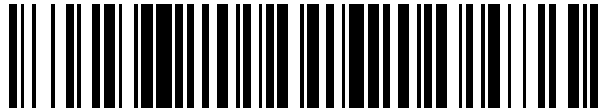


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 152**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/08** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2008 E 08726810 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2134854**

54 Título: **Método de tratamiento que emplea anticuerpos de EGFR e inhibidores de Src y formulaciones relacionadas**

30 Prioridad:

**15.03.2007 US 918084 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**31.07.2015**

73 Titular/es:

**LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH  
LTD. (100.0%)  
605 Third Avenue  
New York, NY 10158, US**

72 Inventor/es:

**CAVENEY, WEBSTER;  
FURNARI, FRANK;  
JOHNS, TERRANCE, GRANT y  
SCOTT, ANDREW**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 542 152 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método de tratamiento que emplea anticuerpos de EGFR e inhibidores de Src y formulaciones relacionadas

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere una combinación de anticuerpo mAb806 o un fragmento del mismo que se une a antígeno y dasatinib para uso en el tratamiento del cáncer.

**Antecedentes de la invención**

10 La terapia dirigida contra el cáncer está diseñada para alterar la función de moléculas específicas necesarias para la carcinogénesis y el crecimiento tumoral y, por lo tanto, destruir las células cancerígenas o impedir su crecimiento (Ji H et al., (2006) Cell Cycle 5(18):2072-2076 Epub 15 de Sep 2006). A diferencia de la quimioterapia citotóxica convencional, tales terapias dirigidas contra el cáncer pueden ser más eficaces y menos perjudiciales para las células normales. Un esfuerzo principal en el campo de la terapia dirigida contra el cáncer ha sido el desarrollo de agentes que se dirigen al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El EGFR es un miembro de la familia ErbB de receptores estrechamente relacionados que incluye EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3) y Her4 (ErbB-4). La activación de EGFR conduce a la activación del receptor tirosina cinasa y una serie de eventos de señalización aguas abajo que median en la proliferación celular, la motilidad, la adhesión, la invasión y la resistencia a la quimioterapia, así como a la inhibición de la apoptosis, procesos que son cruciales para la proliferación continua y la supervivencia de las células cancerígenas.

20 Como la expresión del receptor mutante EGFR vIII está restringida a las células tumorales, representa una diana altamente específica para la terapia con anticuerpos. En consecuencia, se han generado anticuerpos policlonales y monoclonales específicos del péptido único de EGFR de2-7. Una serie de mAbs (anticuerpos monoclonales, del inglés monoclonal antibodies) de ratón, aislados después de la inmunización con el péptido de2-7 único, mostraron selectividad y especificidad hacia el receptor truncado y se dirigieron a xenoinjertos positivos para EGFR de2-7, cultivados en ratones sin pelo (Wikstrand CJ et al., (1995) Cancer Res 55:3140-3148; Okamoto, S et al., (1996) Br J Cancer 73:1366-1372; Hills D et al., (1995) Int J Cancer 63:537-543; Reist CJ et al., (1997) Cancer Res 57:1510-1515; Reist CJ et al., (1995) Cancer Res 55:4375-4382; documento de Patente de EE.UU. 5.401.828). Ejemplos de anticuerpos anti-EGFR vIII incluyen ABX-EGF (panitumumab), DH8.3, L8A.4 e Y10.

30 El mAb806 es un nuevo anticuerpo murino, obtenido originalmente para reconocer el mutante de truncamiento único, EGFRvIII, utilizando células completas que expresaban un mutante EGFRvIII como inmunógeno. Es importante destacar que el epítipo reconocido por mAb806 no es accesible en el EGFR de tipo silvestre (wt, del inglés, wild type) inactivo pero está expuesto en una forma transitoria de EGFR wt en células con hiperexpresión de EGFR, y expresión de EGFRvIII. El mAb806 se une a un epítipo presente o disponible en el mutante EGFRvIII/EGFR Δ2-7, pero reconoce un epítipo distinto al péptido de unión del mutante LEEKKGNVYVTDH. Los estudios de epítopos están apoyados por estudios inmunohistoquímicos que demuestran que el anticuerpo 806 se une a epítopos presentes en gliomas, así como a una amplia gama de cánceres epiteliales, pero no a tejidos humanos normales. Estos y otros datos preclínicos sugieren que mAb806 podría tener un espectro de actividad clínica diferente y un perfil de efectos secundarios distinto de cetuximab y de otros anticuerpos anti-EGFR. En modelos de xenoinjertos, mAb806 ha mostrado una actividad antitumoral potente sin dirigirse a los tejidos normales. Por lo tanto, la capacidad única de direccionamiento de mAb806 representa un nuevo paradigma para la terapia dirigida molecularmente, específica del cáncer. La combinación del inhibidor de la tirosina cinasa EGFR, AG1478, con mAb806 ha mostrado una sinergia terapéutica en un modelo de xenoinjerto (Gan et al. (2007) J Biol Chem 282(5): 2840-2850).

40 La proteína tirosina no receptora, Src, es una proteína de 60 kDa que es un miembro de una familia de nueve genes, que incluyen Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Hck, Fgr, Blk y Yrk, que tiene un papel decisivo en la regulación de muchos procesos celulares, tales como la proliferación, la diferenciación, la migración, la adhesión, la invasión, la angiogénesis y la función inmune (Yeatman TJ (2004) Nat Rev Cancer 4(6): 470-80; Frame MC. (2004) J Cell Sci 117: 989-98). La cinasa de la familia Src contiene un dominio poco conservado y tres dominios conservados de homología con Src: SH2, SH3 y SH1 o dominio de proteína tirosina cinasa. Para la regulación de Src es decisiva una tirosina COOH-terminal (Y530) que, cuando está fosforilada por la cinasa Src C-terminal (Csk), conduce a una conformación de Src más inactiva. Src interacciona con muchas proteínas, dependiendo de la señal de entrada. Además asume su conformación activa a través de la desfosforilación de Y530 y la autofosforilación de Y418. Src también se asocia con proteínas estructurales y de señalización, y los complejos resultantes son decisivos para el papel de Src en diversos procesos celulares. Se ha informado de que Src se hiperexpresa o se activa de forma aberrante en una variedad de cánceres, tales como de colon, de mama, melanomas, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cánceres de cerebro y cánceres hematológicos (Dehm SM y Bonham K (2004) Biochem Cell Biol 2004; 82: 263-74). Existen diversos inhibidores de molécula pequeña de src conocidos y algunos han entrado en la fase de ensayos clínicos, por ejemplo dasatinib (BMS354825), AZD-0530, SKI-606, PP1 (4-amino-5-(4-metilfenil)-7-(*t*-butil)pirazolo[3,4-*d*]-pirimidina), PP2 (4-clorofenil)-7-(*t*-butil)pirazolo[3,4-*d*]-pirimidina), PD166326. Se ha observado que la combinación de dasatinib y cetuximab es sinérgica *in vitro* (Kopetz et al. Gastrointestinal Cancers Symposium 2007, resumen nº 406).

Existe una necesidad clínica de protocolos de tratamiento mejorados más eficaces y más efectivos en general contra la enfermedad mediada por EGFR, incluyendo el cáncer.

La cita de referencias en el presente documento no se interpretará como una admisión de que éstas se consideran técnica anterior de la presente invención.

## 5 Compendio de la invención

La invención se refiere al descubrimiento de que la alteración de la expresión o la actividad de src mejora la eficacia de las terapias anti-EGFR. En particular, una alteración de la expresión o la actividad de src mejora drásticamente la eficacia de los anticuerpos anti-EGFR, particularmente la actividad del anticuerpo mAb806.

10 Basándose en la descripción contenida en esta memoria, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-EGFR para uso en un método de tratamiento del cáncer en un mamífero, en donde dicho método comprende administrar a dicho mamífero, dicho anticuerpo anti-EGFR y un inhibidor de src, en donde dicho inhibidor de src y dicho anticuerpo anti-EGFR se administran simultáneamente en combinación o uno después de otro en serie, y en donde dicho anticuerpo anti-EGFR es mAb806 o un fragmento del mismo que se une a antígeno, y en donde dicho inhibidor de src es dasatinib.

15 En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un inhibidor de src para uso en un método de tratamiento del cáncer en un mamífero, en donde dicho método comprende administrar dicho inhibidor de src y un anticuerpo anti-EGFR a dicho mamífero, en donde dicho inhibidor de src y dicho anticuerpo anti-EGFR se administran simultáneamente, en combinación o uno después de otro en serie, y en donde dicho anticuerpo anti-EGFR es mAb806 o un fragmento del mismo que se une a antígeno, y en donde dicho inhibidor de src es dasatinib.

20 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-EGFR y al menos un inhibidor de src en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en donde dicho anticuerpo anti-EGFR es mAb806 o un fragmento del mismo que se une a antígeno, y en donde dicho inhibidor de src es dasatinib.

La presente invención y realizaciones de la misma se describen en las reivindicaciones adjuntas.

25 mAb806 incluye un anticuerpo murino, un anticuerpo recombinante o un anticuerpo humanizado.

El cáncer mediado por EGFR se puede seleccionar entre glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer del sistema nervioso, cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer genitourinario y cáncer de vejiga. El cáncer se puede seleccionar adicionalmente a partir de cáncer de colon, de mama, melanomas, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cánceres cerebrales y cánceres hematológicos. En particular, el

30 cáncer puede ser un glioma.

En una realización, el método comprende bloquear o reducir el crecimiento tumoral de un cáncer mediado por EGFR en un mamífero.

35 Otros objetos y ventajas serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la siguiente descripción que continúa haciendo referencia a los siguientes dibujos ilustrativos.

### Breve descripción de los dibujos

40 FIGURA 1. **Representación esquemática del EGFR.** La región extracelular delecionada en EGFR de2-7 se identifica por paréntesis. La versión sin actividad cinasa del EGFR de2-7 contiene una única mutación puntual (K→M) en la posición 721. La versión DY2 del EGFR de2-7 tiene mutaciones Y→F en los residuos 1068 y 1173, mientras que la variante DY5 también tiene estas sustituciones, más 992, 1086 y 1148.

45 FIGURA 2. **Sensibilidad de diferentes xenoinjertos frente a anticuerpos específicos de EGFR.** Los xenoinjertos se establecieron mediante la inyección de  $3 \times 10^6$  células en ambos flancos de ratones BALB/c sin pelo. La terapia con anticuerpos comenzó cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen medio aproximado de  $100 \text{ mm}^3$ . Los ratones fueron tratados con 1 mg de mAb 528 (panel izquierdo) o mAb 806 (panel derecho) tres veces por semana durante dos semanas (es decir, un total de 6 inyecciones). Los datos se expresan como el volumen tumoral medio  $\pm$  SE.

50 FIGURA 3. **Curvas de crecimiento de xenoinjertos para líneas celulares basadas en U87MG.** Los xenoinjertos se establecieron mediante una inyección de  $1 \times 10^6$  células en ambos flancos de ratones BALB/c sin pelo con el fin de determinar las curvas de crecimiento. Los datos se expresan como el volumen tumoral medio  $\pm$  SE.

FIGURA 4A y 4B. **Fosforilación *in vitro* de variantes EGFR de2-7 en células U87MG.Δ2-7, U87MG.DK y U87MG.DY5.** A, la proteína EGFR de2-7 se inmunoprecipitó con mAb 806, mAb 528 o un anticuerpo control emparejado con un isotipo irrelevante y las muestras resultantes se inmunotransfirieron. Todas las variantes

EGFR de2-7 eran positivas para la fosforilación en Y1045, el sitio principal asociado con la ubiquitinación y la degradación (panel superior). Mientras que el EGFR de2-7 estaba fosforilado de forma constitutiva en la posición Y1173, tanto las variantes DK como DY5 eran negativas para la fosforilación en este sitio, tal y como se esperaba (panel central). La presencia de EGFR se confirmó usando el anticuerpo policlonal de conejo C-terminal para EGFR (panel inferior). Este anticuerpo C-terminal no reconocía la variante DY5 porque contiene una mutación Y1068F, que se presenta como un residuo decisivo para la unión de anticuerpos. Por tanto, la presencia de la proteína DY5 completa se confirmó en (B) mediante inmunotransferencia con mAb 806.

**FIGURA 5A-5D. Expresión de células U87MG que expresan niveles elevados de EGFR de2-7.** Las células U87MG.Δ2-7 se clasificaron por FACS en poblaciones de expresión baja (L), media (M) y alta (H). **A**, las células se lisaron después de 36 h de privación de suero y se analizaron mediante inmunotransferencia para estudiar la expresión de de2-7 (C13) y la fosforilación de tirosina (4G10) del EGFR de2-7. Los niveles de fosforilación se correlacionaban con EGFR de2-7. **B**, xenoinjertos de U87MG parental, U87MG-L, U87MG-M y U87MG-H se establecieron mediante la inyección de  $1 \times 10^6$  células en ambos flancos de ratones BALB/c sin pelo, con el fin de determinar las curvas de crecimiento. Los datos se expresan como volumen tumoral medio  $\pm$  SE. **C**, los tumores procedentes de (B) se analizaron mediante inmunotransferencia para estudiar la expresión de EGFR de2-7 (C13). **D**, ratones con xenoinjertos U87MG-H se trataron con 1 mg de mAb 528 o mAb 806 tres veces por semana durante dos semanas (días 4, 6, 8, 11, 13 y 15). Los datos se expresan como el volumen tumoral medio  $\pm$  SE.

**FIGURA 6A-6C. Tratamiento de xenoinjertos NR6.Δ2-7 con anticuerpos específicos de EGFR.** Los xenoinjertos se establecieron mediante la inyección de  $3 \times 10^6$  células en ambos flancos de ratones BALB/c sin pelo. La terapia con anticuerpos comenzó cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen medio aproximado de  $100 \text{ mm}^3$ . Los ratones se trataron con 1 mg de mAb 806 (**A**) o mAb 528 (**B**) tres veces por semana durante dos semanas (días 22, 25, 29, 32, 36 y 39) o con mAb 528 (**C**) dos veces por semana durante tres semanas (días 27, 30, 34, 37, 41 y 44). Los datos se expresan como volumen tumoral medio  $\pm$  SE.

**Figura 7A-7C. Interacción entre EGFR de2-7 y Src.** (**A**) Las células fueron privadas de suero durante la noche antes del tratamiento con PP1 o PP2 o vehículo (DMSO)  $10 \mu\text{M}$  durante 30 minutos o 24 h antes de la inmunoprecipitación con mAb528, mAb806 o un control con isotipo irrelevante. La inmunotransferencia se realizó con un anticuerpo específico de Y845 del EGFR, mientras que el EGFR de2-7 completo se visualizó con el anticuerpo policlonal C-terminal de conejo. Los resultados mostrados son representativos de cuatro experimentos independientes. (**B**) Xenoinjertos control U87MG.Δ2-7<sub>vector</sub> y U87MG.Δ2-7<sub>DNSrc</sub> se establecieron mediante la inyección de  $1 \times 10^6$  células en ambos flancos de ratones BALB/c sin pelo con el fin de determinar las curvas de crecimiento. Los datos se expresan como el volumen tumoral medio  $\pm$  SE. (**C**) Xenoinjertos U87MG.Δ2-7<sub>DNSrc</sub> se establecieron mediante la inyección de  $3 \times 10^6$  células en ambos flancos de ratones BALB/c sin pelo. La terapia con anticuerpos comenzó cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen medio aproximado de  $100 \text{ mm}^3$ . Los ratones fueron tratados con 1 mg de mAb 806 tres veces por semana durante dos semanas (días 18, 20, 22, 25, 27 y 29). Los datos se expresan como volumen tumoral medio  $\pm$  SE.

**FIGURA 8A y 8B. Colocalización de mAb 806-Cy3 y EEA1 o Igp-120 internalizados en células U87MG.Δ2-7.** (**A**) Las células sembradas en cubreobjetos de vidrio se incubaron previamente con mAb 806-Cy3 (rojo) a  $4^\circ\text{C}$  (0 min). La internalización fue estimulada mediante incubación a  $37^\circ\text{C}$  durante 10, 20 y 30 minutos. Las células se fijaron y se permeabilizaron, después se tiñeron con anti-EEA1 seguido de anticuerpo de burro anti-ratón conjugado con Cy2 (verde). La colocalización se indica en amarillo en las imágenes fusionadas (flechas). Barra de escala =  $20 \mu\text{m}$ . (**B**) Las células se transfectaron de forma transitoria con Igp-120 marcado con GFP (Igp-120-GFP; verde). Las células positivas para la transfección se muestran en el panel Igp-120-GFP y por puntas de flecha verdes. Después de la transfección, las células se incubaron con mAb 806-Cy3 a  $4^\circ\text{C}$  (rojo; 0 min), antes de la inducción de la internalización mediante la incubación a  $37^\circ\text{C}$  durante 30, 60 y 120 min. Las muestras se fijaron posteriormente y la colocalización del mAb 806-Cy3 y Igp-120-GFP se indica por la presencia de imágenes fusionadas en amarillo (flechas blancas). Barra de escala =  $10 \mu\text{m}$ .

**FIGURA 9A-9F. Análisis con microscopio electrónico de la endocitosis mediada con clatrina y tráfico intracelular de mAb 806 después de la unión a EGFR de2-7 en células U87MG.Δ2-7.** Partículas de oro (mAb 806-Au; puntas de flecha) se detectaron fácilmente en cavidades revestidas con clatrina (**A-B**) y vesículas (**C**) después de la inducción de la internalización durante 5 minutos. Ninguna partícula de oro estaba presente en las estructuras que se asemejan a caveolas (puntas de flecha blancas) (**D**). Pasados 10-15 minutos de la internalización, las partículas de oro se detectaron en estructuras vesiculares tubulares que se asemejan a los endosomas tempranos (**E**). Después de períodos de internalización más largos, se observaron partículas de oro en los cuerpos multivesiculares (**F**). Barra de escala =  $100 \text{ nm}$ .

**FIGURA 10. Internalización de mAb 806 y mAb 528 en células NR6.Δ2-7.** Las células se preincubaron con mAb 806-Cy3 (panel izquierdo) o mAb 528-Cy3 (panel derecho) a  $4^\circ\text{C}$  (0 min), antes de la incubación a  $37^\circ\text{C}$  durante períodos de tiempo variables para inducir la internalización. Se muestran imágenes que representan 15, 30 y 60 minutos de incubación a  $37^\circ\text{C}$ . La tinción con ambos anticuerpos antes de la internalización se asoció con uniones de membrana entre las células (punta de flecha azul) y adhesiones focales (punta de flecha roja), mientras que algunas células mostraron muy poca tinción de membrana (punta de flecha

*amarilla*). Un anticuerpo internalizado en momentos posteriores, se indica con flechas blancas. Barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ .

FIGURA 11. **Representación esquemática de la interacción de las variantes EGFR de2-7 con otros componentes celulares.** El EGFR de2-7 tiene una cinasa activa y por lo tanto se puede autofosforilar, transfosforilar o ser una diana de la fosforilación a través de otras cinasas. Por el contrario, EGFR de2-7 sin actividad cinasa solo puede ser una diana de la fosforilación. Finalmente, la estructura artificial DY5 puede ser una diana de la fosforilación y transfosforilación de otras dianas celulares tales como el EGFR wt. Dado que ambos mAbs 528 y 806 pueden inhibir los xenoinjertos U87MG.DY5 pero no los xenoinjertos U87MG.DK, se sugiere que la capacidad de estos anticuerpos para evitar la fosforilación de otros componentes celulares es decisiva para su actividad antitumoral.

FIGURA 12. **Terapia de xenoinjertos U87MG. $\Delta$ 2-7<sub>src</sub> con mAb 806 y dasatinib solos o en combinación.** Xenoinjertos U87MG. $\Delta$ 2-7<sub>src</sub> se establecieron mediante la inyección de  $1 \times 10^6$  células en ambos flancos de ratones BALB/c sin pelo en terapia, comenzando cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen medio aproximado de 80  $\text{mm}^3$ . Los ratones se trataron con vehículo (DMSO al 4% en  $\text{dH}_2\text{O}$ ), 1 mg de mAb 806 en PBS, 10  $\text{mg}/\text{kg}^{-1}$  de dasatinib en 4% de DMSO en  $\text{dH}_2\text{O}$  o una combinación de ambos, tres veces por semana durante dos semanas, en los días indicados. Los datos se expresan como el volumen tumoral medio  $\pm$  SE. El día 33, el grupo tratado con la combinación era significativamente menor que el grupo tratado con mAb 806 solo ( $p < 0,0076$ ).

FIGURA 13. **Terapia de xenoinjertos U87MG. $\Delta$ 2-7<sub>src</sub> con mAb 806 y dasatinib solos o en combinación.** Los datos del experimento anterior se transformaron en curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y se analizaron mediante análisis de Wilcoxon, usando criterios de valoración duales de ratón moribundo o con un volumen tumoral  $>1500 \text{mm}^3$ . El grupo de la combinación sobrevivió más tiempo que otros grupos. Log Rank  $p < 0,0001$ .

#### Descripción detallada

De acuerdo con la presente invención, se pueden emplear técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y de ADN recombinante, según el estado de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" volúmenes I-III [Ausubel, R. M., compilador (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" volúmenes I-III [J. E. Celis, compilador (1994)]; "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III [Coligan, J. E., compilador (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, compilador 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B.D. Hames & S.J. Higgins compiladores (1985)]; "Transcription And Translation" [B.D. Hames & S.J. Higgins, compiladores (1984)]; "Animal Cell Culture" [R.I. Freshney, compilador (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984).

Por lo tanto, si aparecen en el presente documento, los siguientes términos tendrán las definiciones que figuran a continuación.

El término "anticuerpo" describe una inmunoglobulina producida de modo natural o parcial o totalmente sintética. Anticuerpo incluye cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se une a un epítipo específico. El término incluye anticuerpos policlonales, monoclonales, recombinantes, humanizados y quiméricos. El término también cubre cualquier polipéptido o proteína que tiene un dominio de unión que es un dominio de unión a anticuerpo o a un homólogo del mismo. Anticuerpos con injertos de CDR también están contemplados en este término.

Como los anticuerpos se pueden modificar según una variedad de maneras, el término "anticuerpo" debe interpretarse como que cubre cualquier miembro o sustancia de unión específica que tenga un dominio de unión con la especificidad requerida. Por lo tanto, este término incluye fragmentos de anticuerpo, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión de inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por lo tanto, las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o un equivalente, fusionado con otro polipéptido están incluidas. La clonación y la expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023 y las patentes de EE.UU. n° 4.816.397 y 4.816.567.

Se ha mostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de antígenos de unión. Ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un anticuerpo sencillo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)), que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDRs aisladas; (vi) fragmentos  $\text{F}(\text{ab}')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están unidos a través de un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird et al., Science, 242, 423-426, 1988; Huston et al., PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988); (viii) fragmentos de anticuerpo multivalentes (dímeros, trímeros y/o tetrámeros de scFv (Power y Hudson, J Immunol. Methods

242: 193-204 9 (2000)); (ix) dímeros biespecíficos de Fv de cadena sencilla (documento PCT/US92/09965) y (x) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos formados por fusión génica (documento WO94/13804; P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, (1993)).

5 Un "sitio que se combina con anticuerpo" es esa porción estructural de una molécula de anticuerpo compuesta por regiones variables e hipervariables de cadena ligera o de cadena pesada que se unen específicamente al antígeno.

La expresión "molécula de anticuerpo" en sus diversas formas gramaticales, tal y como se usa en este documento, contempla tanto una molécula de inmunoglobulina intacta como una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina.

10 Moléculas de anticuerpo a modo de ejemplo son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y aquellas porciones de una molécula de inmunoglobulina que contienen el paratopo, incluyendo aquellas porciones conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y F(v), cuyas porciones se prefieren para uso en los métodos terapéuticos descritos en esta memoria. Los anticuerpos también pueden ser biespecíficos, en donde un dominio de unión del anticuerpo es un miembro de la invención que se une específicamente, y el otro dominio de unión tiene una especificidad diferente, por ejemplo, para reclutar una función efectora o similar. Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención incluyen cuando un dominio de unión del anticuerpo es un miembro de unión específica de la presente invención, incluyendo un fragmento del mismo, y el otro dominio de unión es un anticuerpo distinto o un fragmento del mismo, incluyendo el de un anticuerpo anti-EGFR distinto, por ejemplo, un anticuerpo 528 (documento de patente de EE.UU. n° 4.943.533), el anticuerpo 225 quimérico y humanizado (documento de patente de EE.UU. n° 4.943.533 y WO/9640210), un anticuerpo anti-de2-7 tal como DH8.3 (Hills, D. et al., (1995) Int. J. Cancer 63(4): 537-543), un anticuerpo L8A4 e Y10 (Reist, CJ et al., (1995) Cancer Res. 55(19): 4375-4382; Foulon CF et al. (2000) Cancer Res. 60(16): 4453-4460), ICR62 (Modjtahedi H et al., (1993) Cell Biophys. Ene-Jun; 22(1-3): 129-46; Modjtahedi et al., (2002) P.A.A.C.R. 55(14): 3140-3148, o el anticuerpo de Wikstrand et al., (Wikstrand C. et al., (1995) Cancer Res. 55(14): 3140-3148). El otro dominio de unión puede ser un anticuerpo que reconoce o se dirige a un tipo de célula particular, como en un anticuerpo específico de una célula neural o glial. En los anticuerpos biespecíficos de la presente invención, el dominio de unión del anticuerpo de la invención se puede combinar con otros dominios de unión o moléculas que reconocen receptores celulares particulares y/o modulan células de una manera particular, como por ejemplo un modulador inmune (por ejemplo, interleucina(s)), un modulador del crecimiento o citocina (por ejemplo, factor de necrosis tumoral (TNF) y, en particular, la modalidad biespecífica de TNF, mostrada en el documento U.S.S.N. 60/355.838 presentado el 13 de febrero 2002 o una toxina (por ejemplo, ricina) o un agente o un factor antimitótico o apoptótico.

35 Las porciones Fab y F(ab')<sub>2</sub> de moléculas de anticuerpo se pueden preparar mediante la reacción proteolítica de papaína y pepsina, respectivamente, sobre moléculas de anticuerpo sustancialmente intactas mediante métodos que son bien conocidos. Véase, por ejemplo, el documento de patente de EE.UU. n° 4.342.566 de Theofilopolous et al. Las porciones de moléculas de anticuerpo Fab' son también bien conocidas y se producen a partir de porciones F(ab')<sub>2</sub> seguidas por la reducción de los enlaces disulfuro que unen las dos porciones de la cadena pesada con mercaptoetanol, seguido por la alquilación de los mercaptanos proteicos resultantes con un reactivo tal como yodoacetamida. En el presente documento se prefiere un anticuerpo que contiene moléculas de anticuerpo intactas.

40 La expresión "anticuerpo monoclonal" en sus diversas formas gramaticales, se refiere a un anticuerpo que tiene solamente un tipo de sitio que se combina con un anticuerpo, capaz de inmunorreaccionar con un antígeno particular. Un anticuerpo monoclonal de este tipo, normalmente muestra una sola afinidad de unión hacia cualquier antígeno con el que inmunorreacciona. Un anticuerpo monoclonal también puede contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación de un anticuerpo, siendo cada uno inmunoespecífico para un antígeno diferente; por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico (quimérico).

45 La expresión "dominio que se une a antígeno" describe la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente y que es complementaria a una parte o a la totalidad de un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo se puede unir solo a una parte particular del antígeno, denominándose dicha parte epítopo. Un dominio de unión a antígeno se puede proporcionar a través de uno o varios dominios variables de anticuerpo. Preferiblemente, un dominio que se une a antígeno comprende una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo (VL) y una región variable de la cadena pesada del anticuerpo (VH).

50 Los términos y expresiones "mAb806", "anticuerpo 806", "anticuerpo monoclonal 806", "ch806", "806 humanizado" y cualquier variante no mencionada específicamente, se pueden utilizar indistintamente en el presente documento, y tal y como se utilizan en la presente solicitud y en las reivindicaciones referidas. Por lo tanto, los anticuerpos, incluyendo anticuerpos recombinantes, quiméricos, modificados genéticamente o alternativos, que muestran una actividad sustancialmente equivalente o alterada, se contemplan igualmente. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, tales como las modificaciones obtenidas a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como las obtenidas a través de mutaciones en hospedadores que son productores del anticuerpo o sus fragmentos. Además, las expresiones "mAb806", "anticuerpo 806", "anticuerpo monoclonal 806", "ch806", "806 humanizado" se entiende que incluyen dentro de su alcance, proteínas e inmunoglobulinas citadas específicamente en este documento y conocidas por el experto en la técnica, conocidas públicamente, así como todos los análogos y variaciones alélicas sustancialmente homólogas. El anticuerpo mAb806 que incluye su generación, actividades parti-

culares, aminoácidos y secuencia de ácido nucleico, dominios de unión a antígeno, secuencias de la región variable, se describe y es conocido por el experto en la técnica, incluyendo lo dispuesto en el documento WO 02/092771; Luwor RB et al., (2001) Cancer Res 61:5355-5361; Mishima K et al., (2001) Cancer Res 61:5349-5354; Johns TG et al., (2002) Int J Cancer 98:398-408; Jungbluth AA et al., (2003) Proc Natl Acad Sci 100(2): 639-644.

- 5 Se debe apreciar que también están dentro del alcance de las composiciones para uso en los métodos de la presente descripción, secuencias de ADN que codifican y/o expresan anticuerpos anti-EGFR eficaces, incluyendo particularmente mAb806 y ch806, que codifican anticuerpos anti-EGFR, dominios de unión a antígeno de los mismos o fragmentos activos de los mismos que tienen la misma secuencia de aminoácidos que el anticuerpo mAb806, tal y como se han descrito públicamente y son conocidos por el experto en la técnica, pero que están degenerados en relación con la(s) secuencia(s) de mAb806 conocida. Por "degenerado en relación con" se entiende que se utiliza un codón de tres letras diferente para especificar un aminoácido particular.

10 La expresión "inhibidor de src" contempla e incluye cualquier modulador que reduce la expresión o la actividad de src, reduce la fosforilación del sitio fosforilado de src, particularmente en EGFR, o reduce la señal de la cascada de cinasa de src. Un modulador puede incluir una entidad química, un péptido, un anticuerpo u otro agente de este tipo, etc. Un modulador puede incluir un inhibidor de cinasa, fosfatasa, etc.

15 Existen varios inhibidores de molécula pequeña de src y algunos han entrado en la fase de ensayos clínicos, por ejemplo, dasatinib (BMS354825), AZD-0530, SKI-606, PP1 (4-amino-5-(4-metilfenil)-7-(*t*-butil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidina), PP2 (4-clorofenil)-7-(*t*-butil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidina), PD166326.

20 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen normalmente una reacción adversa alérgica o similar, tal como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano.

25 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se utiliza en esta memoria para significar una cantidad suficiente para prevenir y preferiblemente reducir al menos aproximadamente 20 por ciento, más preferiblemente al menos 30 por ciento, aún más preferiblemente al menos 50 por ciento, más preferiblemente al menos 70 por ciento, más preferiblemente al menos 90 por ciento, un cambio clínicamente significativo de la actividad en la fase S de una masa celular diana, o un cambio significativo del tamaño o las dimensiones de una masa celular diana o un tumor, u otra característica patológica que pueda acompañar su presencia y actividad.

30 El anticuerpo o el fragmento activo se puede formular en la composición terapéutica como formas de sales farmacéuticamente aceptables neutralizadas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la molécula de polipéptido o de anticuerpo) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas a partir de los grupos carboxilo libres también se pueden obtener a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos, y bases orgánicas de este tipo tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína y similares.

35 El anticuerpo terapéutico o composiciones que contienen fragmentos activos se administran convencionalmente por vía intravenosa, como por ejemplo, mediante inyección de una dosis unitaria. La expresión "dosis unitaria" cuando se utiliza haciendo referencia a una composición terapéutica de la presente invención, se refiere a unidades físicamente discretas, adecuadas como dosificación unitaria para los seres humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido; es decir, el portador o vehículo.

40 Las composiciones se administran de una manera compatible con la dosificación, la formulación, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad que se va a administrar depende del sujeto que se va a tratar, la capacidad del sistema inmune del sujeto para utilizar el ingrediente activo y el grado de inhibición deseado o la extensión de la masa tumoral que va a ser la diana. Las cantidades precisas de ingrediente activo requeridas para ser administradas dependen de la opinión del médico y son peculiares para cada individuo. Sin embargo, las dosificaciones adecuadas pueden variar desde aproximadamente 0,1 a 20, preferiblemente desde aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10, y más preferiblemente de uno a varios miligramos de ingrediente activo por kilogramo de peso corporal del individuo al día y dependen de la vía de administración. Regímenes adecuados para una administración inicial y de refuerzo también son variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una o varias horas, con una inyección posterior u otra administración. Alternativamente, se contempla una infusión intravenosa continua, suficiente para mantener concentraciones desde diez nanomolar hasta diez micromolar en sangre.

45 Tal y como se emplea en la presente memoria, "pg" significa picogramo, "ng" significa nanogramo, "ug" o "µg" significa microgramo, "mg" significa miligramo, "ul" o "µl" significa microlitro, "ml" significa mililitro, "l" significa litro.

50 Por lo tanto, se describen y se obtienen aplicaciones y métodos tanto terapéuticos como de diagnóstico mediante la demostración de la actividad antitumoral del anticuerpo anti-EGFR, particularmente de mAb806. Como se ha sugerido anteriormente y se elabora más adelante en el presente documento, la presente invención contempla el anticuer-

po mAb806 o un fragmento del mismo que se une a antígeno, en combinación con dasatinib para uso en una intervención farmacéutica en la cascada de reacciones y la señalización en la que está implicado EGFR, para modular la capacidad tumorigénica asociada con mutaciones de EGFR, incluyendo mutaciones en el dominio cinasa, tanto mutaciones resistentes primarias como secundarias.

5 La invención proporciona adicionalmente un anticuerpo mAb806 o un fragmento del mismo que se une a antígeno en combinación con dasatinib para uso en el tratamiento del cáncer mediado por EGFR en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero dasatinib y anticuerpo mAb806 o el fragmento del mismo. En un aspecto, dasatinib o el anticuerpo mAb806 o el fragmento del mismo se administran simultáneamente. En un aspecto, dasatinib y el anticuerpo mAb806 o el fragmento del mismo se administran de forma simultánea, en serie o repetidamente, antes o después de una quimioterapia tradicional.

10 mAb806 se puede administrar en los métodos solo o en combinación con otros anticuerpos anti-EGFR. mAb806 también se puede administrar en serie o en combinación con otros anticuerpos anti-EGFR VIII, incluyendo cetuximab, ABX-EGF (panitumumab), DH8.3, L8A4 y o fragmentos activos de los mismos. El inhibidor de src se puede administrar en los métodos solo o en combinación con uno a varios anticuerpos anti-EGFR y, opcionalmente, se puede administrar uno o varios inhibidores de src.

15 El o los anticuerpos anti-EGFR se pueden preparar en composiciones farmacéuticas, con un vehículo adecuado y con una resistencia efectiva para la administración por varios medios a un paciente. Se puede utilizar una variedad de técnicas de administración, entre ellas las técnicas parenterales, tales como inyecciones subcutáneas, intravenosas e intraperitoneales, cateterizaciones y similares. Las cantidades de anticuerpo o de sus fragmentos activos pueden variar y, en particular, se deben basar en las recomendaciones y la prescripción de un médico o veterinario capacitado, incluso después de la consideración de los resultados y los datos proporcionados en este documento.

20 El inhibidor o los inhibidores de src se pueden preparar en composiciones farmacéuticas, con un vehículo adecuado y con una fuerza efectiva para la administración a través de varios medios a un paciente. Se puede utilizar una variedad de técnicas de administración, entre ellas técnicas parenterales tales como inyecciones subcutáneas, intravenosas e intraperitoneales, cateterizaciones y similares, y/o la administración oral o la administración o aplicación transdérmica. Las cantidades de inhibidor o inhibidores de src pueden variar y en particular se deben basar en las recomendaciones y la prescripción de un médico o veterinario capacitado, incluso después de la consideración de los resultados y los datos proporcionados en este documento. Las composiciones farmacéuticas que son combinaciones de uno o varios anticuerpos anti-EGFR y uno o varios inhibidores de src, se pueden preparar también de forma adecuada para la administración.

25 Los anticuerpos de la invención se pueden marcar con un marcador detectable o funcional. Los marcadores detectables incluyen, pero no se limitan a, radiomarcadores tales como los  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{121}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{99}\text{Tc}$  y  $^{186}\text{Re}$ , que pueden estar fijados a los anticuerpos de la invención utilizando la química convencional conocida en la técnica de formación de imágenes con anticuerpos. Los marcadores también incluyen marcadores fluorescentes y marcadores utilizados convencionalmente en la técnica de formación de imágenes por RM-CT. También incluyen marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano picante. Los marcadores incluyen además restos químicos tales como biotina que se pueden detectar mediante la unión a un resto detectable cognado específico, por ejemplo, avidina marcada.

30 Los marcadores funcionales incluyen sustancias que están diseñadas para ser dirigidas al sitio de un tumor para causar la destrucción de tejido tumoral. Tales marcadores funcionales incluyen fármacos citotóxicos, tales como 5-fluorouracilo o ricina y enzimas tales como carboxipeptidasa o nitrorreductasa bacterianas, que son capaces de convertir pró-fármacos en fármacos activos en el sitio de un tumor.

35 Los anticuerpos anti-EGFR radiomarcados y fragmentos de los mismos, son útiles en las técnicas de diagnóstico *in vitro* y en las técnicas de formación de imágenes radiológicas *in vivo* y en radioinmunoterapia. En el caso de formación de imágenes *in vivo*, los miembros de la presente invención que se unen específicamente, se pueden conjugar con un agente de formación de imágenes en lugar de uno o varios radioisótopos, incluyendo, pero no limitados a un agente potenciador de imágenes mediante resonancia magnética, en donde por ejemplo se carga una molécula de anticuerpo con un gran número de iones paramagnéticos a través de grupos quelantes. Ejemplos de grupos quelantes incluyen EDTA, porfirinas, éteres corona de poliaminas y polioximas. Ejemplos de iones paramagnéticos incluyen gadolinio, hierro, manganeso, renio, europio, lantano, holmio y ferbio. En un aspecto adicional de la invención, los miembros de unión específica radiomarcados, en particular anticuerpos y fragmentos de los mismos, particularmente radioinmunoconjugados, son útiles en radioinmunoterapia, particularmente como anticuerpos radiomarcados para la terapia contra el cáncer. En otro aspecto adicional, los miembros de unión específica radiomarcados, en particular los anticuerpos y fragmentos de los mismos, son útiles en técnicas de cirugía radioinmuno guiada, en donde se puede identificar e indicar la presencia y/o la posición de células cancerígenas, células precancerígenas, células tumorales y células hiperproliferativas, antes, durante o después de la cirugía para eliminar tales células.

40 Los inmunoconjugados o las proteínas de fusión con anticuerpo de la presente invención, en donde los miembros de la unión específica, en particular los anticuerpos y fragmentos de los mismos, de la presente invención se conjugan o se fijan a otras moléculas o agentes, incluyen además, pero no se limitan a miembros de unión conjugados con un

agente de ablación química, una toxina, un inmunomodulador, una citocina, un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico o un fármaco.

La radioinmunoterapia (RAIT) se ha incorporado en la fase clínica y ha demostrado eficacia utilizando diversos inmunocombinados de anticuerpos. El anticuerpo anti-antígeno carcinoembrionario (anti-CEA) humanizado marcado con  $^{131}\text{I}$ , hMN-14, ha sido evaluado en el cáncer colorrectal (Behr TM et al., (2002) Cancer 94 (4Supl): 1373-1381) y el mismo anticuerpo marcado con  $^{90}\text{Y}$  ha sido evaluado en el carcinoma medular de tiroides (Stein R et al., (2002) Cancer 94(1):51-61). La radioinmunoterapia que emplea anticuerpos monoclonales también ha sido evaluada y descrita para el linfoma no Hodgkin y el cáncer de páncreas (Goldenberg DM (2001) Crit Rev Oncol Hematol 39(1-2): 195-201; Gold DV et al., (2001) Crit Rev Oncol Hematol 39 (1-2) 147-54). Métodos de radioinmunoterapia con anticuerpos particulares se describen también en el documento de patente de EE.UU. 6.306.393 y 6.331.175. Cirugía radioinmoguiada que emplea anticuerpos anti-CEA y anticuerpos dirigidos contra antígenos asociados a tumores (Kim JC et al., (2002) Int J Cancer 97(4):542-7; Schneebaum S et al., (2001) World J Surg 25(12):1495-8; Avital S et al., (2000) Cancer 89(8):1692-8; McIntosh DG et al., (1997) Cancer Biother Radiopharm 12(4):287-94).

Los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar a un paciente que requiere un tratamiento a través de cualquier vía adecuada, generalmente mediante inyección en el torrente sanguíneo o CSF, o directamente en el sitio del tumor. La dosis precisa dependerá de una variedad de factores, incluyendo si el anticuerpo es para diagnóstico o para tratamiento, el tamaño y la ubicación del tumor, la naturaleza precisa del anticuerpo (ya sea anticuerpo completo, fragmento, diacuerpo, etc.), y la naturaleza del marcador detectable o funcional fijado al anticuerpo. Cuando se usa un radionúclido para la terapia, una dosis única máxima adecuada es de aproximadamente 45 mCi/m<sup>2</sup>, hasta un máximo de aproximadamente 250 mCi/m<sup>2</sup>. Las dosificaciones preferibles están en el intervalo de 15 a 40 mCi, con un mayor intervalo de dosificación preferido de 20 a 30 mCi, o de 10 a 30 mCi. Una terapia de este tipo puede requerir un reemplazo de médula ósea o de células madre. Una dosis de anticuerpo típica, ya sea para la formación de imágenes de tumores o el tratamiento de tumores, estará en el intervalo de 0,5 a 40 mg, preferiblemente desde 1 a 4 mg de anticuerpo en forma de F(ab')<sub>2</sub>. Los anticuerpos sin modificar se administran preferiblemente en dosis de 20 a 1000 mg de proteína por dosis, o de 20 a 500 mg de proteína por dosis, o de 20 a 100 mg de proteína por dosis. Esta es una dosis para un solo tratamiento de un paciente adulto, que se puede ajustar proporcionalmente a niños y bebés, y también ajustar a otros formatos de anticuerpo en proporción con el peso molecular. Los tratamientos se pueden repetir a diario, dos veces por semana, a intervalos semanales o mensuales, a discreción del médico. La dosificación y la administración del inhibidor o inhibidores de src pueden estar determinadas y las puede variar por un médico u otra persona experta en la técnica.

La invención se puede entender mejor haciendo referencia a los siguientes Ejemplos, que se proporcionan como ejemplares de la invención. Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención.

### **Ejemplo 1**

#### La eficacia de los anticuerpos específicos de EGFR se ve reforzada después de la inactivación o inhibición de src

Los factores que afectan a la eficacia de los anticuerpos monoclonales terapéuticos (mAbs) dirigidos al EGFR siguen siendo relativamente desconocidos, especialmente en el glioma. Se examinó la eficacia de dos mAbs específicos de EGFR (mAb 806 y 528) frente a xenoinjertos de glioma obtenidos a partir de U87MG que expresaban variantes de EGFR. Usando esta metodología se permitía el cambio de la forma de EGFR a la vez que se mantenía el fondo genético constante. Estas variantes incluían el EGFR de2-7 (o EGFRvIII), una mutación constitutivamente activa del EGFR expresada en glioma.

La eficacia de los mAbs se correlacionaba con el número de EGFRs, sin embargo, el factor más importante era la activación del receptor. Mientras que los xenoinjertos U87MG que expresaban el EGFR de2-7 respondían a la terapia, los que mostraban una falta de actividad cinasa de EGFR de2-7 eran refractarios. Un EGFR de2-7 modificado que era activo para cinasa pero que carecía de autofosforilación, también respondió, lo que sugiere que estos mAbs actúan en xenoinjertos que expresan EGFR de2-7 bloqueando la transfosforilación. Puesto que los xenoinjertos U87MG que expresaban EGFR de2-7, coexpresaban EGFR wt, la eficacia de los anticuerpos monoclonales también se sometió a ensayo frente a xenoinjertos NR6 que expresaban el EGFR de2-7 de forma aislada. Si bien mAb 806 mostraba una actividad antitumoral frente a xenoinjertos NR6, la terapia con mAb 528 era ineficaz, lo que sugiere que mAb 528 aplica su actividad antitumoral mediante la alteración de las interacciones entre EGFR de2-7 y wt.

Por último, la alteración genética de Src en xenoinjertos U87MG que expresaban el EGFR de2-7, mejoraba enormemente la eficacia de mAb 806. El uso eficaz de anticuerpos específicos de EGFR en glioma dependerá de la identificación de tumores con EGFR activado. La combinación de EGFR e inhibidores de Src proporciona una estrategia nueva y eficaz para el tratamiento del glioma.

#### Antecedentes

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una glicoproteína transmembranal con actividad intrínseca de tirosina cinasa. La hiperexpresión del EGFR se observa en numerosos tumores epiteliales y está asociada frecuentemente con un pronóstico clínico malo (1-3). La hiperexpresión del EGFR puede ser el resultado de la ampli-

5 ficación del gen *EGFR*, particularmente en glioma (4). En el glioma, la amplificación génica está asociada con reordenamientos de *EGFR* con la mutación más común, EGFR de2-7 (o EGFRvIII), caracterizada por una delección en marco de 801 pares de bases que abarcan los exones 2 a 7 de la secuencia codificadora (4-6). Este reordenamiento produce como resultado la delección de 267 aminoácidos del dominio extracelular y la inserción de una nueva glicina en el sitio de fusión, produciendo todos ellos un péptido de unión único. Mientras que EGFR de2-7 es incapaz de unirse a ningún ligando conocido, el receptor muestra un bajo nivel de activación constitutiva y es capaz de mejorar el crecimiento de xenoinjertos de glioma y de cáncer de mama (7, 8).

10 La inhibición de EGFR es una estrategia racional para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer. Agentes terapéuticos potenciales incluyen anticuerpos monoclonales (mAbs) dirigidos al EGFR (por ejemplo, C225, ABX-EGF, EMD 55900) (9-11) e inhibidores de la tirosina cinasa de bajo peso molecular (TKIs) del EGFR (por ejemplo, ZD1839, OSI 774) (12). De hecho, algunos de estos agentes terapéuticos han sido aprobados para uso clínico limitado en el cáncer de pulmón (ZD1839, Iressa) y el cáncer de colon (C225, Erbitux). A partir de estos ensayos clínicos está muy claro que no todos los pacientes positivos para el EGFR responden a estos agentes terapéuticos dirigidos (Tabla 1). Factores determinantes que causan que los pacientes sean susceptibles a los agentes terapéuticos de EGFR, es un objetivo importante desde un punto de vista del bienestar del paciente y económico. Del mismo modo, la comprensión de la naturaleza de la resistencia a los agentes terapéuticos de EGFR puede ayudar a identificar metodologías para su superación.

TABLA 1

Aspectos celulares asociados con la susceptibilidad a los agentes terapéuticos de EGFR.				
Inhibidor de EGFR	Sistema Experimental	Observación	Comentario	Ref(s)
PD153035	Múltiples líneas celulares <i>in vitro</i>	Sensibilidad correlacionada con el número de EGFR wt	sin datos <i>in vivo</i>	(32)
C225	Carcinomas de células renales <i>in vitro</i>	Solo las células que contenían el gen <i>VHL</i> eran sensibles	sin datos <i>in vivo</i>	(33)
EMD55900 y EMD72000	Múltiples líneas celulares <i>in vitro</i> y xenoinjertos	Sensibilidad correlacionada con el número de EGFR wt		(34)
SU1195 y ZD1839	Múltiples líneas celulares <i>in vitro</i> y xenoinjertos	Más dificultad para inhibir la fosforilación de EGFR en presencia de ErbB2		(35)
mAbR3 y C225	Xenoinjertos A431	Xenoinjertos recurrentes después de una regresión completa eran resistentes frecuentemente a una terapia adicional	Hiperexpresión de VEGF era una observación común en las líneas celulares resistentes	(36)
ZD1839	Xenoinjertos A431 y NR6M (expresan el EGFR de2-7)	Xenoinjertos que expresan el EGFR de2-7 eran resistentes	NR6M expresa el EGFR de2-7 en ausencia de EGFR wt, clínicamente los dos se coexpresan	(37)
AG1478	Líneas celulares de glioma <i>in vitro</i>	El glioma resistente expresa EGFR-1, el cual está regulado al alza adicionalmente mediante AG1478. El efecto de EGFR-1 parece mediar a través de PI3-K/Akt	Observación restringida a una sola línea celular <i>in vitro</i>	(38)
CGP59326	Células de cáncer de mama BT474 y de cáncer gástrico MKN7 <i>in vitro</i>	Activación de heterodímeros erbB2/3 mediante resistencia generada por he-regulina	sin datos <i>in vivo</i>	(39)
ZD1839	Múltiples líneas celulares <i>in vitro</i>	Sensibilidad correlacionada con el número de EGFR wt. MAPK constitutiva	sin datos <i>in vivo</i>	(40)

Aspectos celulares asociados con la susceptibilidad a los agentes terapéuticos de EGFR.				
Inhibidor de EGFR	Sistema Experimental	Observación	Comentario	Ref(s)
		activa incrementa la resistencia		
AG1478	Panel celular grande <i>in vitro</i>	Dos requerimientos de la sensibilidad: EGFR wt alto y capacidad de responder a EGF iniciando el ciclo celular	sin datos <i>in vivo</i>	(41)
ZD1839 y PD153035	Múltiples líneas celulares <i>in vitro</i>	Una señalización sostenida a través de Akt o Erk puede causar resistencia	sin datos <i>in vivo</i>	(42)
ZD 1839	Células de cáncer de mama A431 y MDA-468 <i>in vitro</i>	Una señalización sostenida a través de Akt causa resistencia. La presencia de PTEN incrementa la eficacia de los agentes terapéuticos de EGFR	sin datos <i>in vivo</i>	(43)
ZD1839 y C225	A431 y NSCLC múltiple <i>in vitro</i>	Sin correlación con el número de EGFR.	sin datos <i>in vivo</i>	(44)
ZD1839	Pacientes con NSCLC	Pacientes con mutaciones activadoras en el dominio de la cinasa de EGFR tienen más probabilidad de responder.	Los datos posteriores sugieren que no todos los pacientes con mutaciones responden	(28, 45)
ZD1839	Fibroblastos NR6 y células de glioma U87MG	Las células que expresan EGFR de2-7 eran resistentes, posiblemente está relacionado con una incapacidad para inhibir completamente la fosforilación de EGFR de2-7.	sin datos <i>in vivo</i>	(46)
OSI-774	Panel de líneas celulares de glioma	Células capaces de incrementar el ARNm de EGFR como respuesta a una terapia son más resistentes.		(47)
ZD1839 y OSI-774	Pacientes con NSCLC	Una mutación secundaria en la cinasa de EGFR causa resistencia		(48)
C225 y ABX	Pacientes con cáncer colorrectal	Respuesta correlacionada con un incremento en el número de copias de <i>EGFR</i>	Número de muestras bajo	(26)
OSI-774 y ZD1839	Pacientes con glioma	La coexpresión de EGFRvIII y PTEN está asociada con una capacidad de respuesta		(49)

5 Los mecanismos que causan resistencia/susceptibilidad frente a TKIs dirigidos contra EGFR han sido ampliamente estudiados, mientras que los factores que afectan a la eficacia de los anticuerpos anti-EGFR siguen siendo relativamente desconocidos (véase la Tabla 1). Algunas generalizaciones se pueden extraer de estos estudios con respecto a los TKIs. En primer lugar, la sensibilidad de las líneas celulares frente a la inhibición con TKIs se correlaciona con el aumento de EGFR en la superficie celular (Tabla 1), lo que sugiere que hay un cierto nivel intrínseco de expresión de EGFR requerida para que estos inhibidores funcionen. En segundo lugar, la capacidad para mantener la señalización a través de la ruta PI3-cinasa/Akt después de la inactivación de EGFR, reduce la eficacia de los TKIs (Tabla 1). Una abrumadora mayoría de estos estudios se ha realizado *in vitro*, por lo que no se sabe si estas observaciones son válidas en el entorno *in vivo*. Recientemente, se ha analizado en una serie de estudios la situación del gen *EGFR* en pacientes con cáncer de pulmón tratados con Iressa (ZD1839) y se encontró que los pacientes que respondían al tratamiento tenían frecuentemente un aumento de mutaciones funcionales en el dominio cinasa (Tabla 1). Además, una mutación de cinasa secundaria que conduce a la resistencia frente a Iressa, también ha sido descrita (Tabla 1). Los estudios iniciales sugieren sin embargo que estas observaciones no son generales y que las mutacio-

10

nes descritas en pacientes con tumores pulmonares no se observan en otros tipos de tumores.

El número limitado de estudios que utilizan anticuerpos anti-EGFR hace que sea difícil para obtener cualquier generalización con respecto a la susceptibilidad frente a esos agentes (Tabla 1). Aparte de la falta de estudios *in vivo*, muchos de estos estudios de la susceptibilidad se han realizado utilizando paneles de células que, dada la variación de las rutas de señalización entre las líneas celulares y la presencia o ausencia de otros miembros de la familia ErbB, hace que sea difícil identificar factores individuales asociados con una sensibilidad o resistencia a EGFR. Con el fin de abordar algunas de estas cuestiones, se sometió a ensayo la susceptibilidad *in vivo* de la línea celular de glioma U87MG, que expresa niveles modestos de EGFR de tipo silvestre (wt), frente a dos anticuerpos específicos de EGFR. A continuación, transfectamos las células U87MG con una variedad de estructuras artificiales de EGFR wt y EGFR de2-7 para determinar qué efecto tiene el número de receptores y la activación sobre la susceptibilidad a una terapia con anticuerpos.

Los dos anticuerpos usados en este estudio son mAb 806 y 528. mAb 806 es un nuevo anticuerpo específico anti-EGFR que se obtuvo contra las células que expresaban el EGFR de2-7 (13). Curiosamente, mientras que mAb 806 se une claramente al EGFR de2-7, también se une a un subconjunto de EGFR wt (~10%) expresado en la superficie de las células que hiperexpresan el receptor (13). Análisis recientes han mostrado que el epítipo de mAb 806 solamente se expone en una forma conformacional del EGFR que existe transitoriamente cuando el receptor cambia de su estado inactivo al activo (14). A diferencia del EGFR wt, el EGFR de2-7 está en esta conformación transitoria de forma constitutiva y por lo tanto está disponible para la unión a mAb 806. Nuestros estudios previos han mostrado que el tratamiento de xenoinjertos que expresan el EGFR de2-7 o hiperexpresan el EGFR wt con mAb 806, causa una inhibición significativa del crecimiento tumoral (15-17). El anticuerpo 528 se produjo y aisló al mismo tiempo que la versión murina del anticuerpo C225 (Erbbitux) y muestra propiedades muy similares (18). mAb 528 actúa como un antagonista del ligando e inhibe el crecimiento de células que expresan EGFR, tanto *in vitro* como *in vivo* cuando se cultivan como xenoinjertos (18).

### **Materiales y Métodos**

#### *Líneas celulares y anticuerpos monoclonales.*

Las líneas celulares U87MG transfectadas, U87MG.Δ2-7, U87MG.DK, U87MG.wt, U87MG.DY5 y U87MG.DY2 se han descrito con detalle en otra parte (16, 19). La línea celular A431 también se ha descrito previamente (20). Todas las líneas celulares se mantuvieron en DMEM (DMEM/F12; Life Technologies, Inc, Grand Island, NY) o RPMI que contenía 10% de FCS (CSL, Melbourne, Victoria, Australia), glutamina 2 mM (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) y penicilina/estreptomina (Life Technologies, Inc, Grand Island, NY). Además, las líneas celulares transfectadas se mantuvieron en 400 mg/ml de geneticina (Life Technologies, Inc, Melbourne, Victoria, Australia).

Los mAbs 806 y 528 fueron producidos y purificados en el Fondo para la Producción Biológica (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Australia). Los anticuerpos para los sitios específicos de fosforilación de tirosina del EGFR y un anticuerpo policlonal de conejo anti-EGFR se obtuvieron de Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Src se detectó utilizando los anticuerpos monoclonales de ratón v-Src 327 (Oncogene Research Products, CA, EE.UU.) o c-Src H-12 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, EE.UU.). El anticuerpo policlonal de conejo PY418 (BioSource International, Inc., CA, EE.UU.) se utilizó para la detección de fosfo-Src. El anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10 se adquirió de Upstate Biotechnology, (Lake Placid, NY). El C13 utilizado para la detección tanto de EGFR de tipo silvestre como de EGFR truncado, se obtuvo de BD Transduction Laboratory (San Diego, Ca).

#### *Generación de la línea celular U87MG.Δ2-7<sub>DNSrc</sub>.*

Una estructura artificial de Src dominante negativa (DN), sin actividad cinasa (K296R/Y528F) se obtuvo de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, EE.UU.). Un fragmento Hind III que contenía la DNSrc se subclonó en el vector pcDNA3.1/Hygro(+) obtenido de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA) y la estructura artificial resultante se transfirió en células U87MG.Δ2-7 mediante electroporación. Una segunda línea celular transfectada con el vector pcDNA3.1/Hygro solo, también se generó. Las células se sembraron en partes alícuotas de 1 ml en placas de 96 pocillos, con una densidad de aproximadamente  $2 \times 10^4$  células por pocillo, y se incubaron a 37°C durante 48 h, después de lo cual se añadieron 100 μl/ml de higromicina (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Una vez que se obtuvieron los clones (aproximadamente dos semanas), las células se colocaron de nuevo en 400 μg/ml de geneticina, así como higromicina.

Las células transfectadas se seleccionaron inicialmente por análisis FACS para confirmar que la expresión del EGFR de2-7 se había conservado. Los clones se sometieron a continuación o bien a una lisis celular completa o a inmunoprecipitación, antes de la transferencia western usando anticuerpos específicos de Src (v-Src 327, c-Src H-12). Varios clones que mostraban un aumento espectacular de los niveles totales de Src (los niveles de Src son muy bajos en la línea celular original) fueron identificados y se multiplicaron. El aumento de los niveles de Src se confirmó adicionalmente mediante inmunoprecipitación de lisados celulares marcados con <sup>35</sup>S, con el anticuerpo v-Src 327 y sometiendo los precipitados resultantes a SDS-PAGE y autorradiografía cuantitativa. Se seleccionó el clon que expresaba los niveles más altos de DNSrc, y se observó que la DNSrc se fosforilaba en la posición Y418 lo que sugiere que se había plegado correctamente.

*Ensayos de crecimiento in vitro.*

El efecto antiproliferativo de los mAbs 806 y 528 *in vitro* se examinó como se ha descrito previamente con detalle (18). Brevemente, las células se sembraron a  $1 \times 10^4$  células por pocillo en placas de 24 pocillos en medios que contenían 0,5% de FCS. Después de 4 días, las células se retiraron con tripsina y se contaron usando un hemocitómetro. Los anticuerpos se utilizaron con una concentración final de 100  $\mu\text{g/ml}$ , una concentración consistente con la obtenida dentro de los xenoinjertos.

*Modelos de xenoinjertos.*

Las células tumorales ( $3 \times 10^6$ ) en 100  $\mu\text{l}$  de PBS se inocularon por vía s.c. en ambos flancos de ratones hembra sin pelo de 4 a 6 semanas de edad (Centro de Investigación Animal, Perth, Australia). Todos los estudios se llevaron a cabo usando modelos de tumores establecidos como se ha informado anteriormente (15, 16). El tratamiento se inició una vez que los tumores habían alcanzado un volumen medio de aproximadamente  $100 \text{ mm}^3$ . El volumen del tumor en  $\text{mm}^3$  se determinó usando la fórmula  $(\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$ , en donde la longitud era el eje más largo y siendo la anchura la medición en ángulos rectos frente a la longitud. Los datos se expresan como volumen tumoral medio  $\pm$  SE para cada grupo de tratamiento. Todos los datos fueron analizados para la significación de la prueba t de Student. Se utilizó un mínimo de 10 xenoinjertos por grupo en cada estudio.

*Inmunotransferencia.*

Las células se lisaron en tampón de lisis frío (HEPES 30 mM, NaCl 150 mM, NAF 10 mM, 1% de Triton X-100,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  200  $\mu\text{M}$ , 0,4% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el conjunto 1 de mezcla inhibidora de proteasa (Calbiochem, San Diego, CA) que contenía AEBSF 500  $\mu\text{M}$ , aprotinina 150 nM, inhibidor de proteasa E-64 1  $\mu\text{M}$ , EDTA 0,5 mM y leupeptina 1  $\mu\text{M}$ , pH 7,4). Los lisados se inmunoprecipitaron con el mAb 806 o 528 y el precipitado resultante se analizó mediante inmunotransferencia tal y como se describe en detalle (21).

*Microscopía de inmunofluorescencia.*

Los mAbs 806 y 528 se marcaron directamente con cianina 3 (Cy3) utilizando el kit de marcado con anticuerpo monoclonal Cy3 (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd, Buckinghamshire, Inglaterra) según las instrucciones del fabricante. El marcado con éxito del anticuerpo se determinó mediante análisis por citometría de flujo de la unión a células U87MG. $\Delta$ 2-7. El anticuerpo monoclonal, específico del endosoma temprano, anti-Early Endosome Autoantigen 1 de ratón (EEA1) se adquirió en Transduction Laboratories (San Diego, CA, EE.UU.). El anticuerpo secundario de IgG anti-ratón de burro para el fragmento F(ab')<sub>2</sub> AffiniPure conjugado con Cy2 y el anticuerpo sin marcar que bloqueaba IgG de cabra anti-ratón para el fragmento Fab AffiniPure, fueron adquiridos en Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, EE.UU.). Las células U87MG. $\Delta$ 2-7 o NR6. $\Delta$ 2-7 se cultivaron en cubreobjetos de vidrio de 12 mm o cubreobjetos de 12 mm con poli-D-lisina Biocoat Cell Environments (Becton Dickinson labware, Bedford, MA, EE.UU.) en MEM (GibcoBRL Grand Island, NY, EE.UU.) complementados con 10% de FBS, penicilina/estreptomina y glutamato a 37°C. La unión de los anticuerpos a las células se llevó a cabo en presencia de 0,25% de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE.UU.). Los mAbs 806 y 528 conjugados con Cy3 se utilizaron a concentraciones de 5  $\mu\text{g/ml}$  y 2  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente y el marcado en superficie se realizó a 4°C durante 20 min en condiciones humidificadas. Las células se lavaron tres veces en 0,25% de albúmina de suero bovino (BSA)/PBS enfriado con hielo. La internalización del anticuerpo unido a la superficie se inició mediante la incubación de cubreobjetos individuales a 37°C. Después de la internalización durante diversos periodos de tiempo, se retiraron los cubreobjetos individuales de 37°C, se lavaron tres veces en BSA/PBS enfriado con hielo para detener la internalización y se fijaron en 4% de PFA durante 20 minutos a TA. Los cubreobjetos se lavaron después en BSA/PBS antes del lavado en agua doblemente destilada (DDW) y se montaron en portaobjetos de vidrio con medio de montaje Fluoromount G (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, EE.UU.). Las muestras se analizaron con microscopio confocal (Nikon Instech Co., Ltd., Kanagawa, Japón) utilizando una configuración de longitud de onda apropiada. Para los estudios de colocalización, las células se permeabilizaron con 0,1% de Triton X-100 durante 1 min. A continuación, las muestras se lavaron y se incubaron con el fragmento Fab anti-ratón de cabra sin marcar para bloquear todos los sitios de unión a ratón existentes (es decir, el mAb 806 o 528 internalizado) durante 20 min a TA. Las muestras se lavaron a continuación en BSA/PBS antes de la incubación con anti-EEA1 durante 20 min a TA. Las células se lavaron y se incubaron finalmente con el fragmento de anticuerpo secundario F(ab')<sub>2</sub> de burro anti-ratón conjugado con Cy2. Los vectores de ADN para la glicoproteína lisosómica 120 marcada con proteína fluorescente verde (GFP) (Igp-120-GFP) fueron proporcionados amablemente por el catedrático Ira Mellman y el catedrático del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina, New Haven, CT, EE.UU. Las células se cultivaron en placas con micropocillos de fondo de vidrio mat-tek que contenían un cubreobjetos de vidrio de 14 mm incluido (MatTek Corp. Ashland, MA, EE.UU.), se transfectaron durante la noche utilizando reactivo LipofectAMINE (Invitrogen® Life Technologies, Mulgrave, Vic, Australia) siguiendo las instrucciones del fabricante. La formación de imágenes confocales de células transfectadas positivamente, que emitían fluorescencia verde cuando se excitaban con luz con una longitud de onda de 488 nm, se llevó a cabo 24 horas después de la transfección.

**Resultados***Correlación entre la sensibilidad in vitro e in vivo.*

Muchos de los estudios que se describen en la Tabla 1 se han realizado *in vitro*. Nuestra experiencia con terapia de EGFR dirigida a mAb y a TKI demuestra claramente que la sensibilidad *in vitro* y la respuesta *in vivo* no se correlacionan de forma fiable. De hecho, hemos publicado recientemente un ejemplo en el que dos líneas celulares que mostraban una sensibilidad similar a la de TKI AG1478 específico de EGFR *in vitro*, diferían notablemente en su respuesta *in vivo* frente al mismo agente (22). Utilizando un patrón en el ensayo de inhibición del crecimiento *in vitro* descrito anteriormente para C225 y una concentración de anticuerpo consistente con la que se conseguía en el sitio del xenoinjerto, observamos poca correlación entre la inhibición del anticuerpo *in vitro* y la actividad antitumoral *in vivo* (Tabla 2). Ni mAb 528 ni mAb 806 inhibían el crecimiento de las células U87MG.Δ2-7 *in vitro*, pero ambos anticuerpos mostraban una actividad antitumoral fuerte *in vivo* que era independiente de la función efectora inmune (véase la Fig. 2). Además, incluso si un anticuerpo dirigido a EGFR mostraba una correlación *in vitro* e *in vivo* en una determinada línea celular (por ejemplo mAb 528 en las células y xenoinjertos A431, Tabla 2), esto no implicaba necesariamente que otro anticuerpo específico de EGFR se correlacionará en la misma línea celular (por ejemplo, mAb 806 en las células y xenoinjertos A431, Tabla 2). Este simple análisis junto con nuestras observaciones anteriores, demuestran claramente el valor limitado de los ensayos *in vitro* para determinar la sensibilidad frente a agentes terapéuticos de EGFR.

TABLA 2

<b><i>Comparación in vitro e in vivo de la sensibilidad frente a agentes terapéuticos de EGFR</i></b>				
	<b>LÍNEA CELULAR</b>			
	<b>U87MG.Δ2-7</b>		<b>A431</b>	
	<b>mAb 528</b>	<b>mAb 806</b>	<b>mAb 528</b>	<b>mAb 806</b>
<b><i>In Vitro</i></b>	-	-	+	-
<b><i>In Vivo</i>*</b>	+	+	++	++

\* Los datos *in vivo* para los xenoinjertos A431 proceden de un artículo reciente (16)

*Terapia con anticuerpos de xenoinjertos de glioma U87MG que expresan diferentes formas del EGFR.*

Las células U87MG parentales, que expresaban niveles moderados del EGFR wt, o la misma línea celular transfectada con EGFR wt adicional, EGFR de2-7 o diversas formas modificadas de EGFR de2-7 (Fig. 1) se inyectaron por vía s.c. en ratones sin pelo y se permitió que se establecieran como xenoinjertos tumorales. El tratamiento con anticuerpo se inició una vez que los xenoinjertos habían alcanzado aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>. Todos los tumores fueron tratados con 1 mg de mAb 528 o 806 tres veces por semana durante 2 semanas. Esta dosis y la pauta de tratamiento con los anticuerpos fue elegida ya que provoca una fuerte respuesta antitumoral en nuestro modelo patrón de xenoinjerto U87MG.Δ2-7, pero no era tan eficaz para que pudiera ocultar cualquier aumento de la actividad antitumoral que se podía observar en otras líneas celulares obtenidas a partir de U87MG que contenían diferentes variantes del EGFR. Como se describe con detalle a continuación, la eficacia antitumoral de mAb 806 y 528 era similar en todos los xenoinjertos de glioma obtenidos a partir de U87MG (Fig. 2).

**1. Células parentales (U87MG):** Ningún anticuerpo inhibía el crecimiento de los xenoinjertos U87MG a pesar del hecho de que expresaban el EGFR a niveles moderados (~ 5 x 10<sup>4</sup> receptores por célula) (13).

**2. Células que hiperexpresan el EGFR wt (U87MG.wt):** La transfección de células U87MG con el EGFR wt para aumentar la expresión (aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> receptores por célula) no cambió la tasa de crecimiento *in vivo* de los xenoinjertos (Fig. 3A) pero sí que produjo que los tumores se volvieran sensibles a ambos anticuerpos. Si bien esto no es sorprendente para mAb 806, ya que se une preferentemente a células que hiperexpresan el EGFR wt, era algo inesperado para mAb 528, ya que sugiere que incluso un aumento en el número de receptores en ausencia de un cambio fenotípico, puede inducir una respuesta frente a la terapia con anticuerpos. El día 31, cuando el grupo de control fue sacrificado, la inhibición inducida por mAb 528 era significativa (p <0,01), en donde los xenoinjertos en el grupo vehículo tenían un volumen tumoral medio de 950 mm<sup>3</sup> en comparación con 450 mm<sup>3</sup> en el grupo de tratamiento con mAb 528. El análisis del experimento con mAb 806 el día 39 mostró que el tratamiento con el anticuerpo inhibía significativamente el crecimiento de los xenoinjertos (p <0,001), siendo los volúmenes tumorales de 960 mm<sup>3</sup> y 470 mm<sup>3</sup> para los grupos de PBS y mAb 806, respectivamente.

**3. Células que expresan el EGFR de2-7 (U87MG.Δ2-7):** El crecimiento de xenoinjertos U87MG transfectados con el EGFR de2-7 constitutivamente activo, pero independiente de ligando, también fue inhibido por ambos anticuerpos (Fig. 2). A diferencia de la hiperexpresión de EGFR wt, la coexpresión del EGFR de2-7 en presencia de EGFR wt endógeno, genera una ventaja de crecimiento significativa para los xenoinjertos U87MG (Fig. 3B). La fosforilación constitutiva de este receptor se confirmó mediante inmunotransferencia

(Fig. 4). El tratamiento con mAb 528 inhibía significativamente el crecimiento tumoral ( $p < 0,005$ ), teniendo el grupo vehículo un volumen tumoral promedio de  $1170 \text{ mm}^3$  en comparación con  $510 \text{ mm}^3$  del grupo del mAb 528, el día 20 después de la inoculación. Dado que la función primaria de mAb 528 se ha presumido que es antagonista del ligando, su actividad antitumoral contra un xenoinjerto que expresa el EGFR de2-7 independiente de ligando, fue inesperada. Por lo tanto, mAb 528 probablemente interrumpe la señalización de EGFR por otros mecanismos, aparte de su capacidad para bloquear el ligando. Del mismo modo, mAb 806, que solo se une al EGFR de2-7 y no al EGFR wt en estas células, debe mediar su actividad antitumoral independientemente de cualquier efecto sobre la interacción del ligando, ya que inhibía el crecimiento de xenoinjertos que expresaban EGFR de2-7 a un nivel similar al de mAb 528. El día 21, cuando el grupo vehículo fue sacrificado, los xenoinjertos control tenían un volumen tumoral medio de  $1500 \text{ mm}^3$ , en comparación con uno significativamente inferior de  $390 \text{ mm}^3$  en el grupo tratado con el mAb 806 ( $p < 0,0001$ ). Por lo tanto, ambos anticuerpos pueden inhibir xenoinjertos de glioma que expresan una forma independiente del ligando, pero constitutivamente activa del EGFR.

**4. Células que expresan una versión sin actividad cinasa del EGFR de2-7 (U87MG.DK):** Células U87MG transfectadas con una versión sin actividad cinasa (DK) del EGFR de2-7 crecieron como xenoinjertos con una tasa similar a la de las células parentales (Fig. 3B) y no fueron inhibidas significativamente por ninguno de los anticuerpos (Fig. 2). Este receptor carece de fosforilación en los sitios principales asociados con la señalización, pero sigue estando fosforilado en sitios asociados con la internalización del receptor y la degradación (Fig. 4). La unión de ambos anticuerpos a estas células es similar a la observada en células que expresan EGFR de2-7 tanto *in vitro* como *in vivo* (16). Además, puesto que la variante DK del EGFR de2-7 solo contiene una sola mutación puntual intracelular, la afinidad de mAb 806 y 528, que se unen al dominio extracelular, no debe estar alterada. Este resultado demuestra que cualquier función efectora inmune mediada por estos anticuerpos *in vivo* es insuficiente para iniciar una respuesta antitumoral. Además, se muestra que la actividad antitumoral de los anticuerpos anti-EGFR requiere un receptor con un dominio cinasa funcional.

**5. Células que expresan una versión del EGFR de2-7 con delección de 2 sitios importantes para la autofosforilación (U87MG.DY2):** xenoinjertos U87MG que expresaban una estructura artificial EGFR de2-7 incapaz de autofosforilarse en dos sitios principales de autofosforilación (la tirosina 1068 y 1173 cambia a fenilalanina) fueron inhibidos significativamente por ambos anticuerpos cuando se cultivaban como xenoinjertos tumorales ( $p < 0,01$  y  $0,006$  para mAb 528 y 806, respectivamente) (Fig. 2). Esta observación, junto con la falta de actividad observada contra los xenoinjertos U87MG.DK, sugiere que la actividad cinasa, en contraposición con la autofosforilación, se correlaciona con la capacidad de respuesta a una terapia con anticuerpos.

**6. Células que expresan una versión del EGFR de2-7 incapaz de autofosforilarse (U87MG.DY5):** Células U87MG que expresan una estructura artificial de EGFR de2-7 incapaz de autofosforilarse en los 5 sitios principales de autofosforilación asociados con la señalización (la tirosina 1173, 1148, 1086, 1068 y 992, cambia a fenilalanina) se cultivaron como xenoinjertos tumorales. Este receptor carece de fosforilación en los sitios principales asociados con la señalización, pero sigue estando fosforilado en sitios asociados con la internalización del receptor y la degradación (Fig. 4). De acuerdo con el resultado obtenido con xenoinjertos DY2, ambos anticuerpos inhibían significativamente el crecimiento de xenoinjertos que expresaban la estructura artificial EGFR de2-7 DY5 ( $p < 0,0001$  para ambos anticuerpos) (Fig. 2). Dado este resultado algo inesperado, este experimento se repitió con ambos anticuerpos, en una dosis más baja (0,5 frente a 1 mg por inyección), y una vez más se obtuvo una inhibición significativa del crecimiento del tumor en ambos casos (datos no mostrados). Puesto que la forma DY5 del EGFR de2-7 es incapaz de unirse directamente a moléculas adaptadoras, decisivas para la señalización aguas abajo, se sugiere que un dominio de cinasa activa en lugar de la interacción con estas moléculas, es una característica decisiva que conduce a la capacidad de respuesta frente a los anticuerpos específicos de EGFR.

#### *Tratamiento de xenoinjertos U87MG que expresan altos niveles de EGFR de2-7.*

Los datos de la Fig. 2 sugieren que cuanto más dependiente se vuelve un xenotrasplante de la señalización de EGFR, es más probable que responda a una terapia con anticuerpos específicos de EGFR. Por lo tanto, utilizando la clasificación FACS se aislaron las células que expresaban niveles muy altos del EGFR de2-7 (U87MG. $\Delta 2-7_{\text{alto}}$ ) (Fig. 5A). Los xenoinjertos U87MG. $\Delta 2-7_{\text{alto}}$  crecían más rápido que los xenoinjertos U87MG. $\Delta 2-7$  originales (Fig. 5B), lo que sugiere que el rápido crecimiento de estos xenoinjertos depende de los altos niveles del EGFR de2-7. Los niveles de expresión de EGFR de2-7 se conservaron *in vivo* tal y como se determinó por inmunotransferencia de lisados de xenoinjerto (Fig. 5C). El tratamiento con mAb 806 o mAb 528 causó una inhibición significativa de los xenoinjertos U87MG. $\Delta 2-7_{\text{alto}}$  que era mayor que la observada para cualquier otra de las líneas celulares obtenidas a partir de U87MG (Fig. 5D). El día 18, cuando se sacrificó el grupo control por razones éticas, el volumen tumoral medio era de  $1760$ ,  $90$  y  $90 \text{ mm}^3$  para el vehículo y los grupos de mAb 806 y mAb 528, respectivamente ( $p < 0,001$ ). De manera significativa, aunque no hubo reversiones completas en ninguno de los estudios anteriores de terapia de U87MG (Fig. 2), 40% de los xenoinjertos de U87MG. $\Delta 2-7_{\text{alto}}$  tratados con mAb 806 y 20% de los tratados con mAb 528, revirtieron completamente. Uno de los tumores mAb 806 era recurrente el día 46 después de la inoculación, mientras que otros tumores no eran recurrentes el día 126, cuando los ratones fueron sacrificados. Por lo tanto, los xenoinjertos dirigidos por la hiperexpresión de una forma constitutivamente activa del EGFR, son más sensibles a anticuerpos específicos del EGFR.

*Terapia con mAb 806 y 528 de xenoinjertos establecidos obtenidos a partir de NR6.*

La línea celular fibroblástica murina NR6 no expresa de forma endógena ningún miembro de la familia ErbB (23), una observación que se confirmó por FACS para EGFR, ErbB2 y ErbB3 (datos no mostrados). Estas células se transfectoron después de forma estable con EGFR de2-7 humano (NR6.Δ2-7). Puesto que todas las líneas celulares obtenidas a partir de U87MG utilizadas para someter a ensayo la eficacia de mAb 806 y 528 contra el EGFR de2-7 también coexpresan el EGFR wt, se evaluó su eficacia terapéutica en ratones con xenoinjertos NR6.Δ2-7 establecidos. El tratamiento con mAb 806 dio como resultado una reducción de la tasa de crecimiento tumoral global, en comparación con el tratamiento con vehículo que era altamente significativo el día 42 después de la inoculación ( $P < 0,003$ ) (Fig. 6). El volumen promedio de los tumores el último día de la terapia (día 39) era de 1520 y 670 mm<sup>3</sup> para el vehículo y los grupos de tratamiento con mAb 806, respectivamente (Fig. 6A).

Los ratones portadores de xenoinjertos NR6.Δ2-7 establecidos también fueron tratados con mAb 528. El día 56 después de la inoculación, cuando los animales se sacrificaron por razones éticas, el tamaño de los tumores tratados con mAb 528 no difería del de los xenoinjertos tratados con vehículo (Fig. 6B). Se realizó un segundo experimento de terapia con mAb 528 usando un protocolo ligeramente variado, mediante el cual los ratones recibieron anticuerpo dos veces por semana durante tres semanas. Una vez más, mAb 528 no pudo inhibir el crecimiento de xenoinjertos NR6.Δ2-7 establecidos en estas condiciones (Fig. 6C). Por lo tanto, a diferencia de mAb 806, mAb 528 es incapaz de inhibir xenoinjertos que expresan el EGFR de2-7 en ausencia del EGFR wt.

*La actividad de Src modula la capacidad de respuesta de xenoinjertos que expresan EGFR de2-7 frente a una terapia con anticuerpos.*

Puesto que mAb 806 y 528 inhiben los xenoinjertos que expresan la versión DY5 del EGFR de2-7 y porque ningún anticuerpo disminuye la fosforilación de EGFR de2-7 como un solo agente *in vivo* (16), es probable que estos anticuerpos medien su actividad antitumoral a través de la alteración de la transfosforilación de una diana aguas abajo del EGFR de2-7. Nuestras observaciones con los xenoinjertos NR6.Δ2-7 sugieren que la actividad antitumoral de mAb 528 es dependiente de la coexpresión del EGFR de2-7 con otro miembro de la familia ErbB, mientras que la actividad de mAb 806 es independiente de esta interacción. Por lo tanto, examinamos si el EGFR de2-7 podía interactuar con Src, como es el caso del EGFR wt, y si esta interacción potencial está relacionada con la eficacia de mAb 806.

La activación del EGFR wt conduce a la activación transitoria de la cinasa Src. De una manera sinérgica, la activación de Src conduce a la fosforilación de la tirosina 845 (Y845) en el EGFR, que no es un sitio de autofosforilación, sino más bien una diana para la fosforilación de Src (24). Con el uso de un anticuerpo específico para Y845, examinamos la fosforilación de Y845 en el EGFR de2-7. Cuando se expresaba en células de glioma U87MG, el EGFR de2-7 mostraba una fosforilación fuerte de Y845 (Fig. 7A). La fosforilación en Y845 fue bloqueada rápidamente mediante la incubación de las células con PP1 y PP2, inhibidores de las cinasas de la familia Src, mientras que el sitio de autofosforilación en Y1173 estaba relativamente poco afectado (Fig. 7A).

Dado que el EGFR de2-7 parece ser una diana para la fosforilación de la cinasa Src, de una manera análoga a la del EGFR wt, tratamos de determinar si esta interacción era decisiva para la actividad de mAb 806. Inicialmente se construyó un EGFR de2-7 que contenía una sustitución Y845F, sin embargo esta proteína mostraba una reducción de la fosforilación en múltiples sitios (Johns, observaciones no publicadas) y por lo tanto no se consideró adecuada para estos estudios. Por lo tanto, como se describe en los materiales y métodos, desarrollamos una línea celular U87MG que coexpresaba el EGFR de2-7 y DNSrc (U87MG.Δ2-7<sub>DNSrc</sub>). Los xenoinjertos U87MG.Δ2-7<sub>DNSrc</sub> crecieron como xenoinjertos tumorales en ratones sin pelo, pero a un ritmo más lento que U87MG.Δ2-7 transfectorados con un vector control (Fig. 7B). El tratamiento de U87MG.Δ2-7<sub>DNSrc</sub> con mAb 806 dio como resultado la inhibición fuerte del crecimiento del tumor (Fig. 7C). El día 34 después de la inoculación, el volumen promedio de los xenoinjertos era de 1220 mm<sup>3</sup> en el grupo vehículo en comparación con los 100 mm<sup>3</sup> en el grupo tratado con mAb 806 ( $p < 0,001$ ) (Figura 7C). Por otra parte, el 60% de todos los xenoinjertos U87MG.Δ2-7<sub>DNSrc</sub> en el grupo tratado con mAb 806, revirtió completamente y no volvió a aparecer hasta el día 50 después de la inoculación. Por lo tanto, la inhibición de la señalización de Src aumenta la eficacia de la terapia con mAb 806 (Fig. 7C comparada con Fig. 2).

*Internalización de mAb 806 en células U87MG.Δ2-7.*

El tráfico intracelular de mAb 806 después de la unión a EGFR de2-7 expresado en células U87MG.Δ2-7, fue investigado por microscopía confocal. Después de la incubación de mAb 806-Cy3 a 4°C y antes de la captura a 37°C, mAb 806 unido a EGFR de2-7 se encontró a lo largo de la membrana plasmática (Fig. 8A; 0 min, mAb 806-Cy3). Después de la incubación a 37°C, mAb 806 (Fig. 8A; mAb 806-Cy3) se observó que se translocaba a vesículas citoplasmáticas pequeñas, punteadas. La posterior inmunotinción con anti-autoantígeno de endosoma temprano 1 (EEA1), que identificaba los endosomas tempranos (Fig. 8A; EEA1), mostraba una colocalización parcial con mAb 806, tal y como se visualizaba por la presencia de fluorescencia amarilla (Fig. 8A; fusión). Después de 60 minutos de captura a 37°C, la colocalización era mínima (Fig. 8A; fusión, 60 min), lo que sugiere que la mayoría de los anticuerpos había salido de los compartimentos endocíticos tempranos. Estas observaciones indican que el mAb 806 se localiza en los compartimentos endocíticos tempranos inmediatamente después de internalización, antes de trasladarse a una ubicación alternativa, más tarde en su ciclo de tráfico intracelular.

La localización lisosómica de mAb 806 después de la unión e internalización de EGFR de2-7 en las células U87MG.Δ2-7 se logró a través de análisis de colocalización en células transfectadas transitoriamente con Igp-120-GFP (Fig. 8B). Las células transfectadas positivamente con Igp-120-GFP mostraban una fluorescencia verde perinuclear citoplasmática, lo que es consistente con la localización, en compartimentos lisosómicos, tal y como se esperaba (Fig. 8B; Igp-120-GFP). Antes de la inducción de la internalización, mAb 806-Cy3 solo se detectaba en la superficie celular (Fig. 8B; 0 min, mAb 806-Cy3), y no se colocalizaba con Igp-120-GFP (Fig. 8B; 0 min, fusión). Después de un calentamiento a 37°C durante 30 min, se observaron pequeñas estructuras vesiculares intracelulares correspondientes al mAb 806 internalizado (Fig. 8B; 30 min, mAb 806-Cy3). Algunas de estas estructuras se colocalizaban con Igp-120-GFP, sin embargo la mayoría de la señal roja y verde permanecía separada (Fig. 8B; 30 min, fusión). Una incubación más larga a 37°C durante 60 y 120 minutos, dio como resultado una mayor colocalización del mAb 806-Cy3 internalizado y Igp-120-GFP (Fig. 8B; 60-120 min, fusión). Estas observaciones son consistentes con la hipótesis de que mAb 806 pasa inicialmente al compartimento endocítico temprano, pero después de períodos más largos se traslada a compartimentos lisosómicos en donde se acumula.

La internalización de mAb 806 después de la unión al EGFR de2-7 expresado en células U87MG.Δ2-7 también se analizó mediante microscopía electrónica. Después de 5 minutos de incubación a 37°C, partículas de oro, correspondientes a mAb 806, se observaron en estructuras que se asemejaban a cráteres revestidos con clatrina (Fig. 9A y B). También se detectaron partículas de oro en vesículas revestidas de clatrina libres, ubicadas dentro del citoplasma (Fig. 9C). No se observaron partículas de oro en las estructuras que se asemejan a caveolas (Fig. 9D). Después de 10 minutos de captura a 37°C, mAb 806 se localizaba en grandes estructuras vesiculares tubulares que se asemejan a compartimentos endocíticos tempranos (Fig. 9E). Períodos de captura más largos de 30 minutos dieron lugar a la localización de los anticuerpos en estructuras semejantes a cuerpos multivesiculares (Fig. 9F). Estas observaciones son consistentes con los datos de microscopía por inmunofluorescencia, que indicaban una colocalización de mAb 806 con Igp-120 entre 30 y 60 minutos.

#### *Internalización de mAb 806 y 528 en células NR6.Δ2-7.*

Dadas las diferencias en la eficacia terapéutica de los mAbs 806 y 528 frente a xenoinjertos NR6.Δ2-7, se investigaron las características de la internalización de cada anticuerpo en esta línea celular. Además, puesto que las células NR6.Δ2-7 no expresan ningún miembro endógeno de la familia ErbB, en esta línea celular se puede determinar si se requiere la presencia de EGFR wt para la internalización de estos anticuerpos. Las células incubadas con mAb 806-Cy3 a 4°C mostraban una tinción de la membrana sin fluorescencia intracelular, tal y como se esperaba (Fig. 10; mAb 806, 0 min). En contraste con las células U87MG.Δ2-7 (Fig. 8), la tinción de la membrana no fue uniforme. Una tinción más intensa se asoció con uniones de membrana entre las células (Fig. 10; mAb 806, 0 min) y adhesiones focales (Fig. 10; mAb 806, 0 min). Algunas células mostraron muy poca tinción de la membrana (Fig. 10; mAb 806, 0 min). Después de la inducción de la internalización elevando la temperatura a 37°C, se observaron estructuras vesiculares puntiformes, intracelulares características. Estas se acumulaban en un patrón perinuclear (Fig. 10; mAb 528 15-60 min) lo que es consistente con una localización lisosómica rápida. La localización inicial (Fig. 10; mAb 528, 0 min) y la subsiguiente internalización (Fig. 10; mAb 528, 1-60 min) de mAb 528 era idéntica a la de mAb 806. Por tanto, ambos anticuerpos se internalizaban rápidamente en el compartimento lisosómico después de la unión al EGFR de2-7, incluso en ausencia del EGFR wt.

#### **Discusión**

*mAb 528.* Muchos, pero no todos los estudios anteriores han sugerido que el número de EGFR en la superficie celular es un factor que influye en la eficacia de los agentes terapéuticos dirigidos a EGFR, especialmente los TKIs (Tabla 1). Sin embargo, estos experimentos siempre han comparado la actividad antitumoral utilizando diferentes líneas celulares y, por lo tanto, no están controlados con respecto al fondo genético, la presencia de otros miembros de la familia ErbB y la aparición de otros receptores funcionales/cinasas capaces de modular la vía de señalización del EGFR. Además, muchos de estos estudios se han realizado *in vitro*, lo que hemos mostrado que no se correlaciona con la actividad *in vivo*. Aumentando 10 veces el número de EGFR wt, los xenoinjertos de glioma U87MG se convierten de ser resistentes a mAb 528 a sensibles al anticuerpo. Dado que el aumento del número de EGFR wt no alteraba la tasa de crecimiento de los xenoinjertos U87MG, el advenimiento de una actividad antitumoral no era simplemente el resultado de mAb 528 que inhibía una ventaja del crecimiento inducido. La presencia de más EGFR wt dentro de los xenoinjertos U87MG.wtEGFR casi seguro que conducía a una mayor localización de los anticuerpos en el sitio del tumor. Dado que mAb 528 posee una función efectora inmune baja pero medible (25), el aumento del nivel de anticuerpo en el sitio del tumor puede dar como resultado un aumento de la deposición del complemento y del reclutamiento de células inmunes, que contribuyen a la inhibición del crecimiento tumoral. Sin embargo, un papel de la función efectora inmune en el inicio de la actividad antitumoral de mAb 528 parece poco probable, dados nuestros datos con los xenoinjertos U87MG.DK. Estos xenoinjertos tienen tantos sitios de unión a mAb 528 como los xenoinjertos U87MG.wtEGFR, pero no están inhibidos por el anticuerpo. Una posibilidad intrigante es que la hiperexpresión del EGFR wt conduce a una señalización de EGFR independiente del ligando (U87MG parental parece no tener un bucle fuerte autocrino-ligando), lo que a su vez hace que las células se vuelvan más dependientes del sistema de señalización del EGFR. Por lo tanto, los xenoinjertos U87MG.wtEGFR responden a la terapia con mAb 528 porque, a diferencia de la línea celular parental, la vía de señalización de EGFR está activa y es funcional. Por lo tanto, la hiperexpresión de EGFR wt es un marcador sustituto de la dependencia de las células de la señalización de EGFR y por lo tanto es más probable, pero no se garantiza, que tales células respondan a los agentes terapéuticos.

cos de EGFR (26).

Se ha supuesto que la actividad antitumoral de anticuerpos tales como mAb 528 está mediada predominantemente por su capacidad para antagonizar la activación del ligando del EGFR. Dado que mAb 528 inhibía el crecimiento de los xenoinjertos U87MG.wtEGFR en ausencia de una expresión significativa del ligando, se sugiere que otros mecanismos pueden contribuir al efecto antitumoral. Además, mAb 528 mostraba una eficacia significativa contra xenoinjertos que expresaban el EGFR de2-7 independiente del ligando. Esta actividad antitumoral no podía ser el resultado directo de la unión de mAb 528 al EGFR wt endógeno, coexpresado en estos xenoinjertos, ya que no inhibía el crecimiento de xenoinjertos U87MG parentales o U87MG.DK, en donde ambos expresan niveles idénticos del EGFR wt. Excluyendo la función efectora inmune, los mecanismos antitumorales alternativos podrían incluir una regulación a la baja del receptor, una inducción de una señalización inapropiada, una translocación del receptor a dominios de membrana inadecuados y una interferencia con la dimerización del receptor y/o la oligomerización. De hecho, algunos TKIs dirigidos al EGFR no solo actúan inhibiendo la actividad cinasa, sino que inducen dímeros inactivos capaces de "limpiar" el exceso de ligando, un mecanismo antitumoral inesperado (27).

Curiosamente, un estudio inmunohistoquímico reciente que analiza la expresión de EGFR en pacientes con cáncer de colon que muestran una respuesta diferencial a C225, describía que varios pacientes "negativos" para EGFR tenían respuestas clínicas frente a este anticuerpo específico de EGFR (26). Es de suponer que estos pacientes tienen niveles de EGFR por debajo de la sensibilidad de detección del análisis inmunohistoquímico, aunque el EGFR presente se activa y contribuye al crecimiento tumoral/supervivencia. Esta observación sugiere que la activación de EGFR es al menos tan importante, si no más, que simplemente el nivel de expresión de EGFR. Nuestros datos que muestran que mAb 528 no inhibía el crecimiento de xenoinjertos U87MG que expresaban una versión sin actividad cinasa de este receptor truncado (U87MG.DK), apoyan la opinión de que la eficacia de los anticuerpos específicos de EGFR está íntimamente asociada con receptores con la cinasa activa. Como se ha sugerido anteriormente, la hiperexpresión de EGFR representa un mecanismo por el que puede tener lugar esta activación; la expresión de un mutante constitutivamente activo, tal como el EGFR de2-7 indica otro. Esta activación continua del EGFR hace que las células se conviertan en "adictas" a la señalización de EGFR, lo que a su vez las hace volverse susceptibles a la terapia anti-EGFR. Este concepto es análogo a la situación en pacientes con cáncer de pulmón, en donde la mayoría de los pacientes que responden a TKIs específicos de EGFR son portadores de mutaciones activadoras en el dominio cinasa de EGFR (28).

La capacidad de mAb 528 para inhibir el crecimiento de xenoinjertos U87MG.DY2 o DY5 pone de relieve la importancia de un dominio de cinasa activa en oposición a la autofosforilación como determinante de la eficacia. Por lo tanto, es una cinasa activa la que determina la respuesta a una terapia con anticuerpos, no la interacción directa de tirosinas fosforiladas con un adaptador o moléculas de señalización. Una conclusión de este resultado es que mAb 528 aparentemente inhibe el crecimiento de xenoinjertos U87MG.Δ2-7/DY2/DY5 mediante la prevención de la transfosforilación de una diana aguas abajo (Fig. 11). Puesto que todas estas líneas celulares obtenidas a partir de U87MG coexpresan el EGFR wt, y dado que recientemente hemos demostrado que el EGFR de2-7 puede formar dímeros y fosforilar el EGFR wt (29), el EGFR wt es un candidato probable para esta diana secundaria. Esta propuesta se apoya en el hecho de que las células NR6 que expresan el EGFR de2-7 en ausencia del EGFR wt eran completamente refractarias a los efectos antitumorales de mAb 528. Tomados en conjunto, estos estudios sugieren que mAb 528, junto con sus propiedades de bloqueo de ligando, actúa en parte evitando la homodimerización del EGFR wt hiperexpresado y la heterodimerización entre el EGFR wt y EGFR de2-7. Curiosamente, la estructura de C225 (un anticuerpo muy similar al mAb 528) que forma un complejo con el EGFR, sugiere que, aparte de un bloqueo del ligando, este anticuerpo puede evitar la dimerización de EGFR inhibiendo parcialmente el desanclaje de EGFR (30).

*mAb 806.* La capacidad de respuesta de las líneas celulares obtenidas a partir de U87MG *in vivo* frente a mAb 806 se ajusta completamente a la observada con mAb 528, lo que indica que se aplican muchos de los principios anteriores, aunque hay algunas diferencias importantes. Este estudio confirma y amplía nuestros estudios previos, demostrando que la reactividad de mAb 806 está asociada con la activación de EGFR (16). A diferencia de mAb 528, y todos los anticuerpos actuales en la evaluación clínica, mAb 806 no se dirige a un tejido normal como el hígado, ya que la activación del EGFR es extremadamente baja o no detectable en órganos tales como el hígado. Una gran cantidad de factores pueden estimular la activación de EGFR dentro de los tumores (véase (31) para una revisión). Hemos confirmado que al menos tres de ellos, hiperexpresión de EGFR (15), mutación (17) y presencia de un bucle autocrino (Johns et al., en preparación) pueden conducir a la reactividad de mAb 806. La asociación de la hiperexpresión de EGFR wt para la actividad antitumoral de mAb 806 está íntimamente relacionada con su especificidad única ya que la hiperexpresión aumenta la forma transitoria, no anclada al EGFR, reconocida por mAb 806, a través de múltiples mecanismos, tales como la activación independiente de ligando y las alteraciones en la glicosilación de EGFR (21). Dado que el trabajo que se describe en esta memoria, junto con los datos clínicos obtenidos con TKIs específicos de EGFR, sugieren que los inhibidores de EGFR son más eficaces contra tumores con un EGFR activado, la capacidad única de mAb 806 para reconocer específicamente formas activadas del EGFR, hace que éste sea un agente terapéutico ventajoso.

La formación de modelos moleculares sugiere que la unión de mAb 806 impediría la formación de dímeros activos de EGFR wt (14), una hipótesis que hemos confirmado mediante la resolución de la estructura cristalina de mAb 806 formando un complejo con su epítipo (Johns et al., en preparación). A pesar de que este mAb 806 no inhibe signifi-

cativamente la fosforilación del EGFR de2-7 o wt en modelos de xenoinjertos (16), sugiere firmemente que cualquier mecanismo de acción propuesto para mAb 806 incluye más de un bloqueo de la autofosforilación. Además, dianas conocidas aguas abajo de la señalización de EGFR tales como Akt y MAPK, tampoco están inhibidas por mAb 806 (T.G. Johns, observaciones no publicadas). Concordando con esta hipótesis, mAb 806 muestra actividad antitumoral fuerte frente a xenoinjertos U87MG.DY2/DY5, dos modelos en los que la autofosforilación no es relevante. La falta de eficacia de mAb 806 contra los xenoinjertos U87MG.DK, pone de relieve que la presencia de una cinasa activa y los eventos de transfosforilación (Fig. 11) son factores decisivos que conducen a la sensibilidad. En contraste con mAb 528, mAb 806 era capaz de inhibir el crecimiento de células NR6 que expresaban el EGFR de2-7, en ausencia de otros miembros de la familia ErbB. Este resultado indica que mAb 806 altera potencialmente otras dianas de la transfosforilación de EGFR de2-7, distintas del EGFR wt. Curiosamente, no había ninguna diferencia obvia en la internalización y el seguimiento intracelular de mAb 806 y 528 después de la unión de cualquiera de los anticuerpos a la superficie de EGFR de2-7 en células NR6, lo que sugiere que el tráfico de los anticuerpos no contribuía a la diferencia de la eficacia en este modelo de xenoinjerto.

En esta memoria se presenta por primera vez que Y845 está fosforilado sobre EGFR de2-7 de una manera dependiente de Src. Por lo tanto, se examinó si la interacción entre el EGFR de2-7 y Src era una diana potencial de la actividad de mAb 806. Si mAb 806 mediaba en parte su actividad antitumoral mediante la inhibición de esta interacción, entonces la alteración genética de esta interacción usando un DNSrc debería reducir la eficacia de mAb 806. En contraste con esta posibilidad, la presencia de un DNSrc mejoraba enormemente la actividad antitumoral de mAb 806. Esto sugiere que Src tiene un papel en la limitación de la eficacia de los agentes terapéuticos de EGFR y proporciona una justificación para el uso de inhibidores de Src y EGFR en combinación.

### **Conclusión**

Estos estudios demuestran la relevancia de los estudios *in vivo* para analizar la sensibilidad de líneas celulares frente a agentes terapéuticos de EGFR. A diferencia de estudios anteriores, hemos sido capaces de llevar a cabo la mayor parte de nuestro análisis en el mismo fondo genético, haciendo que la variable predominante fuera la naturaleza del EGFR. Con esta metodología mostramos de manera concluyente la importancia del número de receptores para la eficacia. Aunque el número de EGFR está relacionado con la susceptibilidad terapéutica de EGFR, este factor por sí solo no es suficiente, ya que el receptor también debe contener una cinasa funcional. De hecho, aunque un tanto intuitivo, este trabajo muestra formalmente que "forzar" una línea celular para que utilice la señalización de EGFR, ya sea por la hiperexpresión de EGFR wt o la expresión de un mutante constitutivo activo, puede hacer que cambie de no ser capaz de responder a ser capaz de responder. Por lo tanto, el EGFR no solo debe estar presente en la superficie celular, sino que debe contribuir significativamente al crecimiento y la supervivencia de la célula. Por lo tanto, las estrategias para la selección de pacientes que van a responder al agente terapéutico de EGFR se deben dirigir a la identificación de tumores que sean muy dependientes del EGFR, no solamente a la presencia o ausencia de la proteína del receptor. Esta tarea puede ser relativamente sencilla en algunos casos, tales como cuando están presentes los EGFR de2-7, una amplificación del gen *EGFR* o mutantes que activan la cinasa, pero es claramente más difícil en casos en los que el EGFR wt es genéticamente normal. En estos casos la compleja interacción de múltiples cinasas del receptor dificulta la identificación de aquellos tumores que dependen realmente de la señalización del EGFR. A largo plazo, un perfil detallado de la expresión de genes diana que aún no se han identificado, únicos para cada cinasa del receptor, puede ser el único enfoque viable para hacer frente a este problema.

### **Referencias**

1. Arteaga CL. Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Seminars in Oncology* 2002; 29: 3-9.
2. Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist* 2002; 4: 2-8.
3. Mendelsohn J. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20: 1S-13S.
4. Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 2000; 60: 1383-7.
5. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, et al. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 2965-9.
6. Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, 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: 8602-6.
7. Tang CK, Gong XQ, Moscatello DK, Wong AJ, Lippman ME. Epidermal growth factor receptor VIII enhances tumorigenicity in human breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 3081-7.
8. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, et al. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioblastoma.

- ma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 7727-31.
9. Baselga J, Pfister D, Cooper MR, et al. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol* 2000; 18: 904-14.
- 5 10. Stragliotto G, Vega F, Stasiecki P, Gropp P, Poisson M, Delattre JY. Multiple infusions of anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibody (EMD 55,900) in patients with recurrent malignant gliomas. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 636-40.
11. Lynch DH, Yang XD. Therapeutic potential of ABX-EGF: a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for cancer treatment. *Semin Oncol* 2002; 29: 47-50.
- 10 12. Siegel-Lakhai WS, Beijnen JH, Schellens JH. Current knowledge and future directions of the selective epidermal growth factor receptor inhibitors erlotinib (Tarceva) and gefitinib (Iressa). *Oncologist* 2005; 10: 579-89.
13. Johns TG, Stockert E, Ritter G, et al. Novel monoclonal antibody specific for the de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) that also recognizes the EGFR expressed in cells containing amplification of the EGFR gene. *Int J Cancer* 2002; 98: 398-408.
- 15 14. Johns TG, Adams TE, Cochran JR, et al. Identification of the Epitope for the Epidermal Growth Factor Receptor-specific Monoclonal Antibody 806 Reveals That It Preferentially Recognizes an Untethered Form of the Receptor. *J Biol Chem* 2004; 279: 30375-84.
15. Luwor RB, Johns TG, Murone C, et al. Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either the de2-7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) but not wild-type EGFR. *Cancer Res* 2001; 61: 5355-61.
- 20 16. Perera RM, Narita Y, Furnari FB, et al. Treatment of human tumor xenografts with monoclonal antibody 806 in combination with a prototypical epidermal growth factor receptor-specific antibody generates enhanced antitumor activity. *Clinical Cancer Research* 2005; 11: 6390-9.
- 25 17. Mishima K, Johns TG, Luwor RB, et al. Growth suppression of intracranial xenografted glioblastomas overexpressing mutant epidermal growth factor receptors by systemic administration of monoclonal antibody (mAb) 806, a novel monoclonal antibody directed to the receptor. [La fe de erratas aparece en *Cancer Res* 2001 Oct 15;61(20):7703-5]. *Cancer Research* 2001; 61: 5349-54.
18. Kawamoto T, Sato JD, Le A, Polikoff J, Sato GH, 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: 1337-41.
- 30 19. Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, et al. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 1997; 272: 2927-35.
20. Kwok TT, Sutherland RM. Differences in EGF related radiosensitisation of human squamous carcinoma cells with high and low numbers of EGF receptors. *British Journal of Cancer* 1991; 64: 251-4.
- 35 21. Johns TG, Mellman I, Cartwright GA, et al. The antitumor monoclonal antibody 806 recognizes a high-mannose form of the EGF receptor that reaches the cell surface when cells over-express the receptor. *Faseb J* 2005; 19: 780-2.
22. Johns TG, Luwor RB, Murone C, et al. Antitumor efficacy of cytotoxic drugs and the monoclonal antibody 806 is enhanced by the EGF receptor inhibitor AG 1478. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 15871-6.
- 40 23. Pruss RM, Herschman HR. Variants of 3T3 cells lacking mitogenic response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 3918-21.
24. Ishizawa R, Parsons SJ. c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell* 2004; 6: 209-14.
25. Masui H, Moroyama T, Mendelsohn J. Mechanism of antitumor activity in mice for anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies with different isotypes. *Cancer Res* 1986; 46: 5592-8.
- 45 26. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1803-10.
27. Lichtner RB, Menrad A, Sommer A, Klar U, Schneider MR. Signaling-inactive Epidermal Growth Factor Receptor/Ligand Complexes in Intact Carcinoma Cells by Quinazoline Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Res* 2001; 61: 5790-5.
- 50

28. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129-39.
29. Luwor RB, Zhu HJ, Walker F, et al. The tumor-specific de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes cells survival and heterodimerizes with the wild-type EGFR. *Oncogene* 2004; 23: 6095-104.
- 5 30. Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 2005; 7: 301-11.
31. Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006; 366: 2-16.
- 10 32. Bos M, Mendelsohn J, Kim YM, Albanell J, Fry DW, Baselga J. PD153035, a tyrosine kinase inhibitor, prevents epidermal growth factor receptor activation and inhibits growth of cancer cells in a receptor number-dependent manner. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 2099-106.
33. Perera AD, Kleymenova EV, Walker CL. Requirement for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene for functional epidermal growth factor receptor blockade by monoclonal antibody C225 in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1518-23.
- 15 34. Hambek M, Solbach C, Schnuerch HG, et al. Tumor necrosis factor alpha sensitizes low epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing carcinomas for anti-EGFR therapy. *Cancer Res* 2001; 61: 1045-9.
35. Christensen JG, Schreck RE, Chan E, et al. High levels of HER-2 expression alter the ability of epidermal growth factor receptor (EGFR) family tyrosine kinase inhibitors to inhibit EGFR phosphorylation *in vivo*. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 4230-8.
- 20 36. Viloria-Petit A, Crombet T, Jothy S, et al. Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies *in vivo*: a role for altered tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 5090-101.
- 25 37. Heimberger AB, Learn CA, Archer GE, et al. Brain tumors in mice are susceptible to blockade of epidermal growth factor receptor (EGFR) with the oral, specific, EGFR-tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3496-502.
38. Chakravarti A, Loeffler JS, Dyson NJ. Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in primary human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Cancer Res* 2002; 62: 200-7.
- 30 39. Motoyama AB, Hynes NE, Lane HA. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* 2002; 62: 3151-8.
40. Magne N, Fischel JL, Dubreuil A, et al. Influence of epidermal growth factor receptor (EGFR), p53 and intrinsic MAP kinase pathway status of tumor cells on the antiproliferative effect of ZD1839 ("Iressa"). *Br J Cancer* 2002; 86: 1518-23.
- 35 41. Bishop PC, Myers T, Robey R, et al. Differential sensitivity of cancer cells to inhibitors of the epidermal growth factor receptor family. *Oncogene* 2002; 21: 119-27.
42. Li B, Chang CM, Yuan M, McKenna WG, Shu HK. Resistance to small molecule inhibitors of epidermal growth factor receptor in malignant gliomas. *Cancer Res* 2003; 63: 7443-50.
43. Bianco R, Shin I, Ritter CA, et al. Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2003; 22: 2812-22.
- 40 44. Janmaat ML, Kruyt FA, Rodriguez JA, Giaccone G. Response to epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells: limited antiproliferative effects and absence of apoptosis associated with persistent activity of extracellular signal-regulated kinase or Akt kinase pathways. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2316-26.
- 45 45. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science* 2004.
46. Learn CA, Hartzell TL, Wikstrand CJ, et al. Resistance to tyrosine kinase inhibition by mutant epidermal growth factor receptor variant III contributes to the neoplastic phenotype of glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3216-24.
- 50 47. Halatsch ME, Gehrke EE, Vougioukas VI, et al. Inverse correlation of epidermal growth factor receptor messenger RNA induction and suppression of anchorage-independent growth by OSI-774, an epidermal

growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in glioblastoma multiforme cell lines. J Neurosurg 2004; 100: 523-33.

48. Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. PLoS Med 2005; 2: e73.

5 49. Mellingshoff IK, Wang MY, Vivanco I, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. N Engl J Med 2005; 353: 2012-24.

## **EJEMPLO 2**

### **Estudio de terapia animal del inhibidor de Src dasatinib y terapia con mAb806**

10 Se realizaron estudios de terapia en animales para evaluar los efectos *in vivo* del anticuerpo mAb806 anti-EGFR solo o en combinación con el inhibidor de src dasatinib. Ratones Balb/C nu nu hembra de ocho semanas de edad fueron inyectados con  $1 \times 10^6$  células U87MG. $\Delta 2-7_{\text{SRC}}$  (por cada sitio del tumor) por vía subcutánea. Las células U87MG. $\Delta 2-7_{\text{SRC}}$  expresan una Src activada (mutación Y529F) y el mutante de EGFR  $\Delta 2-7$ . Se generaron dos tumores por ratón mediante la inyección de estas células en cada uno de los flancos derecho e izquierdo. El tratamiento se inició cuando el tamaño medio del tumor alcanzó aproximadamente  $80 \text{ mm}^3$ . Los ratones se trataron tres veces  
15 por semana durante dos semanas, en cuatro grupos de tratamiento, que constaban de 4-5 ratones por grupo. Los grupos de tratamiento fueron los siguientes: (1) control – 100  $\mu\text{l}$  de los diluyentes 4% de DMSO/dH<sub>2</sub>O; (2) dasatinib – 10 mg/kg de fármaco disuelto en los diluyentes; (3) mAb806 -1 mg; (4) mAb806 1 mg y dasatinib 10 mg/kg.

20 *Anticuerpos.* Src se detectó utilizando los anticuerpos monoclonales de ratón v-Src327 (Oncogene Research Products, CA, EE.UU.) o c-Src H-12 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, EE.UU.). El anticuerpo policlonal de conejo PY418 (BioSource International, Inc., CA, EE.UU.) se utilizó para la detección de fosfo-Src.

25 *Construcción de la línea celular U87MG. $\Delta 2-7_{\text{src}}$ .* Una estructura artificial de Src activada (mutación Y529F) se obtuvo de Upstate Technologies (Lake Placid, NY, EE.UU.). Un fragmento Pme1 que contenía el ADNc de Src activada se subclonó en el vector pcDNA3.1/Hygro(+) obtenido de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA), antes de la transfección de U87MG. $\Delta 2-7$  mediante electroporación. Las células se extendieron en placas de 96 pocillos en partes  
alícuotas de 1 ml, con una densidad de aproximadamente  $2 \times 10^4$  células por pocillo, y se incubaron a 37°C durante 48 horas, después de lo cual se añadieron 100  $\mu\text{g/ml}$  de higromicina (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y 400  $\mu\text{g/ml}$  de geneticina (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA).

30 Las células transfectadas se seleccionaron inicialmente mediante análisis FACS para confirmar que la expresión del EGFR  $\Delta 2-7$  se había conservado. A continuación, los clones se sometieron a lisis de células completas o a inmunoprecipitación antes de la transferencia western, usando anticuerpos específicos de Src (v-Src 327, PY418). Varios clones que mostraban un aumento drástico de los niveles de Src total y Src fosforilada (los niveles de Src son muy bajos en la línea celular original) fueron identificados y ampliados.

35 *Modelos de xenoinjertos.* Las células tumorales ( $1 \times 10^6$ ) en 100  $\mu\text{l}$  de PBS se inocularon por vía s.c. en ambos flancos de ratones hembra sin pelo, de 8 semanas de edad (Centro de Investigación Animal, Perth, Australia). Todos los estudios se llevaron a cabo usando modelos de tumores establecidos previamente. El tratamiento se inició una vez que los tumores habían alcanzado un volumen medio de aproximadamente  $80 \text{ mm}^3$ . El volumen del tumor en  $\text{mm}^3$  se determinó usando la fórmula  $(\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$ , en donde la longitud era el eje más largo y la anchura era la medición en ángulos rectos frente a la longitud. Los datos se expresan como el volumen tumoral medio  $\pm$  SE para cada grupo de tratamiento (Figura 12). Todos los datos se analizaron en base a la significación de la prueba t de Student. Los datos también se transformaron en curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y se analizaron mediante  
40 análisis de Wilcoxon usando criterios de valoración duales de ratones moribundos o con un volumen tumoral  $> 1500 \text{ mm}^3$  (Figura 13).

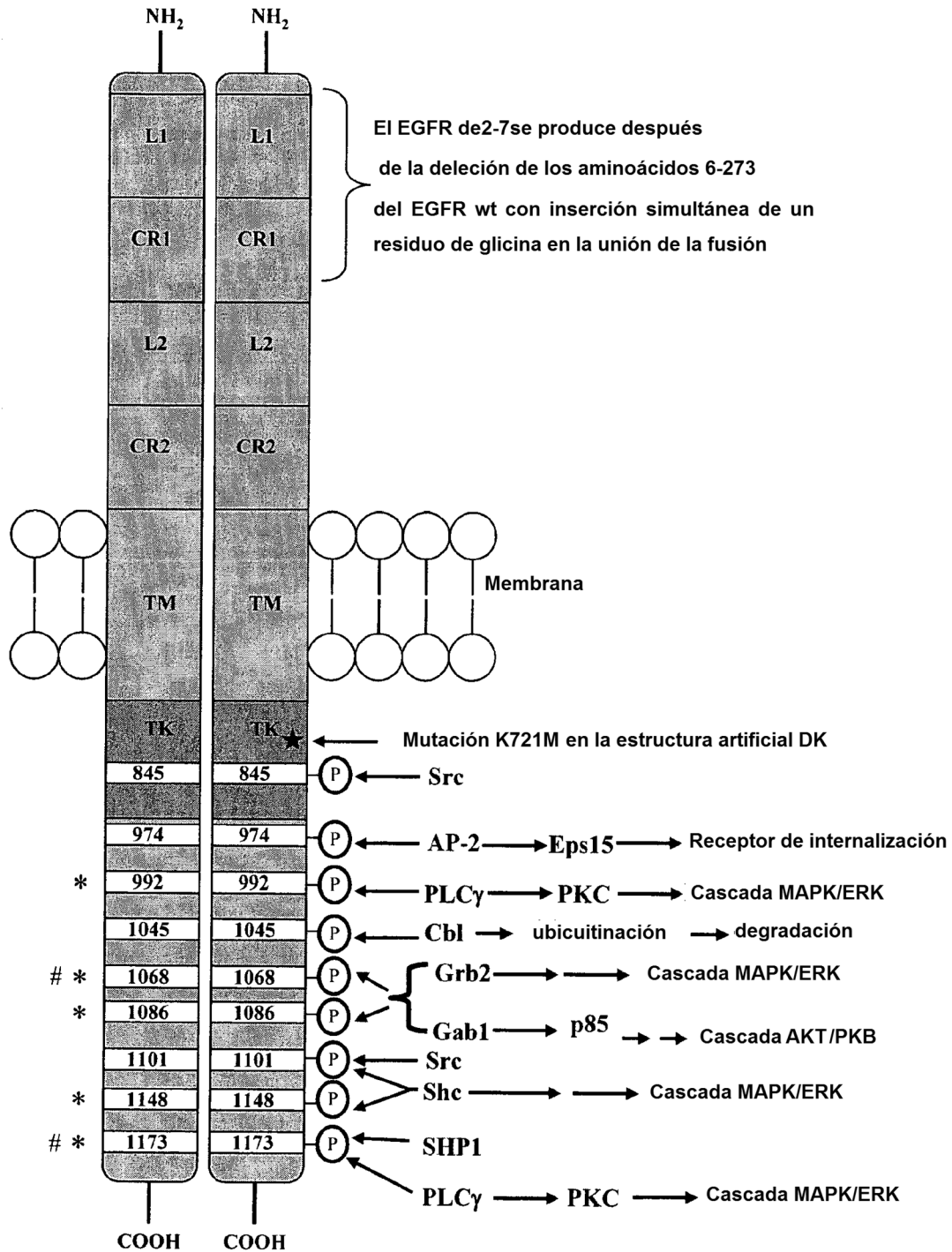
45 El día 33, el crecimiento tumoral del grupo tratado con la combinación mAb806 y dasatinib era significativamente menor que el del grupo tratado solo con mAb 806 ( $p < 0,0076$ ) (Figura 12). Los datos procedentes del experimento de crecimiento tumoral se transformaron en la curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y se analizaron por análisis de Wilcoxon usando criterios de valoración duales de ratones moribundos o con un volumen tumoral  $> 1500 \text{ mm}^3$  (Figura 13). El grupo tratado con la combinación de mAb806 y dasatinib sobrevivió más tiempo que todos los demás grupos (Log Rank  $p < 0,0001$ ).

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-EGFR para uso en un método de tratamiento del cáncer mediado por EGFR en un mamífero, en donde dicho método comprende administrar a dicho mamífero, dicho anticuerpo anti-EGFR y un inhibidor de src, en donde dicho inhibidor de src y dicho anticuerpo anti-EGFR se administran simultáneamente, en combinación o uno después de otro en serie, y en donde dicho anticuerpo anti-EGFR es mAb806 o un fragmento del mismo que se une a antígeno, y en donde dicho inhibidor de src es dasatinib.
2. Un inhibidor de src para uso en un método de tratamiento del cáncer mediado por EGFR en un mamífero, en donde dicho método comprende administrar dicho inhibidor de src y un anticuerpo anti-EGFR a dicho mamífero, en donde dicho inhibidor de src y dicho anticuerpo anti-EGFR se administran simultáneamente, en combinación o uno después de otro en serie, y en donde dicho anticuerpo anti-EGFR es mAb806 o un fragmento del mismo que se une a antígeno, y en donde dicho inhibidor de src es dasatinib.
3. El anticuerpo anti-EGFR para uso según la reivindicación 1, o el inhibidor de src para uso según la reivindicación 2, en donde el tratamiento del cáncer en un mamífero comprende bloquear o reducir el crecimiento tumoral.
4. El anticuerpo anti-EGFR para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o el inhibidor de src para uso según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde dicho cáncer se selecciona entre glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer del sistema nervioso, cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer genitourinario, cáncer de vejiga, cáncer de colon, melanomas, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cánceres cerebrales y cánceres hematológicos.
5. El anticuerpo anti-EGFR para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, o el inhibidor de src para uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde dicho mAb806 o un fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.
6. El anticuerpo anti-EGFR para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-5, o el inhibidor de src para uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en donde dicho mAb806 o un fragmento del mismo está conjugado o fijado a un agente de ablación química, una toxina, un inmunomodulador, una citocina, un agente citotóxico o un agente quimioterapéutico.
7. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-EGFR y al menos un inhibidor de src en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en donde dicho anticuerpo anti-EGFR es mAb806 o un fragmento del mismo que se une a antígeno y en donde dicho inhibidor de src es dasatinib.
8. La composición farmacéutica según la reivindicación 7, en donde dicho mAb806 o un fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.
9. La composición farmacéutica según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde dicho mAb806 o un fragmento del mismo está conjugado o fijado a un agente de ablación química, una toxina, un inmunomodulador, una citocina, un agente citotóxico o un agente quimioterapéutico.

Homodímero de EGFR

FIGURA 1



\* Residuos de tirosina mutados en la estructura artificial DY5

# Residuos de tirosina mutados en la estructura artificial DY2

FIGURA 2A

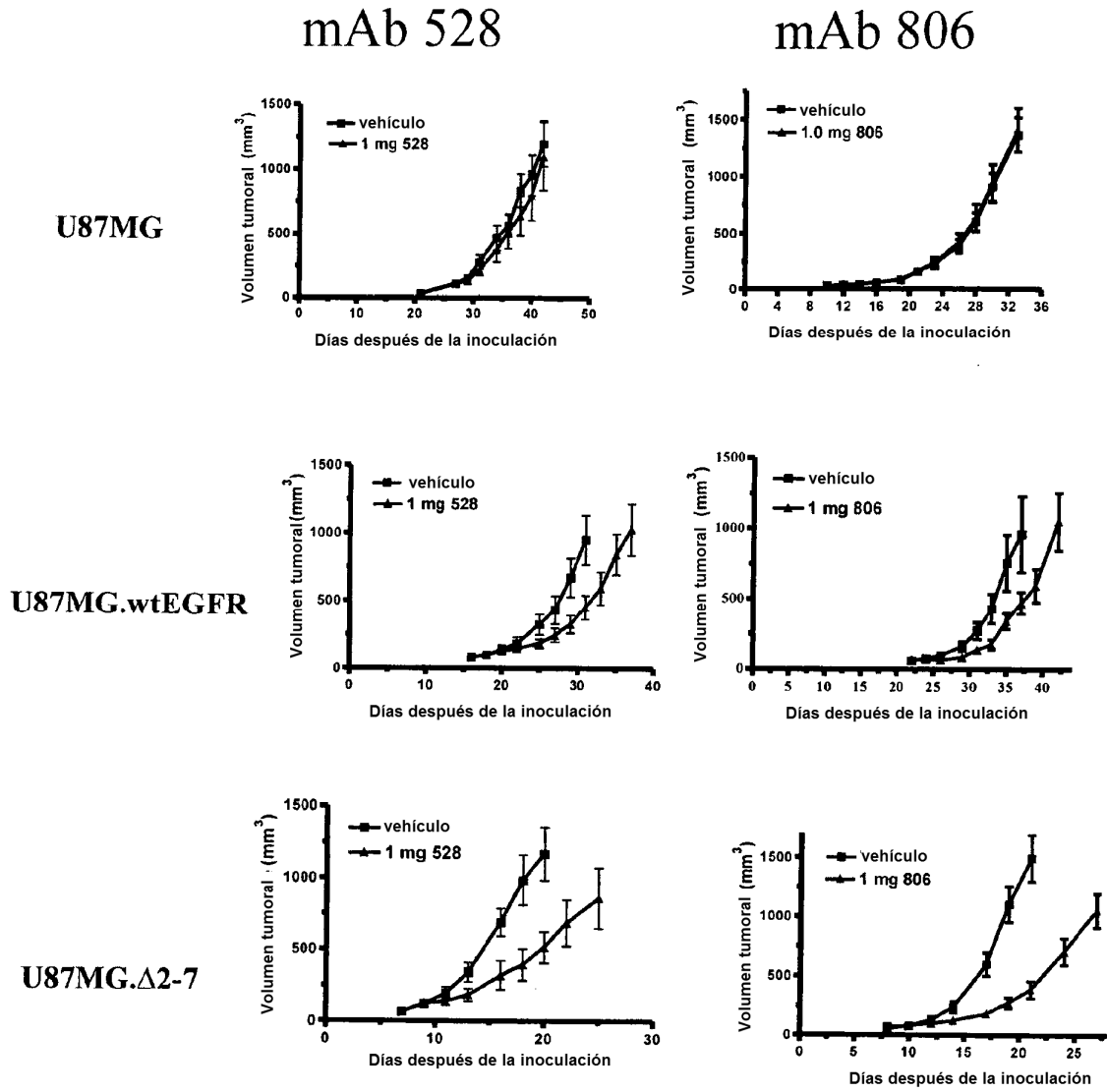


FIGURA 2B

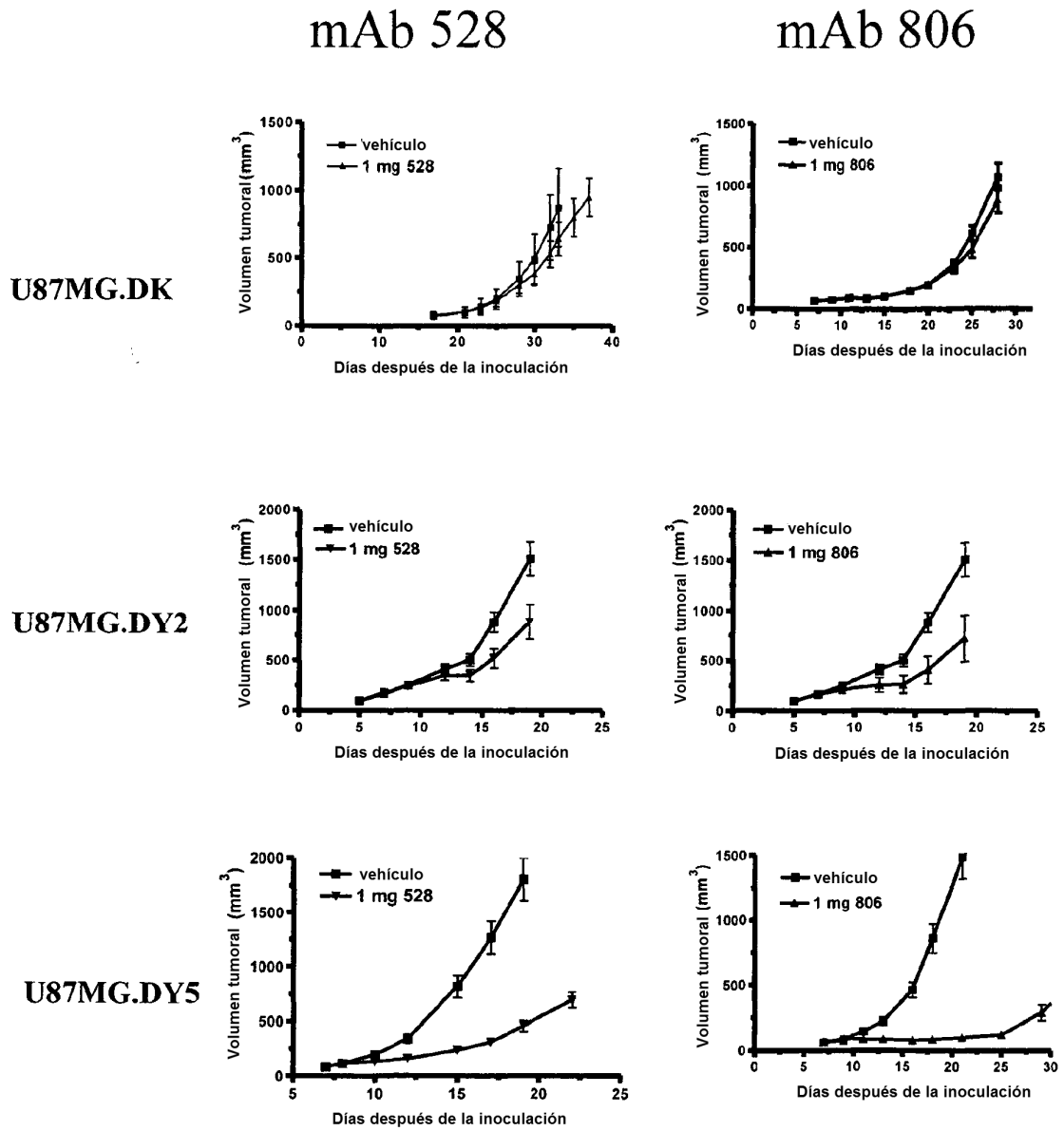


FIGURA 3

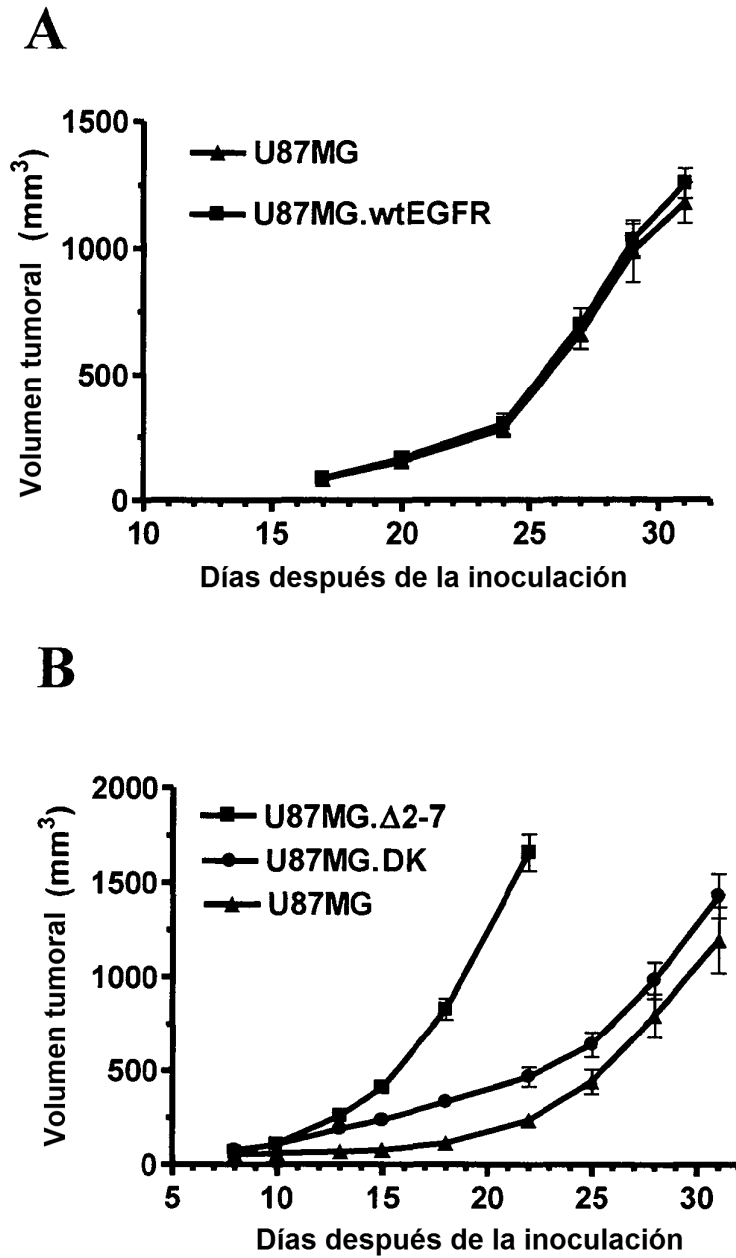
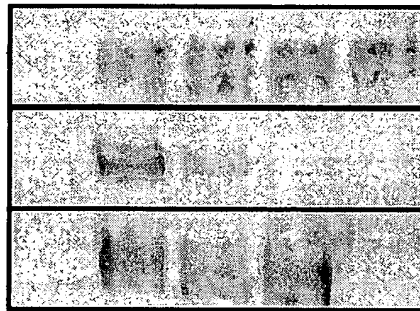


FIGURA 4

**A**

IP: IgG2b 528 806 528 528



IB: pTyr 1045

IB: pTyr 1173

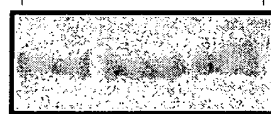
IB: EGFR

Línea celular : Δ2-7 Δ2-7 Δ2-7 DK DY5

*In vitro*

**B**

IP: 528



IB: mAb 806

Línea celular : Δ2-7 DK DY5

*In vitro*

FIGURA 5

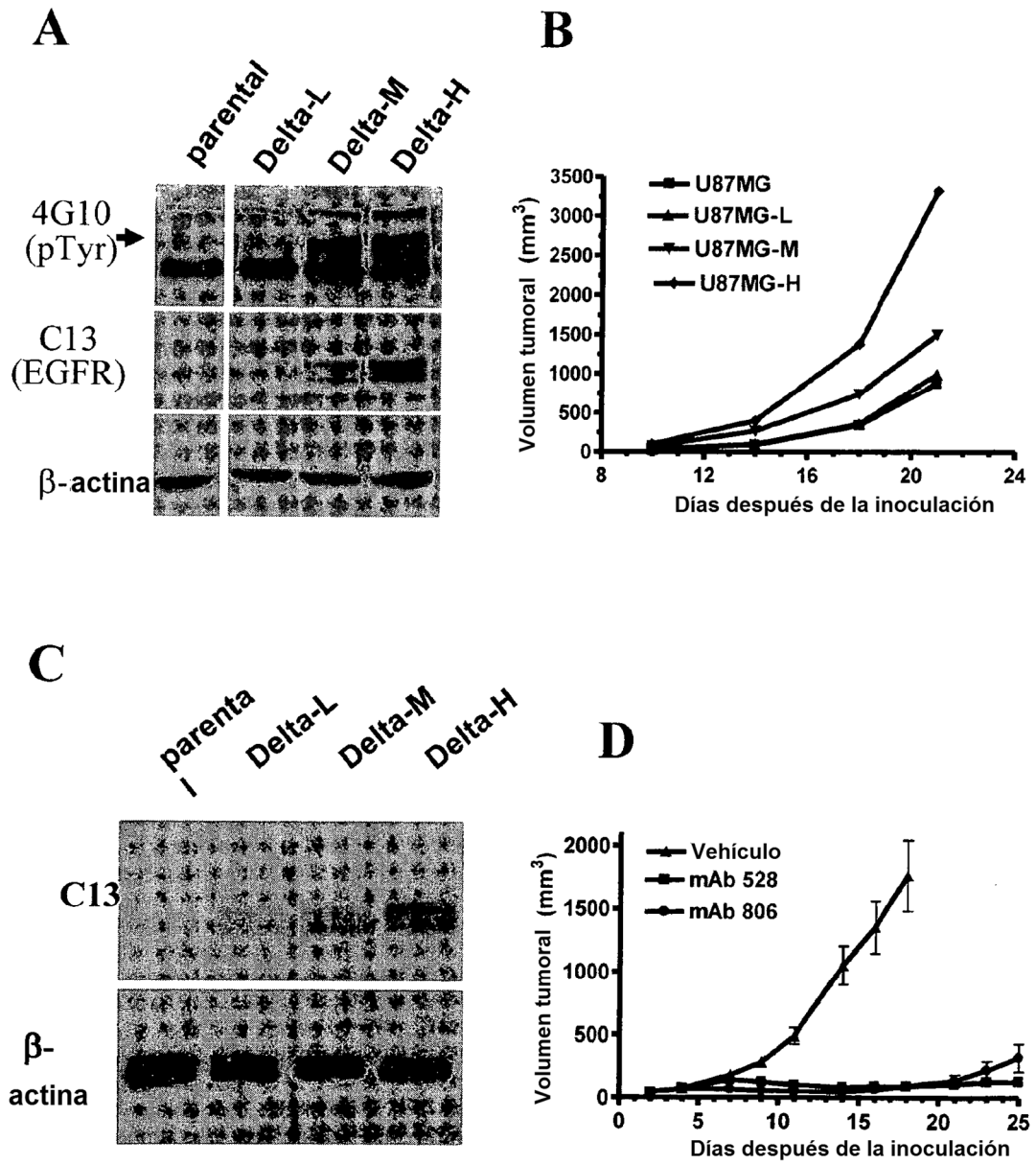


FIGURA 6

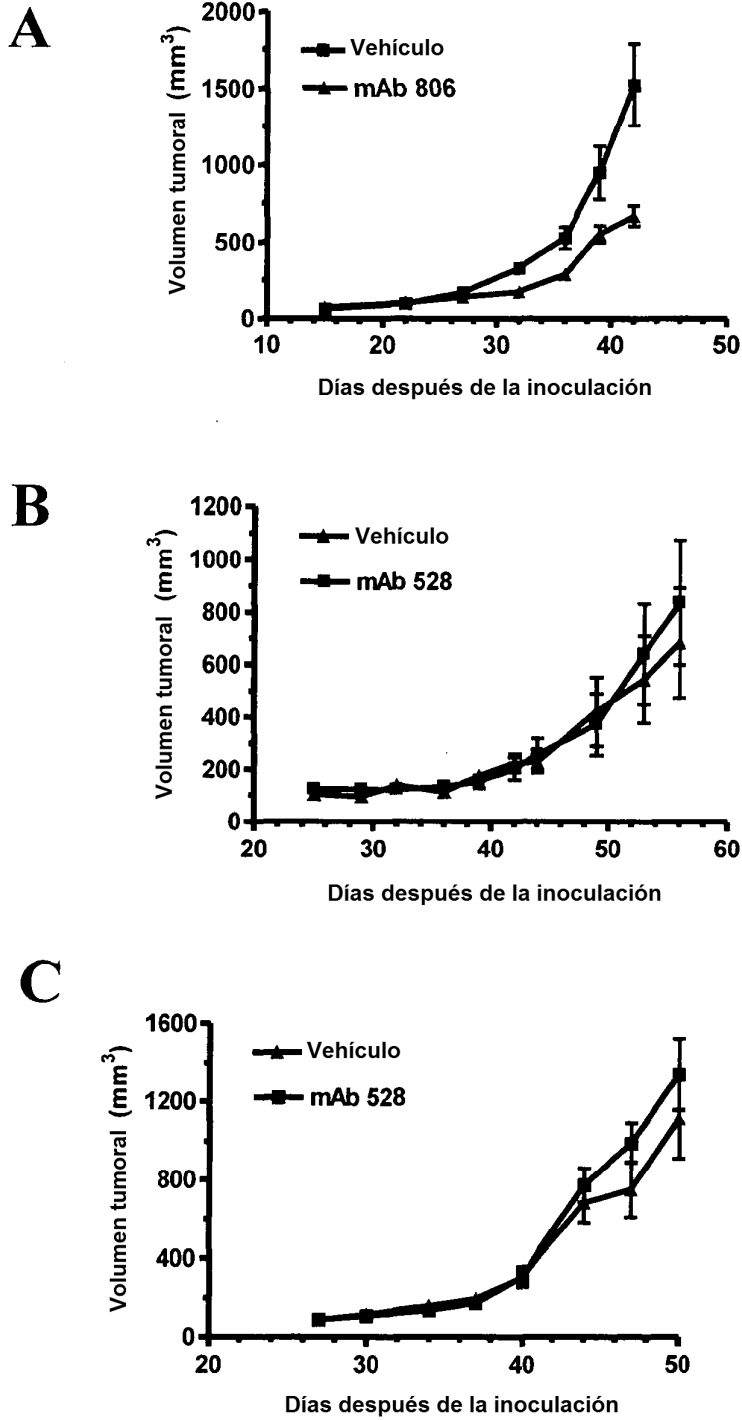
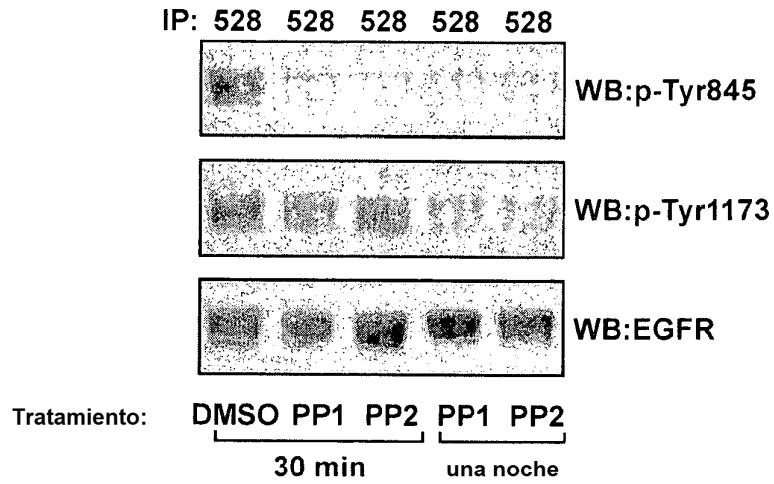
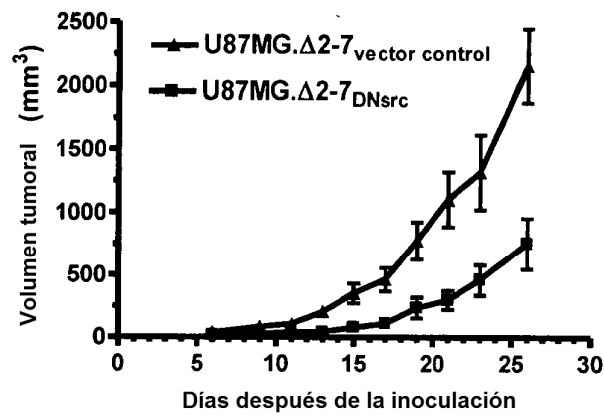


FIGURA 7

**A**



**B**



**C**

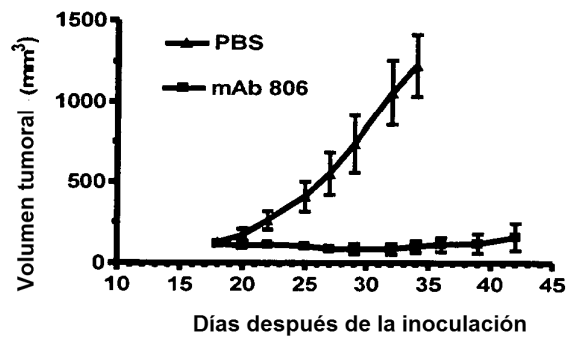


FIGURA 8

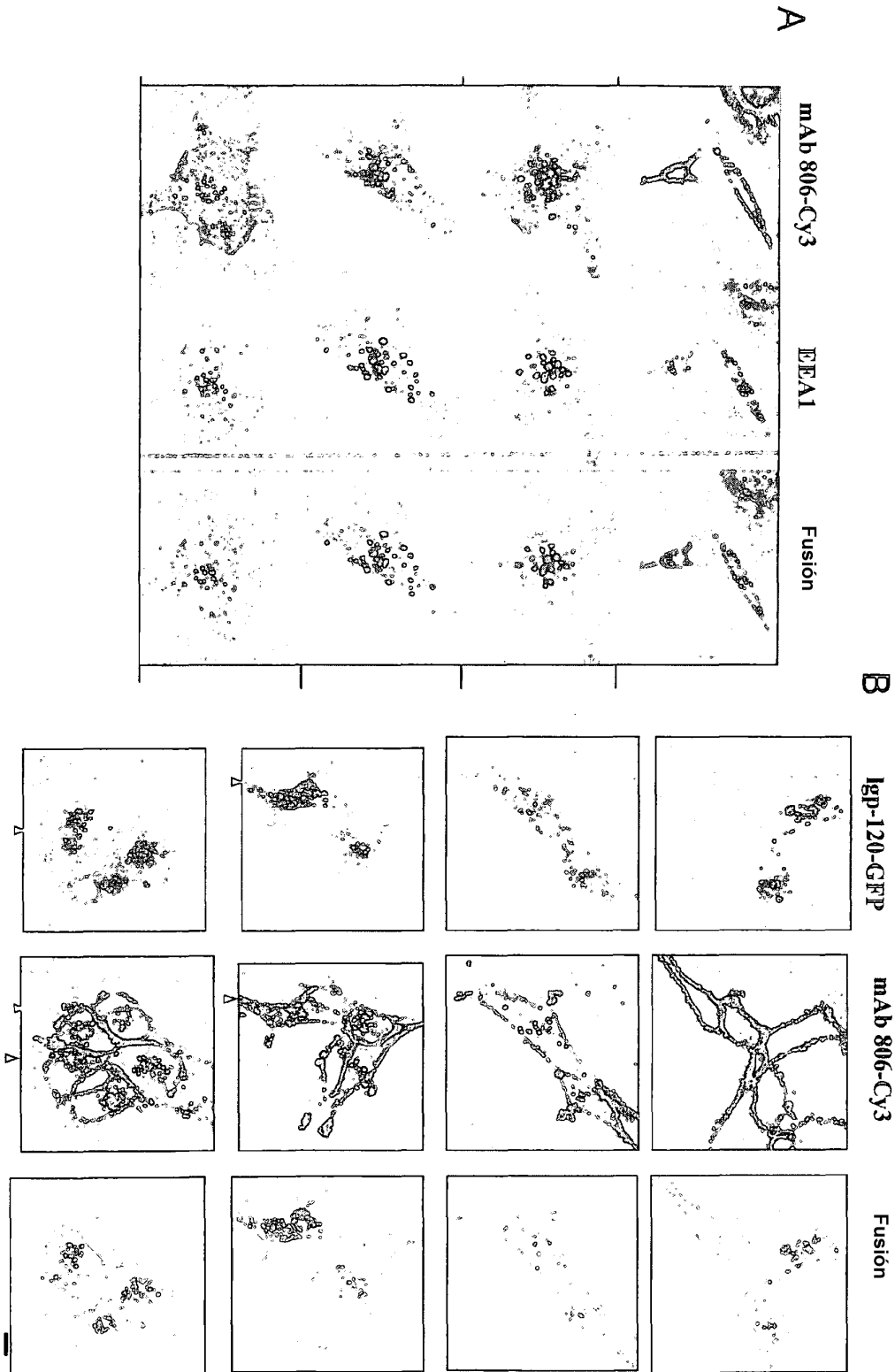


FIGURA 9

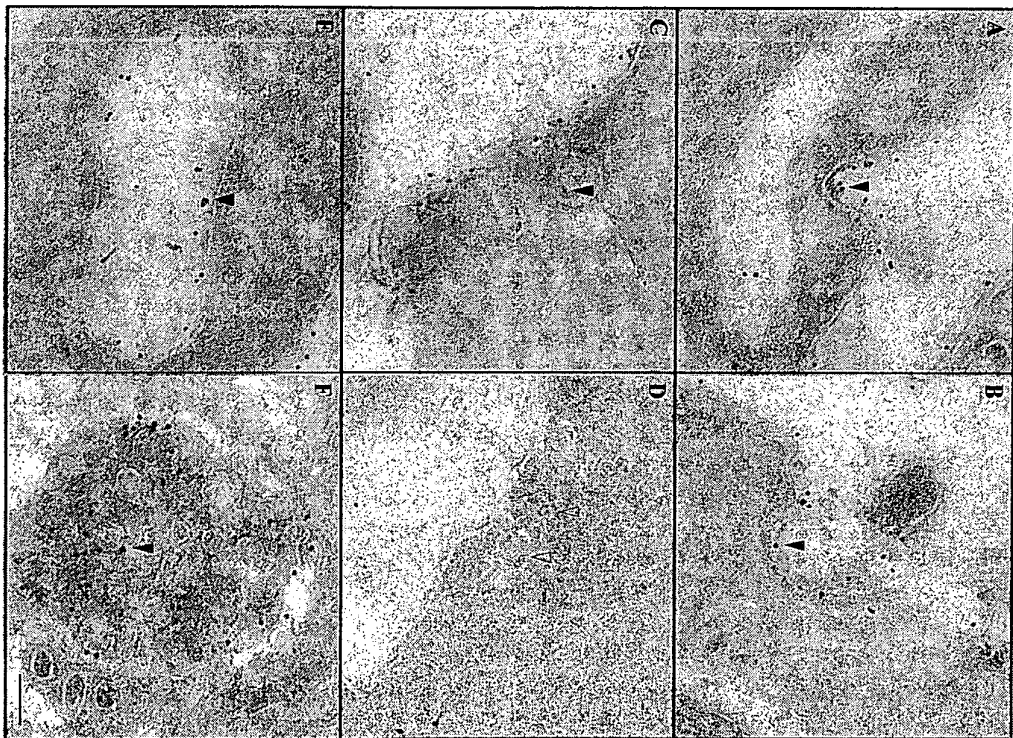
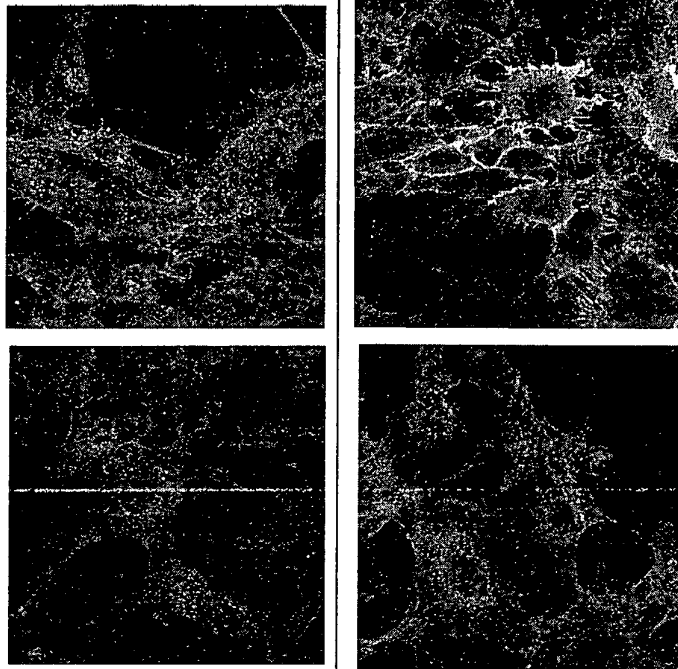
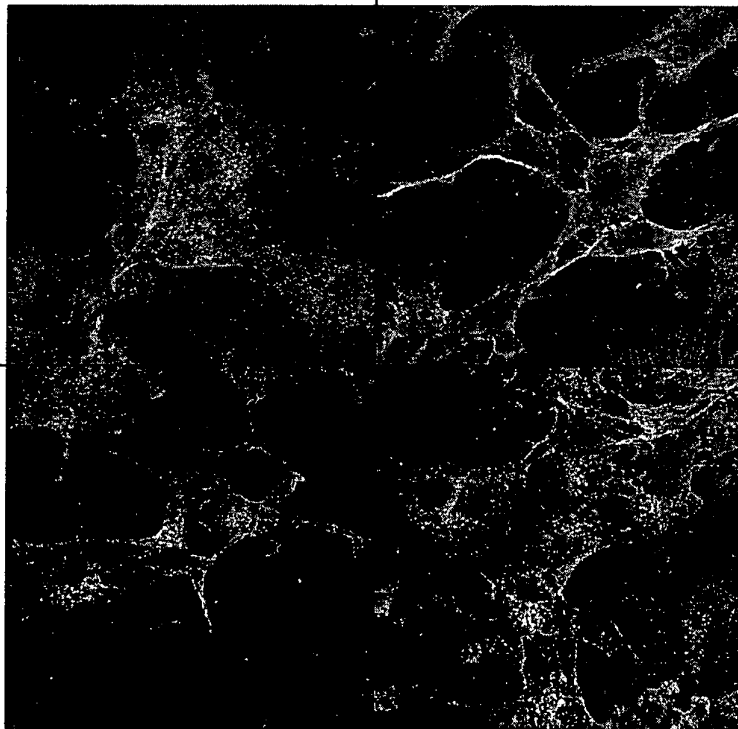


FIGURA 10



mAb 806



mAb 528

FIGURA 11

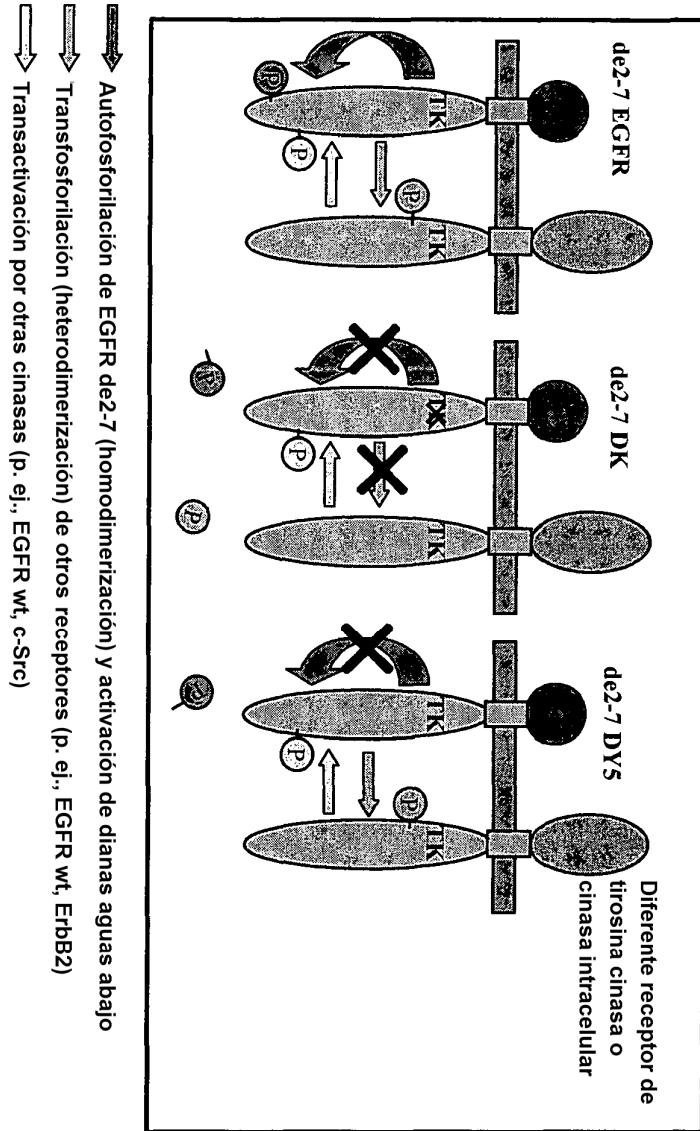


FIGURA 12

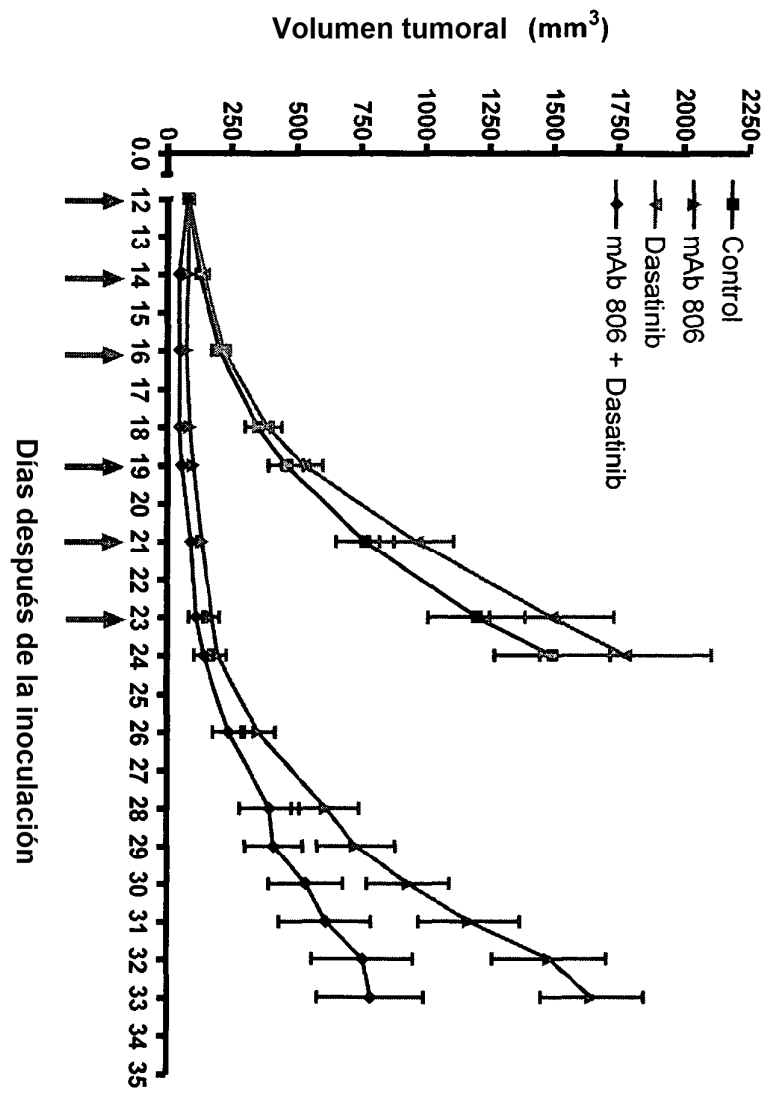


FIGURA 13

**Análisis de curva de supervivencia  
(Tumores  $\geq 1500 \text{ mm}^3$ ):**

