* ya publicados (Sims *et al.* 2012). Por el contrario, el ADC derivado de trastuzumab, T-DM1, mostró importantes propiedades antitumorales, tanto *in vitro* como en estudios *in vivo* en ratones inyectados con células SKOV3. Por ello, y considerando además que el mecanismo de acción de este fármaco en carcinoma de ovario no se había estudiado, se llevó a cabo un estudio para caracterizar las respuestas moleculares de las células de cáncer de ovario a T-DM1. Las curvas de dosis-respuesta indicaron que la línea celular más sensible era SKOV3, lo cual se podría explicar teniendo en cuenta que esta línea celular presenta altos niveles de expresión de HER2 y adicción a la proteína, como quedó de manifiesto con los

experimentos de silenciamiento de HER2. En cuanto a su mecanismo de acción, T-DM1 provocó el bloqueo del ciclo celular en mitosis, como indicó la acumulación de células en esta fase del ciclo celular, así como el aumento de la cantidad de proteínas como fosfo-histona H3 y fosfo-BUBR1, cuya expresión se asocia a esta fase del ciclo. La acumulación de células en mitosis estaría causada probablemente por el derivado de la maintansina, responsable de impedir el correcto ensamblaje del huso mitótico, como se observó por inmunofluorescencia en las células tratadas con T-DM1. Este efecto provocó el aumento del número de células mitóticas en los cultivos, cuya parada prolongada en esta fase las llevó a evolucionar a células multinucleadas. La acción antiproliferativa de T-DM1, por tanto, tiene un efecto directo en la dinámica del ciclo celular, sin embargo, el tratamiento prolongado con la droga conduce a muerte celular. Este fenómeno podría acontecer tras la parada del ciclo celular y la multinucleación, y se suele denominar catástrofe mitótica, la cual también ha sido descrita en cáncer de mama (Barok *et al.* 2011) y parece estar relacionada con la concentración citoplasmática de DM1 libre (Barok *et al.* 2014).

Es interesante mencionar que T-DM1 mostró sinergia al combinarlo con docetaxel y vinorelbina, lo que podría indicar que los fármacos que alteran la dinámica de microtúbulos potencian la acción antitumoral de T-DM1. Además, T-DM1 provocó un aumento en los niveles de p27, efecto que podría deberse a la parte de la molécula que contiene trastuzumab, ya que se ha descrito previamente que el anticuerpo monoclonal produce ese efecto bioquímico (Lane *et al.* 2000). El incremento en p27 se ha ligado a una transición retrasada de las células desde la fase G<sub>1</sub> a la S. Sin embargo, aunque este incremento pudiera contribuir al efecto antitumoral de T-DM1, parece claro que la parada en mitosis predomina sobre otros efectos del fármaco sobre el ciclo celular.

Cabe destacar que T-DM1 resultó efectivo no solo en las líneas celulares sensibles al silenciamiento *in vitro* de HER2, sino también en el resto de líneas de cáncer de ovario. Por ello, es posible que en células que no son adictas a la

proteína, los bajos niveles de HER2 pudieran favorecer la entrada de T-DM1 al interior de la célula. De hecho, se observó internalización del ADC en todas las líneas celulares analizadas. Además, todas estas células tumorales se caracterizan por una alta tasa de proliferación, lo que podría explicar el efecto antitumoral de T-DM1 en estas líneas resistentes al silenciamiento de HER2, con bajos niveles de la proteína. Teniendo en cuenta que los estudios de farmacocinética de T-DM1 han descrito concentraciones plasmáticas del fármaco por encima de la dosis máxima probada en este trabajo y que se mantienen hasta 20 días (Krop *et al.* 2010), es posible que pacientes de cáncer de ovario, con tumores que expresan bajos niveles de HER2 también pudieran beneficiarse de las propiedades antitumorales de T-DM1. Recientemente, se ha desarrollado un nuevo ADC dirigido contra HER2 que ha demostrado actividad antitumoral en carcinoma de ovario epitelial tanto con sobreexpresión de HER2 como con expresión baja o moderada del receptor (Menderes *et al.* 2017).

En resumen, los estudios llevados a cabo en esta parte del trabajo describieron el estado de activación de varias tirosina quinasas susceptibles de ser atacadas farmacológicamente en cáncer de ovario, destacando la frecuente activación de HER2 en muestras tumorales. Los datos demostraron evidencia preclínica de que actuar sobre HER2 en esta patología tenía una acción antitumoral en células que expresan la proteína, especialmente en el caso del derivado de trastuzumab, T-DM1. El efecto antiproliferativo mostrado por T-DM1, mucho mayor que el de otros fármacos clínicamente disponibles, así como su potenciación al combinarlo con otros fármacos que se usan habitualmente en cáncer de ovario, incita a la evaluación clínica de T-DM1, ya sea en monoterapia o en combinación, para el tratamiento del cáncer de ovario, especialmente el HER2 positivo.



### III. DIANAS TERAPÉUTICAS PARA ADCs EN CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS

Para los pacientes de carcinoma de células renales, la cirugía sigue siendo la única aproximación potencialmente curativa. Sin embargo, a pesar de la nefrectomía, la tasa de recurrencia global se estima en un 35% (Eggerer et al. 2006). Además, el carcinoma de células renales metastásico es altamente resistente a la quimioterapia (Hartmann y Bokemeyer 1999). En los últimos años, el mayor conocimiento de la biología de estos tumores ha conducido al desarrollo de nuevas terapias dirigidas, como los inhibidores de angiogénesis (Motzer et al. 2014) o, más recientemente, los inhibidores de los puntos de control del sistema inmune (Geynisman 2015). Todos ellos han mejorado significativamente la supervivencia en pacientes con carcinoma de células renales metastásico, aunque su papel como tratamiento adyuvante no está tan claro (Massari *et al.* 2017). Por otro lado, rara vez se obtienen respuestas completas al tratamiento. Por todo ello, desentrañar los mecanismos moleculares de estos tumores e identificar potenciales dianas para su intervención terapéutica es de gran importancia para erradicar esta patología o incrementar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes. Con este objetivo, se inició un estudio, partiendo de muestras tumorales y de tejido sano de pacientes con ccRCC, para identificar proteínas susceptibles de ser atacadas farmacológicamente, ya sea con terapias disponibles actualmente para su uso en clínica en otras patologías, o bien contra las que diseñar nuevos fármacos, como ADCs.

Para ello, se evaluó el estado de activación de varios receptores tirosina quinasa en dichas muestras. Los RTKs, además de tener un papel muy relevante en la señalización de las células cancerígenas, se localizan en la membrana plasmática, lo que les convierte en proteínas accesibles para terapias dirigidas basadas en ADCs. El análisis con *arrays* de anticuerpos señaló a EGFR como el único receptor que se encontraba activo en las muestras de pacientes con ccRCC. Además, el nivel de activación del receptor en las muestras tumorales fue significativamente



superior que en las muestras de tejido sano. Los análisis *in silico* de la expresión diferencial de EGFR en distintos tipos de cáncer corroboraron la alta expresión del receptor en carcinoma renal de células claras, 2,35 veces superior que en tejido sano de riñón.

Estas observaciones también se confirmaron en líneas celulares de ccRCC. Por un lado, EGFR fue el receptor más frecuentemente presente y activo a nivel proteico; por otro lado, los datos de expresión de mRNA del receptor obtenidos de CCLE demostraron la alta expresión del receptor en líneas celulares de riñón. Por último, los ensayos biológicos encaminados a explorar la relevancia de EGFR en el control de la proliferación de las líneas celulares de ccRCC demostraron su importancia en este proceso. Tanto la inhibición genética, mediante shRNA, como la inhibición farmacológica con el anticuerpo monoclonal cetuximab afectaron profundamente el crecimiento de las células de ccRCC. Hay que mencionar que, en línea con lo que ya se ha observado en estudios previos, el tratamiento con TKIs no resultó eficaz en estas líneas celulares (Kuroda *et al.* 2009).

Los resultados obtenidos están en consonancia con varios estudios preclínicos que resaltan el papel del receptor de EGF en carcinoma renal. Hay varias publicaciones que han descrito sobreexpresión de EGFR en RCC (*renal cell carcinoma*; carcinoma de células renales) (Gomella *et al.* 1990, Ishikawa *et al.* 1990, Hofmockel *et al.* 1997), aunque su valor como marcador pronóstico no está tan claro (Cohen *et al.* 2007). Además, se ha observado que el bloqueo de la señalización a través de EGFR disminuye la proliferación de células de RCC tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, se ha comprobado que las líneas celulares de RCC son sensibles a cetuximab (Atlas *et al.* 1992) y que el tratamiento con este anticuerpo monoclonal también es capaz de inhibir el crecimiento de xenoinjertos de células de carcinoma renal en ratones (Prewett *et al.* 1998). Resultados similares se han observado también con TKIs contra EGFR, donde el bloqueo de la señalización del receptor inhibió la angiogénesis (Kedar *et al.* 2002) o el crecimiento en hueso (Weber *et al.* 2003) de células de carcinoma renal inyectadas

ortotópicamente en ratones. Todos estos resultados preclínicos proporcionaron una base sólida para evaluar terapias dirigidas contra EGFR en pacientes con RCC avanzado (Dancey 2004). Sin embargo, los resultados de varios ensayos clínicos valorando el potencial terapéutico de estos agentes han resultado decepcionantes, demostrando la falta de actividad en pacientes tanto de erlotinib (Drucker *et al.* 2003), como de cetuximab (Motzer *et al.* 2003) o de otro anticuerpo monoclonal contra EGFR (Rowinsky *et al.* 2004). Por otro lado, los tumores sólidos son genéticamente complejos y no suelen depender de una única quinasa o vía de señalización para su proliferación aberrante. Con frecuencia se da un alto nivel de activación compensatoria de receptores dentro de una vía de señalización así como entre distintas vías. Por ello, al igual que ocurre con la quimioterapia convencional, que a menudo es más eficaz en combinación, las combinaciones racionales de terapias dirigidas tienen más probabilidades de resultar más potentes (Baselga y Tabernero 2007). Con esta idea se ha probado el bloqueo de la vía de EGFR y VEGF con anticuerpos monoclonales. Lamentablemente, la adición de erlotinib a bevacizumab no proporcionó un beneficio clínico adicional al tratamiento con bevacizumab en monoterapia (Bukowski *et al.* 2007). De forma similar, la combinación de los TKIs gefitinib más sunitinib demostró una eficacia comparable al tratamiento en monoterapia con sunitinib (Motzer *et al.* 2010).

Uno de los mecanismos más habituales de activación de EGFR es mediante la unión de ligando (Scaltriti y Baselga 2006). Los factores de crecimiento de la familia de EGF tienen como particularidad que inducen la señalización transmembrana tanto en su forma soluble como en su forma anclada a membrana. Además, el ser proteínas de membrana les convierte en potenciales dianas terapéuticas para ADCs. El análisis de la expresión génica de los distintos ligandos de EGFR a partir del mRNA de las muestras de pacientes con ccRCC mostró que TGF $\alpha$  era el que presentaba una expresión mayor, tanto en tejido sano como en tejido tumoral. Los datos de expresión diferencial de TGF $\alpha$  obtenidos *in silico* confirmaron que, de todos los ligandos, TGF $\alpha$  era el que presentaba mayores niveles en carcinoma renal de células claras. Además, de todos los tipos de cáncer

recogidos en la base de datos, el ccRCC fue el que presentó mayor expresión de TGF $\alpha$ , siendo 2,89 veces superior en tejido tumoral que en tejido sano. A nivel proteico, TGF $\alpha$  apareció en su forma procesada (cola) en la mayoría de los casos de tejido sano, mientras que en las muestras de tejido tumoral se detectaron las dos formas, la completa (proTGF $\alpha$ ) que aún contiene la forma madura de TGF $\alpha$  y, por tanto, es capaz de estimular al receptor EGFR; y la forma procesada, que ha perdido el factor de crecimiento. Los datos de expresión génica de TGF $\alpha$  también se confirmaron en líneas celulares de ccRCC. Asimismo, los datos obtenidos de CCLE demostraron la alta expresión del mRNA de TGF $\alpha$  en líneas celulares de riñón. Por último, los ensayos biológicos de silenciamiento genético de TGF $\alpha$  en líneas celulares de ccRCC demostraron un marcado efecto antiproliferativo, especialmente en aquellas líneas que presentaron mayores niveles de proTGF $\alpha$ .

Los resultados referentes a la expresión de TGF $\alpha$  en ccRCC obtenidos en este trabajo confirman estudios previos en los que se destacó la importancia del ligando en esta patología. A nivel de mRNA, se ha detectado expresión incrementada de TGF $\alpha$  tanto en líneas celulares de RCC (Sargent *et al.* 1989), como en tejido tumoral de muestras de carcinoma de células renales procedentes de pacientes, frente al tejido normal circundante (Gomella *et al.* 1989, Petrides *et al.* 1990). Este incremento en la expresión del ligando suele ir asociado también a una mayor expresión de EGFR, por lo que se ha sugerido un mecanismo autocrino que impulsaría el desarrollo y progresión del RCC (Mydlo *et al.* 1989). A nivel proteico, por inmunohistoquímica, también se ha descrito la expresión incrementada de TGF $\alpha$  en carcinoma de células renales humano (Lager *et al.* 1994) y de rata, a lo largo de todas las fases del desarrollo del tumor renal, desde las displasias más tempranas, estando ausente en epitelio no neoplásico (Everitt *et al.* 1997). La distribución del factor de crecimiento no parece estar asociada al grado histológico o tener un papel pronóstico (Uhlman *et al.* 1995), sin embargo, sí que se ha sugerido un papel importante en la neovascularización del carcinoma de células claras (Hise *et al.* 1996). Aunque la expresión mayoritaria en tejido tumoral de RCC frente a tejido sano ya se había reportado en la literatura, principalmente a nivel

del mRNA o por inmunohistoquímica, hasta la fecha no se había descrito que estas diferencias se deben a la presencia de distintas formas de la proteína. En este trabajo se ha observado la presencia de formas truncadas, sin el dominio extracelular que contiene la forma madura de TGF $\alpha$ , en las muestras de tejido sano. En las muestras tumorales procedentes de pacientes, la forma presente fue proTGF $\alpha$ . Esta diferencia resulta muy relevante desde un punto de vista clínico, dado que a la hora de diseñar terapias dirigidas contra un antígeno tumoral, la expresión diferencial entre tejido sano y tumoral es crucial.

Por otro lado, los resultados obtenidos hasta el momento confirman también el papel del ligando en la progresión tumoral. Ya se ha demostrado en líneas celulares que el tratamiento con el factor de crecimiento soluble TGF $\alpha$  es capaz de estimular la proliferación celular y provocar un incremento en los niveles de mRNA de EGFR y del propio TGF $\alpha$ , efecto que se inhibe al tratar dichas líneas con cetuximab, lo que también causa un aumento en los niveles de TGF $\alpha$  secretado. Estos datos sugieren que la proliferación de las líneas celulares de RCC podría estar regulada por el TGF $\alpha$  producido de manera endógena y que esa vía regulatoria se podría interrumpir con un anticuerpo monoclonal contra EGFR (Atlas *et al.* 1992). También se ha demostrado en líneas celulares que el papel de TGF $\alpha$  en la proliferación celular es específico de RCC de células claras y no tanto de otros subtipos, como el papilar (Ramp *et al.* 2000). En la mayoría de tumores de ccRCC se observó secreción del factor de crecimiento y la estimulación con TGF $\alpha$  exógeno estimuló su crecimiento, lo que sugiere que el rol pro-proliferativo de TGF $\alpha$  se produce tanto por acciones autocrinas como paracrinas (Ramp *et al.* 2000).

Para que un antígeno tumoral sea apropiado para inmunoterapia necesita: (i) expresarse en las células tumorales, (ii) estar ausente en tejidos normales, (iii) demostrar inmunogenicidad e idealmente (iv) estar involucrado en la progresión tumoral. Considerando estos criterios, TGF $\alpha$  parece un candidato muy prometedor debido a su expresión diferencial en tejidos normales frente a tumorales y a su

papel directo en la proliferación de tumores de RCC. Para evaluar su inmunogenicidad, se llevó a cabo un estudio en un panel de tejidos normales y numerosos especímenes de cáncer renal humano en RCC (Pelletier *et al.* 2009). En este estudio, además de confirmar la expresión diferencial de TGF $\alpha$ , se expandieron líneas de células T específicas para ciertos péptidos de TGF $\alpha$  cuando se presentaron por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad en la superficie de células presentadoras de antígeno. Los resultados confirmaron la inmunogenicidad del ligando, mediante la presencia de linfocitos T específicos de TGF $\alpha$  entre los linfocitos infiltrantes del tumor y las células mononucleares de la sangre periférica obtenida de pacientes de RCC.

De cara a su potencial como diana terapéutica para el desarrollo de un ADC, otro requisito adicional sería que el ligando fuese capaz de internalizarse una vez unido a un anticuerpo monoclonal específico. En este sentido, cabe mencionar que se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal humanizado contra TGF $\alpha$  capaz de neutralizar completamente el ligando soluble e internalizarse una vez unido a la forma anclada a membrana (Beidler *et al.* 2014). De manera importante, cabe destacar que la administración de este anticuerpo monoclonal a macacos cangrejeros no dio lugar a la toxicidad en piel observada con los actuales inhibidores de EGFR usados en clínica. Tampoco se detectaron otras patologías, lo que indica que la neutralización del ligando, a diferencia de lo que ocurre con el receptor, podría proporcionar un perfil clínico relativamente seguro. Además, el estar humanizado permitiría su desarrollo clínico.

En resumen, los estudios llevados a cabo en esta parte del trabajo revelaron al receptor de EGF y su ligando TGF $\alpha$  como dos proteínas con una aparente relevancia en carcinoma renal de células claras, cuya expresión se encontraba alterada en tejido tumoral de muestras de pacientes frente a sus correspondientes muestras de tejido sano, lo que podría sugerir un posible *loop* autocrino que estaría sustentando la proliferación de las células tumorales. Los datos preclínicos también demostraron que actuar sobre ambas proteínas tenía una acción

antitumoral. Estos datos van en consonancia con varios estudios ya descritos en la literatura que han impulsado la evaluación clínica de tratamientos contra EGFR, lamentablemente demostrando un escaso beneficio en pacientes. Por su parte, TGF $\alpha$  es una diana terapéutica que podría ser incluso más interesante que el receptor. Puede que la ausencia de tratamientos específicos contra el ligando haya disuadido el profundizar en su evaluación clínica. Sin embargo, todas las evidencias preclínicas del papel de TGF $\alpha$  en la proliferación celular del ccRCC; la expresión diferencial de la proteína, con la presencia de una forma completa en el tejido tumoral, susceptible de ser atacada mediante ADCs y ausente en el tejido sano; su inmunogenicidad, así como su capacidad de internalización incitan a la evaluación clínica de TGF $\alpha$  como una potencial diana terapéutica para el tratamiento del carcinoma renal de células claras.

# **CONCLUSIONES**





## CAPÍTULO I

1. Los modelos celulares de cáncer de mama con resistencia adquirida a T-DM1 son capaces de adaptarse y sobrevivir a la acción antitumoral de T-DM1 mediante varios mecanismos de resistencia.
2. Uno de estos mecanismos de resistencia está ligado a una actividad lisosomal deficiente, consecuencia de un incremento en el pH de los lisosomas y una disminución de la actividad proteasa de las enzimas. Esto impide el correcto procesamiento de T-DM1 que debiera conducir a la liberación del agente citotóxico.

## CAPÍTULO II

3. HER2 es la tirosina quinasa, susceptible de ser atacada farmacológicamente, que se encuentra más frecuentemente activada en tumores epiteliales de ovario.
4. T-DM1 exhibe un efecto antitumoral *in vitro* e *in vivo*, en modelos HER2+. Estos resultados apoyan la evaluación clínica de T-DM1 para el tratamiento del cáncer de ovario sobreexpresor de HER2.
5. La acción antiproliferativa de T-DM1 se debe a la parada prolongada del ciclo celular en mitosis, lo que conduce a catástrofe mitótica.

## CAPÍTULO III

6. EGFR es el receptor tirosina quinasa que se encuentra más frecuentemente activado en carcinoma renal de células claras.
7. TGF $\alpha$  es el factor de crecimiento de la familia de EGF que se expresa mayoritariamente en carcinoma renal de células claras.

8. TGF $\alpha$  presenta una expresión proteica diferencial entre el tejido tumoral y el tejido sano circundante en muestras de pacientes con carcinoma renal de células claras, encontrándose como una proforma de 17 kDa, en el primer caso, y como una forma procesada de 15 kDa, en el segundo.
9. Tanto la inhibición genética como la inhibición farmacológica de TGF $\alpha$  ejercen un efecto antiproliferativo en modelos celulares de carcinoma renal de células claras. Estos datos, sumados a que TGF $\alpha$  se presenta como un antígeno diferencial entre tejido sano y tumoral, sugieren la posibilidad de que TGF $\alpha$  pueda representar una potencial diana terapéutica para el tratamiento de esta patología.

# **BIBLIOGRAFÍA**



- Amiri-Kordestani L, Blumenthal GM, Xu QC, Zhang L, Tang SW, Ha L, *et al.* FDA approval: ado-trastuzumab emtansine for the treatment of patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* (2014); 20(17): 4436-4441.
- Anderson NG and Ahmad T. ErbB receptor tyrosine kinase inhibitors as therapeutic agents. *Front Biosci* (2002); 7(d1926-1940).
- Appelbaum FR and Bernstein ID. Gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia. *Blood* (2017); 130(22): 2373-2376.
- Arteaga CL y Engelman JA. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell* (2014); 25(3): 282-303.
- Atlas I, Mendelsohn J, Baselga J, Fair WR, Masui H y Kumar R. Growth regulation of human renal carcinoma cells: role of transforming growth factor alpha. *Cancer Res* (1992); 52(12): 3335-3339.
- Austin CD, De Maziere AM, Pisacane PI, van Dijk SM, Eigenbrot C, Sliwkowski MX, *et al.* Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin. *Mol Biol Cell* (2004); 15(12): 5268-5282.
- Aziz M, Yang WL and Wang P. Measurement of phagocytic engulfment of apoptotic cells by macrophages using pHrodo succinimidyl ester. *Curr Protoc Immunol* (2013); Chapter 14(Unit 14 31).
- Banerjee S and Kaye SB. New strategies in the treatment of ovarian cancer: current clinical perspectives and future potential. *Clin Cancer Res* (2013); 19(5): 961-968.
- Barata PC and Rini BI. Treatment of renal cell carcinoma: Current status and future directions. *CA Cancer J Clin* (2017); 67(6): 507-524.
- Barok M, Joensuu H and Isola J. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res* (2014); 16(2): 209.
- Barok M, Tanner M, Koninki K and Isola J. Trastuzumab-DM1 causes tumour growth inhibition by mitotic catastrophe in trastuzumab-resistant breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res* (2011); 13(2): R46.
- Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, *et al.* The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* (2012); 483(7391): 603-607.
- Barros FF, Powe DG, Ellis IO and Green AR. Understanding the HER family in breast cancer: interaction with ligands, dimerization and treatments. *Histopathology* (2010); 56(5): 560-572.
- Bartlett JM, Langdon SP, Simpson BJ, Stewart M, Katsaros D, Sismondi P, *et al.* The prognostic value of epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer. *Br J Cancer* (1996); 73(3): 301-306.
- Baselga J and Tabernero J. Combined antiangiogenesis and anti-epidermal growth factor receptor targeting in the treatment of cancer: hold back, we are not there yet. *J Clin Oncol* (2007); 25(29): 4516-4518.

- Beck A, Goetsch L, Dumontet C and Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov* (2017); 16(5): 315-337.
- Beidler CB, Petrovan RJ, Conner EM, Boyles JS, Yang DD, Harlan SM, *et al.* 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* (2014); 349(2): 330-343.
- Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, *et al.* A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* (2007); 12(4): 395-402.
- Bertelsen V and Stang E. The Mysterious Ways of ErbB2/HER2 Trafficking. *Membranes (Basel)* (2014); 4(3): 424-446.
- Bhargava R, Striebel J, Beriwal S, Flickinger JC, Onisko A, Ahrendt G, *et al.* Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int J Clin Exp Pathol* (2009); 2(5): 444-455.
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* (2006); 354(6): 567-578.
- Bookman MA, Darcy KM, Clarke-Pearson D, Boothby RA and Horowitz IR. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol* (2003); 21(2): 283-290.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* (1976); 72(248-254).
- Brissenden JE, Derynck R and Francke U. Mapping of transforming growth factor alpha gene on human chromosome 2 close to the breakpoint of the Burkitt's lymphoma t(2;8) variant translocation. *Cancer Res* (1985); 45(11 Pt 2): 5593-5597.
- Brunner-Kubath C, Shabbir W, Saferding V, Wagner R, Singer CF, Valent P, *et al.* The PI3 kinase/mTOR blocker NVP-BEZ235 overrides resistance against irreversible ErbB inhibitors in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* (2011); 129(2): 387-400.
- Bukowski RM, Kabbinavar FF, Figlin RA, Flaherty K, Srinivas S, Vaishampayan U, *et al.* Randomized phase II study of erlotinib combined with bevacizumab compared with bevacizumab alone in metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol* (2007); 25(29): 4536-4541.
- Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, *et al.* Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med* (2011); 365(26): 2473-2483.

- Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, *et al.* An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* (2003); 12(3): 541-552.
- Cabrera N, Diaz-Rodriguez E, Becker E, Martin-Zanca D and Pandiella A. TrkA receptor ectodomain cleavage generates a tyrosine-phosphorylated cell-associated fragment. *J Cell Biol* (1996); 132(3): 427-436.
- Cai Z, Zhang H, Liu J, Berezov A, Murali R, Wang Q, *et al.* Targeting erbB receptors. *Semin Cell Dev Biol* (2010); 21(9): 961-966.
- Cancer Cell Line Encyclopedia C and Genomics of Drug Sensitivity in Cancer C. Pharmacogenomic agreement between two cancer cell line data sets. *Nature* (2015); 528(7580): 84-87.
- Carden CP, Stewart A, Thavasulu P, Kipps E, Pope L, Crespo M, *et al.* The association of PI3 kinase signaling and chemoresistance in advanced ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* (2012); 11(7): 1609-1617.
- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, *et al.* Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* (2006); 295(21): 2492-2502.
- Carraway KL, 3rd, Sliwkowski MX, Akita R, Platko JV, Guy PM, Nuijens A, *et al.* The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. *J Biol Chem* (1994); 269(19): 14303-14306.
- Cassady JM, Chan KK, Floss HG and Leistner E. Recent developments in the maytansinoid antitumor agents. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* (2004); 52(1): 1-26.
- Ciardello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Pomatico G, De Placido S, *et al.* Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* (2000); 6(5): 2053-2063.
- Clynes RA, Towers TL, Presta LG and Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* (2000); 6(4): 443-446.
- Cohen D, Lane B, Jin T, Magi-Galluzzi C, Finke J, Rini BI, *et al.* The prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in clear-cell renal cell carcinoma: a call for standardized methods for immunohistochemical evaluation. *Clin Genitourin Cancer* (2007); 5(4): 264-270.
- Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, *et al.* Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* (1985); 230(4730): 1132-1139.
- Chan YK, Sung HK, Jahng JW, Kim GH, Han M and Sweeney G. Lipocalin-2 inhibits autophagy and induces insulin resistance in H9c2 cells. *Mol Cell Endocrinol* (2016); 430(68-76).
- Chari RV. Targeted delivery of chemotherapeutics: tumor-activated prodrug therapy. *Adv Drug Deliv Rev* (1998); 31(1-2): 89-104.

- Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* (2013); 14(128).
- Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* (1987); 162(1): 156-159.
- Chou TC, Motzer RJ, Tong Y and Bosl GJ. Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design. *J Natl Cancer Inst* (1994); 86(20): 1517-1524.
- Dai H, van't Veer L, Lamb J, He YD, Mao M, Fine BM, *et al.* A cell proliferation signature is a marker of extremely poor outcome in a subpopulation of breast cancer patients. *Cancer Res* (2005); 65(10): 4059-4066.
- Damelin M, Zhong W, Myers J and Sapra P. Evolving Strategies for Target Selection for Antibody-Drug Conjugates. *Pharm Res* (2015); 32(11): 3494-3507.
- Dancey JE. Epidermal growth factor receptor and epidermal growth factor receptor therapies in renal cell carcinoma: do we need a better mouse trap? *J Clin Oncol* (2004); 22(15): 2975-2977.
- Daniel NN and Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* (2004); 116(2): 205-219.
- de Alava E, Ocana A, Abad M, Montero JC, Esparis-Ogando A, Rodriguez CA, *et al.* Neuregulin expression modulates clinical response to trastuzumab in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* (2007); 25(19): 2656-2663.
- De Laurentiis M, Cianniello D, Caputo R, Stanzione B, Arpino G, Cinieri S, *et al.* Treatment of triple negative breast cancer (TNBC): current options and future perspectives. *Cancer Treat Rev* (2010); 36 Suppl 3(S80-86).
- Del Barco S, Ciruelos E, Tusquets I, Ruiz M, Barnadas A and Seom. SEOM clinical guidelines for the systemic treatment of early breast cancer 2013. *Clin Transl Oncol* (2013); 15(12): 1011-1017.
- Denny WA. The 4-anilinoquinazoline class of inhibitors of the erbB family of receptor tyrosine kinases. *Farmacologia* (2001); 56(1-2): 51-56.
- DeVay RM, Delaria K, Zhu G, Holz C, Foletti D, Sutton J, *et al.* Improved Lysosomal Trafficking Can Modulate the Potency of Antibody Drug Conjugates. *Bioconjug Chem* (2017); 28(4): 1102-1114.
- Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, *et al.* Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* (2008); 455(7216): 1069-1075.
- Dolloff NG, Mayes PA, Hart LS, Dicker DT, Humphreys R and El-Deiry WS. Off-target lapatinib activity sensitizes colon cancer cells through TRAIL death receptor up-regulation. *Sci Transl Med* (2011); 3(86): 86ra50.
- Doronina SO, Mendelsohn BA, Bovee TD, Cervený CG, Alley SC, Meyer DL, *et al.* Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody



- delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity. *Bioconjug Chem* (2006); 17(1): 114-124.
- Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, *et al.* Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* (1984); 307(5951): 521-527.
- Drucker B, Bacik J, Ginsberg M, Marion S, Russo P, Mazumdar M, *et al.* Phase II trial of ZD1839 (IRESSA) in patients with advanced renal cell carcinoma. *Invest New Drugs* (2003); 21(3): 341-345.
- Duan L, Miura Y, Dimri M, Majumder B, Dodge IL, Reddi AL, *et al.* Cbl-mediated ubiquitinylation is required for lysosomal sorting of epidermal growth factor receptor but is dispensable for endocytosis. *J Biol Chem* (2003); 278(31): 28950-28960.
- Dubowchik GM, Firestone RA, Padilla L, Willner D, Hofstead SJ, Mosure K, *et al.* Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity. *Bioconjug Chem* (2002); 13(4): 855-869.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* (2005); 365(9472): 1687-1717.
- Eccles SA. The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *Int J Dev Biol* (2011); 55(7-9): 685-696.
- Eggerer SE, Yossepowitch O, Pettus JA, Snyder ME, Motzer RJ and Russo P. Renal cell carcinoma recurrence after nephrectomy for localized disease: predicting survival from time of recurrence. *J Clin Oncol* (2006); 24(19): 3101-3106.
- Eichhorn PJ, Gili M, Scaltriti M, Serra V, Guzman M, Nijkamp W, *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BEZ235. *Cancer Res* (2008); 68(22): 9221-9230.
- El-Sayed A, Futaki S and Harashima H. Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment. *AAPS J* (2009); 11(1): 13-22.
- Erickson HK, Park PU, Widdison WC, Kovtun YV, Garrett LM, Hoffman K, *et al.* Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing. *Cancer Res* (2006); 66(8): 4426-4433.
- Erickson HK, Widdison WC, Mayo MF, Whiteman K, Audette C, Wilhelm SD, *et al.* Tumor delivery and in vivo processing of disulfide-linked and thioether-linked antibody-maytansinoid conjugates. *Bioconjug Chem* (2010); 21(1): 84-92.
- Everitt JI, Walker CL, Goldsworthy TW and Wolf DC. Altered expression of transforming growth factor-alpha: an early event in renal cell carcinoma development. *Mol Carcinog* (1997); 19(3): 213-219.

- Farley J, Brady WE, Vathipadiekal V, Lankes HA, Coleman R, Morgan MA, *et al.* Selumetinib in women with recurrent low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum: an open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* (2013); 14(2): 134-140.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* (2015); 136(5): E359-386.
- Frederick L, Wang XY, Eley G and James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* (2000); 60(5): 1383-1387.
- Fry DW. Mechanism of action of erbB tyrosine kinase inhibitors. *Exp Cell Res* (2003); 284(1): 131-139.
- Fujita K, Ikarashi H, Takakuwa K, Kodama S, Tokunaga A, Takahashi T, *et al.* Prolonged disease-free period in patients with advanced epithelial ovarian cancer after adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes. *Clin Cancer Res* (1995); 1(5): 501-507.
- Gagliato DM, Jardim DL, Marchesi MS and Hortobagyi GN. Mechanisms of resistance and sensitivity to anti-HER2 therapies in HER2+ breast cancer. *Oncotarget* (2016);
- Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quiros JR, Rojas D, *et al.* Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol* (2017); 19(7): 799-825.
- Gallardo E, Mendez-Vidal MJ, Perez-Gracia JL, Sepulveda-Sanchez JM, Campayo M, Chirivella-Gonzalez I, *et al.* SEOM clinical guideline for treatment of kidney cancer (2017). *Clin Transl Oncol* (2017);
- Garcia-Saenz JA, Bermejo B, Estevez LG, Palomo AG, Gonzalez-Farre X, Margeli M, *et al.* SEOM clinical guidelines in early-stage breast cancer 2015. *Clin Transl Oncol* (2015); 17(12): 939-945.
- Gavila J, Lopez-Tarruella S, Saura C, Munoz M, Oliveira M, De la Cruz-Merino L, *et al.* SEOM clinical guidelines in metastatic breast cancer 2015. *Clin Transl Oncol* (2015); 17(12): 946-955.
- Gene Ontology C. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res* (2015); 43(Database issue): D1049-1056.
- Geynisman DM. Anti-programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) Antibody Nivolumab Leads to a Dramatic and Rapid Response in Papillary Renal Cell Carcinoma with Sarcomatoid and Rhabdoid Features. *Eur Urol* (2015); 68(5): 912-914.
- Gilbertson R, Hernan R, Pietsch T, Pinto L, Scotting P, Allibone R, *et al.* Novel ERBB4 juxtamembrane splice variants are frequently expressed in childhood medulloblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* (2001); 31(3): 288-294.
- Giricz O, Calvo V, Peterson EA, Abouzeid CM and Kenny PA. TACE-dependent TGFalpha shedding drives triple-negative breast cancer cell invasion. *Int J Cancer* (2013); 133(11): 2587-2595.

- Gomella LG, Anglard P, Sargent ER, Robertson CN, Kasid A and Linehan WM. Epidermal growth factor receptor gene analysis in renal cell carcinoma. *J Urol* (1990); 143(1): 191-193.
- Gomella LG, Sargent ER, Wade TP, Anglard P, Linehan WM and Kasid A. Expression of transforming growth factor alpha in normal human adult kidney and enhanced expression of transforming growth factors alpha and beta 1 in renal cell carcinoma. *Cancer Res* (1989); 49(24 Pt 1): 6972-6975.
- Gordon MS, Matei D, Aghajanian C, Matulonis UA, Brewer M, Fleming GF, *et al.* Clinical activity of pertuzumab (rhuMAb 2C4), a HER dimerization inhibitor, in advanced ovarian cancer: potential predictive relationship with tumor HER2 activation status. *J Clin Oncol* (2006); 24(26): 4324-4332.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC and Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* (1977); 36(1): 59-74.
- Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q, Watkins SC, Melhem MF, Endo S, *et al.* Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000); 97(8): 4227-4232.
- Grovdal LM, Stang E, Sorkin A and Madshus IH. Direct interaction of Cbl with pTyr 1045 of the EGF receptor (EGFR) is required to sort the EGFR to lysosomes for degradation. *Exp Cell Res* (2004); 300(2): 388-395.
- Grunwald V and Hidalgo M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* (2003); 95(12): 851-867.
- Guest EM, Aplenc R, Sung L, Raimondi SC, Hirsch BA, Alonzo TA, *et al.* Gemtuzumab ozogamicin in infants with AML: results from the Children's Oncology Group trials AAML03P1 and AAML0531. *Blood* (2017); 130(7): 943-945.
- Gullick WJ. The role of the epidermal growth factor receptor and the c-erbB-2 protein in breast cancer. *Int J Cancer Suppl* (1990); 5(55-61).
- Hamblett KJ, Jacob AP, Gurgel JL, Tometsko ME, Rock BM, Patel SK, *et al.* SLC46A3 Is Required to Transport Catabolites of Noncleavable Antibody Maytansine Conjugates from the Lysosome to the Cytoplasm. *Cancer Res* (2015); 75(24): 5329-5340.
- Harshman LC and Choueiri TK. Targeting the hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway in renal cell carcinoma. *Cancer J* (2013); 19(4): 316-323.
- Hartmann JT and Bokemeyer C. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Anticancer Res* (1999); 19(2C): 1541-1543.
- He C, Hobert M, Friend L and Carlin C. The epidermal growth factor receptor juxtamembrane domain has multiple basolateral plasma membrane localization determinants, including a dominant signal with a polyproline core. *J Biol Chem* (2002); 277(41): 38284-38293.
- Hegde GV, de la Cruz CC, Chiu C, Alag N, Schaefer G, Crocker L, *et al.* Blocking NRG1 and other ligand-mediated Her4 signaling enhances the magnitude and duration

- of the chemotherapeutic response of non-small cell lung cancer. *Sci Transl Med* (2013); 5(171): 171ra118.
- Hise MK, Jacobs SC, Papadimitriou JC and Drachenberg CI. Transforming growth factor-alpha expression in human renal cell carcinoma: TGF-alpha expression in renal cell carcinoma. *Urology* (1996); 47(1): 29-33.
- Hobbs SS, Coffing SL, Le AT, Cameron EM, Williams EE, Andrew M, *et al.* Neuregulin isoforms exhibit distinct patterns of ErbB family receptor activation. *Oncogene* (2002); 21(55): 8442-8452.
- Hofmockel G, Riess S, Bassukas ID and Dammrich J. Epidermal growth factor family and renal cell carcinoma: expression and prognostic impact. *Eur Urol* (1997); 31(4): 478-484.
- Holbro T, Civenni G and Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* (2003); 284(1): 99-110.
- Hynes NE and Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* (2005); 5(5): 341-354.
- Ishikawa J, Maeda S, Umezu K, Sugiyama T and Kamidono S. Amplification and overexpression of the epidermal growth factor receptor gene in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* (1990); 45(6): 1018-1021.
- Ishizawar R and Parsons SJ. c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell* (2004); 6(3): 209-214.
- Jaiswal BS, Kljavin NM, Stawiski EW, Chan E, Parikh C, Durinck S, *et al.* Oncogenic ERBB3 mutations in human cancers. *Cancer Cell* (2013); 23(5): 603-617.
- Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, Cossu A, Reis-Filho JS, Fulford L, *et al.* Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res* (2004); 64(9): 3037-3045.
- Junttila TT, Li G, Parsons K, Phillips GL and Sliwkowski MX. Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* (2011); 128(2): 347-356.
- Kalim M, Chen J, Wang S, Lin C, Ullah S, Liang K, *et al.* Intracellular trafficking of new anticancer therapeutics: antibody-drug conjugates. *Drug Des Devel Ther* (2017); 11(2265-2276).
- Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Stelljes M, Martinelli G, Liedtke M, Stock W, *et al.* Inotuzumab Ozogamicin versus Standard Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* (2016); 375(8): 740-753.
- Kawamoto T, Sato JD, Le A, Polikoff J, Sato GH and Mendelsohn J. Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1983); 80(5): 1337-1341.
- Kedar D, Baker CH, Killion JJ, Dinney CP and Fidler IJ. Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling inhibits angiogenesis leading to regression of

- human renal cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* (2002); 8(11): 3592-3600.
- Kil SJ and Carlin C. EGF receptor residues leu(679), leu(680) mediate selective sorting of ligand-receptor complexes in early endosomal compartments. *J Cell Physiol* (2000); 185(1): 47-60.
- King CR, Kraus MH and Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* (1985); 229(4717): 974-976.
- Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* (2016); 12(1): 1-222.
- Koneru M, O'Cearbhaill R, Pendharkar S, Spriggs DR and Brentjens RJ. A phase I clinical trial of adoptive T cell therapy using IL-12 secreting MUC-16(ecto) directed chimeric antigen receptors for recurrent ovarian cancer. *J Transl Med* (2015); 13(102).
- Konishi T. Principal component analysis for designed experiments. *BMC Bioinformatics* (2015); 16 Suppl 18(S7).
- Koressaar T and Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* (2007); 23(10): 1289-1291.
- Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC and Aaronson SA. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1989); 86(23): 9193-9197.
- Krop IE, Beeram M, Modi S, Jones SF, Holden SN, Yu W, *et al.* Phase I study of trastuzumab-DM1, an HER2 antibody-drug conjugate, given every 3 weeks to patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* (2010); 28(16): 2698-2704.
- Krop IE, Kim SB, Martin AG, LoRusso PM, Ferrero JM, Badovinac-Crnjevic T, *et al.* Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice in patients with previously treated HER2-positive metastatic breast cancer (TH3RESA): final overall survival results from a randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol* (2017); 18(6): 743-754.
- Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* (2016); 44(W1): W90-97.
- Kuroda K, Horiguchi A, Sumitomo M, Asano T, Ito K, Hayakawa M, *et al.* Activated Akt prevents antitumor activity of gefitinib in renal cancer cells. *Urology* (2009); 74(1): 209-215.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970); 227(5259): 680-685.
- Lager DJ, Slagel DD and Palechek PL. The expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in renal cell carcinoma. *Mod Pathol* (1994); 7(5): 544-548.

- Lakhani SR and O'Hare MJ. The mammary myoepithelial cell--Cinderella or ugly sister? *Breast Cancer Res* (2001); 3(1): 1-4.
- Lambert JM and Chari RV. Ado-trastuzumab Emtansine (T-DM1): an antibody-drug conjugate (ADC) for HER2-positive breast cancer. *J Med Chem* (2014); 57(16): 6949-6964.
- Lane HA, Beuvink I, Motoyama AB, Daly JM, Neve RM and Hynes NE. ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol Cell Biol* (2000); 20(9): 3210-3223.
- Lapenna S and Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov* (2009); 8(7): 547-566.
- Lemmon MA and Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* (2010); 141(7): 1117-1134.
- Levitzi A and Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* (1995); 267(5205): 1782-1788.
- Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, *et al.* Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res* (2008); 68(22): 9280-9290.
- Li JY, Perry SR, Muniz-Medina V, Wang X, Wetzel LK, Rebelatto MC, *et al.* A Biparatopic HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate Induces Tumor Regression in Primary Models Refractory to or Ineligible for HER2-Targeted Therapy. *Cancer Cell* (2016); 29(1): 117-129.
- Lin A and Rugo HS. The role of trastuzumab in early stage breast cancer: current data and treatment recommendations. *Curr Treat Options Oncol* (2007); 8(1): 47-60.
- Lin NU and Winer EP. Advances in adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women. *J Clin Oncol* (2008); 26(5): 798-805.
- Linggi B and Carpenter G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol* (2006); 16(12): 649-656.
- Liu Y, Zhang X, Han C, Wan G, Huang X, Ivan C, *et al.* TP53 loss creates therapeutic vulnerability in colorectal cancer. *Nature* (2015); 520(7549): 697-701.
- Loganzo F, Sung M and Gerber HP. Mechanisms of Resistance to Antibody-Drug Conjugates. *Mol Cancer Ther* (2016); 15(12): 2825-2834.
- Loganzo F, Tan X, Sung M, Jin G, Myers JS, Melamud E, *et al.* Tumor cells chronically treated with a trastuzumab-maytansinoid antibody-drug conjugate develop varied resistance mechanisms but respond to alternate treatments. *Mol Cancer Ther* (2015); 14(4): 952-963.
- Lopus M, Oroudjev E, Wilson L, Wilhelm S, Widdison W, Chari R, *et al.* Maytansine and cellular metabolites of antibody-maytansinoid conjugates strongly suppress microtubule dynamics by binding to microtubules. *Mol Cancer Ther* (2010); 9(10): 2689-2699.



- Lyon RP, Setter JR, Bovee TD, Doronina SO, Hunter JH, Anderson ME, *et al.* Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates. *Nat Biotechnol* (2014); 32(10): 1059-1062.
- Llort G, Chirivella I, Morales R, Serrano R, Sanchez AB, Teule A, *et al.* SEOM clinical guidelines in Hereditary Breast and ovarian cancer. *Clin Transl Oncol* (2015); 17(12): 956-961.
- Mabuchi S, Kuroda H, Takahashi R and Sasano T. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* (2015); 137(1): 173-179.
- MacMillan CD, Leong HS, Dales DW, Robertson AE, Lewis JD, Chambers AF, *et al.* Stage of breast cancer progression influences cellular response to activation of the WNT/planar cell polarity pathway. *Sci Rep* (2014); 4(6315).
- Mandai M, Hamanishi J, Abiko K, Matsumura N, Baba T and Konishi I. Anti-PD-L1/PD-1 immune therapies in ovarian cancer: basic mechanism and future clinical application. *Int J Clin Oncol* (2016); 21(3): 456-461.
- Mantaj J, Jackson PJ, Rahman KM and Thurston DE. From Anthramycin to Pyrrolobenzodiazepine (PBD)-Containing Antibody-Drug Conjugates (ADCs). *Angew Chem Int Ed Engl* (2017); 56(2): 462-488.
- Massague J and Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* (1993); 62(515-541).
- Massari F, Di Nunno V, Ciccarese C, Graham J, Porta C, Comito F, *et al.* Adjuvant therapy in renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev* (2017); 60(152-157).
- Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, Kurzeder C, Mustea A, Wimberger P, *et al.* The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch Gynecol Obstet* (2016); 293(4): 695-700.
- Menderes G, Bonazzoli E, Bellone S, Black J, Altwerger G, Masserdotti A, *et al.* SYD985, a novel duocarmycin-based HER2-targeting antibody-drug conjugate, shows promising antitumor activity in epithelial ovarian carcinoma with HER2/Neu expression. *Gynecol Oncol* (2017); 146(1): 179-186.
- Moasser MM. Targeting the function of the HER2 oncogene in human cancer therapeutics. *Oncogene* (2007); 26(46): 6577-6592.
- Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE and Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol* (2016); 70(1): 93-105.
- Montero JC, Garcia-Alonso S, Ocana A and Pandiella A. Identification of therapeutic targets in ovarian cancer through active tyrosine kinase profiling. *Oncotarget* (2015); 6(30): 30057-30071.
- Moscattello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, Ramirez G, Gunn G, Zoltick PW, *et al.* Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* (1995); 55(23): 5536-5539.

- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* (1983); 65(1-2): 55-63.
- Motzer RJ, Amato R, Todd M, Hwu WJ, Cohen R, Baselga J, *et al.* Phase II trial of anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 in patients with advanced renal cell carcinoma. *Invest New Drugs* (2003); 21(1): 99-101.
- Motzer RJ, Hudes GR, Ginsberg MS, Baum MS, Harmon CS, Kim ST, *et al.* Phase I/II trial of sunitinib plus gefitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Am J Clin Oncol* (2010); 33(6): 614-618.
- Motzer RJ, Hutson TE, McCann L, Deen K and Choueiri TK. Overall survival in renal-cell carcinoma with pazopanib versus sunitinib. *N Engl J Med* (2014); 370(18): 1769-1770.
- Mydlo JH, Michaeli J, Cordon-Cardo C, Goldenberg AS, Heston WD and Fair WR. Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA in neoplastic and nonneoplastic human kidney tissue. *Cancer Res* (1989); 49(12): 3407-3411.
- Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, *et al.* PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* (2004); 6(2): 117-127.
- Nagy P, Friedlander E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J, *et al.* Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* (2005); 65(2): 473-482.
- Nakada T, Masuda T, Naito H, Yoshida M, Ashida S, Morita K, *et al.* Novel antibody drug conjugates containing exatecan derivative-based cytotoxic payloads. *Bioorg Med Chem Lett* (2016); 26(6): 1542-1545.
- Nath N, Godat B, Zimprich C, Dwight SJ, Corona C, McDougall M, *et al.* Homogeneous plate based antibody internalization assay using pH sensor fluorescent dye. *J Immunol Methods* (2016); 431(11-21).
- Nolting B. Linker technologies for antibody-drug conjugates. *Methods Mol Biol* (2013); 1045(71-100).
- Ocana A, Amir E, Seruga B, Martin M and Pandiella A. The evolving landscape of protein kinases in breast cancer: clinical implications. *Cancer Treat Rev* (2013); 39(1): 68-76.
- Ocana A and Pandiella A. Personalized therapies in the cancer "omics" era. *Mol Cancer* (2010); 9(202).
- Ocana A and Pandiella A. Targeting HER receptors in cancer. *Curr Pharm Des* (2013); 19(5): 808-817.
- Ocana A, Vera-Badillo F, Seruga B, Templeton A, Pandiella A and Amir E. HER3 overexpression and survival in solid tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* (2013); 105(4): 266-273.



- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA and Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* (2000); 19(13): 3159-3167.
- Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* (2004); 304(5676): 1497-1500.
- Paik S, Kim C and Wolmark N. HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *N Engl J Med* (2008); 358(13): 1409-1411.
- Pandiella A and Massague J. Cleavage of the membrane precursor for transforming growth factor alpha is a regulated process. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1991); 88(5): 1726-1730.
- Pandiella A and Massague J. Transforming growth factor-alpha. *Biochem Soc Trans* (1991); 19(2): 259-262.
- Pao W and Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Cancer* (2010); 10(11): 760-774.
- Pelletier S, Tanguay S, Lee S, Gunaratnam L, Arbour N and Lapointe R. TGF-alpha as a candidate tumor antigen for renal cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* (2009); 58(8): 1207-1218.
- Perez EA, Barrios C, Eiermann W, Toi M, Im YH, Conte P, *et al.* Trastuzumab Emtansine With or Without Pertuzumab Versus Trastuzumab Plus Taxane for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive, Advanced Breast Cancer: Primary Results From the Phase III MARIANNE Study. *J Clin Oncol* (2017); 35(2): 141-148.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* (2000); 406(6797): 747-752.
- Petrides PE, Bock S, Bovens J, Hofmann R and Jakse G. Modulation of pro-epidermal growth factor, pro-transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor gene expression in human renal carcinomas. *Cancer Res* (1990); 50(13): 3934-3939.
- Phillips AC, Boghaert ER, Vaidya KS, Mitten MJ, Norvell S, Falls HD, *et al.* ABT-414, an Antibody-Drug Conjugate Targeting a Tumor-Selective EGFR Epitope. *Mol Cancer Ther* (2016); 15(4): 661-669.
- Phillips GD, Fields CT, Li G, Dowbenko D, Schaefer G, Miller K, *et al.* Dual targeting of HER2-positive cancer with trastuzumab emtansine and pertuzumab: critical role for neuregulin blockade in antitumor response to combination therapy. *Clin Cancer Res* (2014); 20(2): 456-468.
- Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, *et al.* Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993); 90(5): 1746-1750.

- Pradeep S, Kim SW, Wu SY, Nishimura M, Chaluvally-Raghavan P, Miyake T, *et al.* Hematogenous metastasis of ovarian cancer: rethinking mode of spread. *Cancer Cell* (2014); 26(1): 77-91.
- Prat A and Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* (2011); 5(1): 5-23.
- Prewett M, Rothman M, Waksal H, Feldman M, Bander NH and Hicklin DJ. Mouse-human chimeric anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits the growth of human renal cell carcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* (1998); 4(12): 2957-2966.
- Prickett TD, Agrawal NS, Wei X, Yates KE, Lin JC, Wunderlich JR, *et al.* Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nat Genet* (2009); 41(10): 1127-1132.
- Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho JS and Ellis IO. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. *Histopathology* (2008); 52(1): 67-81.
- Ramp U, Reinecke P, Gabbert HE and Gerharz CD. Differential response to transforming growth factor (TGF)-alpha and fibroblast growth factor (FGF) in human renal cell carcinomas of the clear cell and papillary types. *Eur J Cancer* (2000); 36(7): 932-941.
- Reddy KB. Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options. *Curr Oncol* (2011); 18(4): e173-179.
- Riese DJ, 2nd, Gallo RM and Settleman J. Mutational activation of ErbB family receptor tyrosine kinases: insights into mechanisms of signal transduction and tumorigenesis. *Bioessays* (2007); 29(6): 558-565.
- Rios-Luci C, Garcia-Alonso S, Diaz-Rodriguez E, Nadal-Serrano M, Arribas J, Ocana A, *et al.* Resistance to the Antibody-Drug Conjugate T-DM1 Is Based in a Reduction in Lysosomal Proteolytic Activity. *Cancer Res* (2017); 77(17): 4639-4651.
- Rodriguez-Arribas M, Yakhine-Diop SM, Gonzalez-Polo RA, Niso-Santano M and Fuentes JM. Turnover of Lipidated LC3 and Autophagic Cargoes in Mammalian Cells. *Methods Enzymol* (2017); 587(55-70).
- Rowinsky EK, Schwartz GH, Gollob JA, Thompson JA, Vogelzang NJ, Figlin R, *et al.* Safety, pharmacokinetics, and activity of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in patients with metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol* (2004); 22(15): 3003-3015.
- Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, *et al.* Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* (1998); 90(11): 824-832.
- Sabbaghi M, Gil-Gomez G, Guardia C, Servitja S, Arpi O, Garcia-Alonso S, *et al.* Defective Cyclin B1 Induction in Trastuzumab-emtansine (T-DM1) Acquired Resistance in HER2-positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res* (2017); 23(22): 7006-7019.

- Sanchez-Martin M and Pandiella A. Differential action of small molecule HER kinase inhibitors on receptor heterodimerization: therapeutic implications. *Int J Cancer* (2012); 131(1): 244-252.
- Santaballa A, Barretina P, Casado A, Garcia Y, Gonzalez-Martin A, Guerra E, *et al.* SEOM Clinical Guideline in ovarian cancer (2016). *Clin Transl Oncol* (2016); 18(12): 1206-1212.
- Sargent ER, Gomella LG, Wade TP, Ewing MW, Kasid A and Linehan WM. Expression of mRNA for transforming growth factors-alpha and -beta and secretion of transforming growth factor-beta by renal cell carcinoma cell lines. *Cancer Commun* (1989); 1(5): 317-322.
- Sasaki T, Nakamura T, Rebhun RB, Cheng H, Hale KS, Tsan RZ, *et al.* Modification of the primary tumor microenvironment by transforming growth factor alpha-epidermal growth factor receptor signaling promotes metastasis in an orthotopic colon cancer model. *Am J Pathol* (2008); 173(1): 205-216.
- Sato JD, Kawamoto T, Le AD, Mendelsohn J, Polikoff J and Sato GH. Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Med* (1983); 1(5): 511-529.
- Scaltriti M and Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* (2006); 12(18): 5268-5272.
- Scaltriti M, Rojo F, Ocana A, Anido J, Guzman M, Cortes J, *et al.* Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* (2007); 99(8): 628-638.
- Schlessinger J. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science* (2004); 306(5701): 1506-1507.
- Schneider CA, Rasband WS and Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* (2012); 9(7): 671-675.
- Schultz ML, Tecedor L, Chang M and Davidson BL. Clarifying lysosomal storage diseases. *Trends Neurosci* (2011); 34(8): 401-410.
- Senter PD and Sievers EL. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nat Biotechnol* (2012); 30(7): 631-637.
- Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T, *et al.* Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* (2013); 31(27): 3327-3334.
- Shfet-Carasso L and Benhar I. Antibody-targeted drugs and drug resistance--challenges and solutions. *Drug Resist Updat* (2015); 18(36-46).
- Sheng Q, Liu X, Fleming E, Yuan K, Piao H, Chen J, *et al.* An activated ErbB3/NRG1 autocrine loop supports in vivo proliferation in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* (2010); 17(3): 298-310.
- Sims AH, Zweemer AJ, Nagumo Y, Faratian D, Muir M, Dodds M, *et al.* Defining the molecular response to trastuzumab, pertuzumab and combination therapy in ovarian cancer. *Br J Cancer* (2012); 106(11): 1779-1789.

- Singh AB and Harris RC. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal* (2005); 17(10): 1183-1193.
- Singh B, Bogatcheva G, Washington MK and Coffey RJ. Transformation of polarized epithelial cells by apical mistrafficking of epiregulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013); 110(22): 8960-8965.
- Singh B and Coffey RJ. From wavy hair to naked proteins: the role of transforming growth factor alpha in health and disease. *Semin Cell Dev Biol* (2014); 28(12-21).
- Singh B and Coffey RJ. Trafficking of epidermal growth factor receptor ligands in polarized epithelial cells. *Annu Rev Physiol* (2014); 76(275-300).
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A and McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* (1987); 235(4785): 177-182.
- Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM and Fox JA. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* (1999); 26(4 Suppl 12): 60-70.
- Sorkin A and Goh LK. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res* (2008); 314(17): 3093-3106.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001); 98(19): 10869-10874.
- Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, *et al.* Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics* (2006); 7(127).
- Srigley JR, Delahunt B, Eble JN, Egevad L, Epstein JI, Grignon D, *et al.* The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *Am J Surg Pathol* (2013); 37(10): 1469-1489.
- Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD and Collins VP. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990); 87(21): 8602-8606.
- Sung M, Tan X, Lu B, Golas J, Hosselet C, Wang F, *et al.* Caveolae-mediated endocytosis as a novel mechanism of resistance to trastuzumab emtansine (T-DM1). *Mol Cancer Ther* (2017);
- Takegawa N, Nonagase Y, Yonesaka K, Sakai K, Maenishi O, Ogitani Y, *et al.* DS-8201a, a new HER2-targeting antibody-drug conjugate incorporating a novel DNA topoisomerase I inhibitor, overcomes HER2-positive gastric cancer T-DM1 resistance. *Int J Cancer* (2017); 141(8): 1682-1689.
- Taylor C, Hershman D, Shah N, Suci-Foca N, Petrylak DP, Taub R, *et al.* Augmented HER-2 specific immunity during treatment with trastuzumab and chemotherapy. *Clin Cancer Res* (2007); 13(17): 5133-5143.
- Tebbutt N, Pedersen MW and Johns TG. Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy. *Nat Rev Cancer* (2013); 13(9): 663-673.

- Teixido J, Wong ST, Lee DC and Massague J. Generation of transforming growth factor-alpha from the cell surface by an O-glycosylation-independent multistep process. *J Biol Chem* (1990); 265(11): 6410-6415.
- Thomas A, Teicher BA and Hassan R. Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Lancet Oncol* (2016); 17(6): e254-e262.
- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* (2012); 366(26): 2443-2454.
- Trudeau KM, Colby AH, Zeng J, Las G, Feng JH, Grinstaff MW, *et al.* Lysosome acidification by photoactivated nanoparticles restores autophagy under lipotoxicity. *J Cell Biol* (2016); 214(1): 25-34.
- Tsuchikama K and An Z. Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein Cell* (2016);
- Tuefferd M, Couturier J, Penault-Llorca F, Vincent-Salomon A, Broet P, Guastalla JP, *et al.* HER2 status in ovarian carcinomas: a multicenter GINECO study of 320 patients. *PLoS One* (2007); 2(11): e1138.
- Uhlman DL, Nguyen P, Manivel JC, Zhang G, Hagen K, Fraley E, *et al.* Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in papillary and nonpapillary renal cell carcinoma: correlation with metastatic behavior and prognosis. *Clin Cancer Res* (1995); 1(8): 913-920.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, *et al.* Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* (2012); 40(15): e115.
- Ursu O, Holmes J, Knockel J, Bologna CG, Yang JJ, Mathias SL, *et al.* DrugCentral: online drug compendium. *Nucleic Acids Res* (2017); 45(D1): D932-D939.
- Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, *et al.* Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* (2009); 360(14): 1408-1417.
- van der Lee MM, Groothuis PG, Ubink R, van der Vleuten MA, van Achterberg TA, Loosveld EM, *et al.* The Preclinical Profile of the Duocarmycin-Based HER2-Targeting ADC SYD985 Predicts for Clinical Benefit in Low HER2-Expressing Breast Cancers. *Mol Cancer Ther* (2015); 14(3): 692-703.
- Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, *et al.* Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* (2012); 367(19): 1783-1791.
- Vezina HE, Cotreau M, Han TH and Gupta M. Antibody-Drug Conjugates as Cancer Therapeutics: Past, Present, and Future. *J Clin Pharmacol* (2017); 57 Suppl 10(S11-S25).
- Vicario R, Peg V, Morancho B, Zacarias-Fluck M, Zhang J, Martinez-Barriocanal A, *et al.* Patterns of HER2 Gene Amplification and Response to Anti-HER2 Therapies. *PLoS One* (2015); 10(6): e0129876.

- Wang X, Mathieu M and Brezski RJ. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell* (2017);
- Weber KL, Doucet M, Price JE, Baker C, Kim SJ and Fidler IJ. Blockade of epidermal growth factor receptor signaling leads to inhibition of renal cell carcinoma growth in the bone of nude mice. *Cancer Res* (2003); 63(11): 2940-2947.
- Wiley HS. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp Cell Res* (2003); 284(1): 78-88.
- Wilson TR, Lee DY, Berry L, Shames DS and Settleman J. Neuregulin-1-mediated autocrine signaling underlies sensitivity to HER2 kinase inhibitors in a subset of human cancers. *Cancer Cell* (2011); 20(2): 158-172.
- Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, Cooke TG and Bartlett JM. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol* (2003); 200(3): 290-297.
- Wu X, Rubin M, Fan Z, DeBlasio T, Soos T, Koff A, *et al.* Involvement of p27KIP1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene* (1996); 12(7): 1397-1403.
- Yap TA, Carden CP and Kaye SB. Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer. *Nat Rev Cancer* (2009); 9(3): 167-181.
- Yarden Y and Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2001); 2(2): 127-137.
- Yu H and Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* (2004); 4(2): 97-105.
- Yu M, Ocana A and Tannock IF. Reversal of ATP-binding cassette drug transporter activity to modulate chemoresistance: why has it failed to provide clinical benefit? *Cancer Metastasis Rev* (2013); 32(1-2): 211-227.
- Zhou W and Carpenter G. Heregulin-dependent trafficking and cleavage of ErbB-4. *J Biol Chem* (2000); 275(44): 34737-34743.
- Zhu X, Cai H, Zhao L, Ning L and Lang J. CAR-T cell therapy in ovarian cancer: from the bench to the bedside. *Oncotarget* (2017); 8(38): 64607-64621.
- Zou W and Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* (2008); 8(6): 467-477.

# **FINANCIACIÓN**





## **Financiación**

El trabajo de Tesis Doctoral titulado “Anticuerpos conjugados a fármacos frente a receptores ERBB: nuevas indicaciones y mecanismos de resistencia” ha sido realizado por Sara García Alonso 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 un contrato predoctoral (BES-2013-065223) del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). Esta beca está asociada a un proyecto de investigación concedido al Dr. Atanasio Pandiella (director de este trabajo) por el MINECO (BFU2015-71371-R).

También han colaborado en este trabajo el Instituto de Biomedicina de Salamanca (IBSAL), la Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), la Junta de Castilla y León, el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y la Fundación CRIS. El trabajo desarrollado en el laboratorio del Dr. Atanasio Pandiella recibe apoyo adicional de la Comunidad Europea, a través del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Durante los 3 primeros meses de su estancia en el laboratorio, Sara García Alonso fue contratada a través de un proyecto de investigación financiado por la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC).



# **AGRADECIMIENTOS**



## Agradecimientos

Estos años en Salamanca han constituido una etapa apasionante de aprendizaje científico y crecimiento personal. Por eso quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que han hecho posible el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

A APA, por darme la oportunidad e incorporarme a tu laboratorio; por guiarme y ayudarme a crecer como investigadora; por toda la confianza que has depositado en mí; por tratar siempre de compartir tus conocimientos y experiencias conmigo, alentándome a aprender el máximo posible. Pues bien, puedo afirmar que lo que he aprendido en estos años es inestimable. Muchas gracias.

A todos mis compañeros del laboratorio: Juan Carlos, por ser una parte importante de este trabajo y por ayudarme en mis primeros pasos en el L15. Carla, porque no puedo estar más orgullosa del trabajo que realizamos juntas, por todo tu apoyo y consejos, por todas las conversaciones de camino a casa, por tantos momentos divertidos y por demostrarme que siempre puedo contar contigo. Elena, por tu contribución a este trabajo y tus correcciones, tus consejos y por el tiempo que compartimos juntas. Azu, por toda tu ayuda con el proyecto de riñón y por decir siempre lo que piensas. A los que han estado desde el principio: Anita, Ari, Adri y Yolanda, por estar siempre dispuestos a ayudar, tener una actitud tan buena incluso en momentos difíciles en el laboratorio y por todo el tiempo que hemos compartido. A los que han llegado ahora: Patri, Laura, Lucía, Javi, Jorge, Laura, Álex e Idoia, por su buena predisposición y buen humor. A todos os deseo mucha ilusión y suerte en la etapa emprendida.

A todas las personas del Centro de Investigación del Cáncer, que contribuyen al funcionamiento de este lugar y siempre están dispuestas a echar una mano. Me siento una privilegiada por haber desarrollado la Tesis Doctoral en este centro.

A Ángel, María y Ana, del Servicio de Microscopía, por las fotos que están incluidas en este trabajo y por derrochar simpatía en todas las sesiones de confocal.

A Mar Abad y Ruth, del IBSAL, por toda la dedicación y ayuda con las muestras de riñón.

A mis chicas (y antiguas compañeras del lab), por todo lo que hemos compartido, por todas las risas, viajes y buenos momentos: Vir, por tu cariño, tu apoyo y tu ayuda incondicionales. Eli, por tu ilusión y ser un auténtico ejemplo de esfuerzo y superación continua. Flori, por tu autenticidad y tu forma de ver el mundo.

A Silvia, porque tu forma de trabajar y desenvolverte siempre ha sido y será una fuente de inspiración, por todos los buenos momentos que compartimos durante la carrera (y después) y por haber sacado tiempo (aún estando hasta arriba) para ayudarme con la tesis.

A mi familia, por vuestro enorme cariño y apoyo.

A mis padres, porque sois dos personas admirables. Gracias por haberme apoyado siempre, por escucharme, mimarme, empujarme a perseguir mis sueños y convencerme de que puedo conseguir todo lo que me proponga.

A Mario. No hay suficiente espacio para expresar todo lo que te agradecería así que lo resumiré. Gracias por ser el responsable de que estos años hayan sido los más dulces y felices que podría soñar. Gracias por ser el autor de la banda sonora de mi vida.