

El anticuerpo 7A7: una nueva herramienta para la evaluación preclínica de terapias antimetastásicas específicas por el receptor del factor de crecimiento epidérmico

✉ Greta Garrido¹, Belinda Sánchez¹, Hilda M Rodríguez², Pablo Lorenzano³, Ailem Rabasa¹, Irene Beausoleil¹, Armando López¹, Daniel F Alonso³, Rolando Pérez¹, Luis E Fernández¹

¹Centro de Inmunología Molecular, CIM
Calle 216 esq. 15, CP 11 600, Atabey, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba

²Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología
Calle 29 esq. F, CP 10 400, Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba

³Universidad Nacional de Quilmes
Bernal B1876BXD, Buenos Aires, Argentina
E-mail: greta@cim.sld.cu

RESUMEN

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés *epidermal growth factor receptor*) es considerado uno de los blancos principales para el tratamiento de los tumores de origen epitelial. Se han acumulado evidencias de que este receptor puede desempeñar un papel importante en la diseminación metastásica. El Centro de Inmunología Molecular (CIM) ha sido pionero en el desarrollo de este nuevo concepto terapéutico, y ha generado diferentes agentes anti-EGFR que se encuentran en fases de evaluación preclínica y clínica. Un ejemplo de ello es el anticuerpo monoclonal (AcM) h R3, utilizado para el tratamiento de pacientes con tumores metastásicos. Los mecanismos asociados al efecto antimetastático de los AcM anti-EGFR no se han dilucidado totalmente, ya que los estudios han sido en ratones atímicos trasplantados con tumores humanos, donde no se puede analizar la participación de las células T. Tras esta investigación se obtuvo por primera vez un AcM capaz de reconocer el dominio extracelular del EGFR murino. Este AcM nos permitió confirmar el potente efecto antimetastático de los AcMs anti-EGFR en ratones inmunocompetentes. Se demostró que la inhibición de la señalización por el EGFR contribuye a este fenómeno, mediante efectos antiproliferativos, antimigratorios y proapoptóticos, y sugiere que la inducción de respuestas citotóxicas por la región constante de este AcM es un mecanismo que puede incrementar su potencial antitumoral. Este estudio constituye el primer reporte sobre la dependencia de un AcM anti-EGFR de la función de las células T-CD4⁺ y CD8⁺ para ejercer su efecto antimetastático.

Introducción

A pesar del progreso de las ciencias médicas, el cáncer sigue siendo un grave problema de salud para el hombre en este nuevo milenio. La causa principal de muerte por cáncer lo constituye la formación de nichos metastásicos. El fenómeno de metástasis es un proceso secuencial, que comienza cuando las células tumorales se separan del tumor primario y viajan a través del torrente sanguíneo, colonizando órganos distantes. De este modo, resulta evidente que los medios terapéuticos disponibles en la práctica médica no son particularmente eficaces para evitar la metástasis. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés *epidermal growth factor receptor*) y sus ligandos están expresados en todos los tipos celulares, con excepción de las células de origen hematopoyético. En la mayoría de los tumores humanos de origen epitelial se ha detectado un incremento de la expresión de estas proteínas [1]. Estudios preclínicos han demostrado que los lazos de activación autocrina y paracrina, que involucran al EGFR y sus ligandos, regulan el crecimiento, la supervivencia y la habilidad para generar metástasis en las células tumorales [2]. Como resultado de estas observaciones, se han identificado antagonistas potentes y selectivos de la señalización a través del EGFR, que se encuentran actualmente bajo investigaciones clínicas [3]. Entre estos, los anticuerpos monoclonales (AcM) específicos por este receptor se están evaluando en pacientes con tumores metastásicos, con resultados

alentadores [4]. Un ejemplo lo constituye el AcM h-R3 generado en el Centro de Inmunología Molecular (CIM), registrado en Cuba por el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) para su uso en pacientes con tumores avanzados de cabeza y cuello [5].

Sin embargo, los mecanismos involucrados en la actividad antimetastática de los agentes anti-EGFR solo se han dilucidado parcialmente. La principal limitante de los estudios es que han sido en ratones atímicos trasplantados con tumores humanos. En tales escenarios, es posible determinar la contribución al efecto antimetastático del bloqueo del EGFR por estos Ac, pero es imposible evaluar si a este efecto tributan mecanismos inmunológicos dependientes de células T. Esta limitación cobra especial relevancia a la luz de recientes informes que demuestran que la acción antitumoral de algunos AcM está mediada por células del sistema inmune adaptativo, lo cual se ha denominado “efecto vacuna” [6, 7]. De hecho, resultados provenientes de los ensayos clínicos con el AcM h-R3 indican que la respuesta clínica a este AcM puede tomar varios meses, lo que sugiere que en ella pueden estar contribuyendo efectores de la inmunidad adquirida [5, 8].

Esta importante limitación del estado del arte nos condujo a desarrollar nuevos modelos, que nos permitieran estudiar la capacidad antimetastática de los AcM anti-EGFR y los mecanismos involucrados en tal efecto.

1. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37(4):9-15.

2. Khazaei K, Schirmacher V, Lichtner RB. EGF receptor in neoplasia and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1993; 12:255-74.

3. Pal SK, Pegram M. Epidermal growth factor receptor and signal transduction: potential targets for anti-cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2005; 16:483-94.

4. Rivera F, Vega-Villegas ME, López-Brea MF, Márquez R. Current situation of Panitumumab, Matuzumab, Nimotuzumab and Zalutumumab. *Acta Oncol* 2008; 47:9-19.

5. Crombet T, Osorio M, Cruz T, Roca C, Del Castillo R, Mon R, Iznaga-Escobar N, Figueredo R, et al. Use of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody h-R3 in combination with radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer patients. *J Clin Oncol* 2004; 22:1646-54.

6. Selenko N, Maidic O, Draxler S, Berer A, Jäger U, Knapp W, Stöckl J. CD20 antibody (C2B8)-induced apoptosis of lymphoma cells promotes phagocytosis by dendritic cells and cross-priming of CD8⁺ cytotoxic T cells. *Leukemia* 2001; 15:1619-26.

✉ Autor de correspondencia

Resultados y discusión

Con el objetivo de estudiar el efecto antimetastático de los AcM anti-EGFR y los mecanismos asociados en ratones inmunocompetentes, se generó por primera vez un AcM que reconoce específicamente el dominio extracelular del EGFR murino (DEC-EGFRm). Este AcM de clase IgG y subclase 1, se obtuvo por inmunización de ratones Balb/c con la proteína DEC-EGFRm recombinante (rDEC-EGFRm) formulada en adyuvante de Freund, y se designó como AcM 7A7. La especificidad de reconocimiento del AcM 7A7 se comprobó por su capacidad para inmunoprecipitar la proteína rDEC-EGFRm a partir de sobrenadante de cultivo de las células HEK 293/DEC-EGFRm utilizadas para expresarla. La capacidad del AcM 7A7 de reconocer no solo el DEC-EGFRm, sino también el receptor completo, se confirmó en experimentos de Western Blot y citometría de flujo, en que el AcM 7A7 reconoció células tumorales EGFR-positivas, tales como la variante metastásica del carcinoma pulmonar de Lewis 3LL-D122. A su vez, en experimentos de inmunohistoquímica se observó que el AcM reconoció al EGFR nativo en secciones de piel y tumores EGFR-positivos, provenientes de ratones Balb/c [9].

Los AcM anti-EGFR humano se están evaluando en pacientes con tumores avanzados de diferentes localizaciones, dentro de las que se incluye pulmón. Este tipo de cáncer es uno de los más letales a escala mundial. Se ha reportado que solo uno de cada 10 pacientes que se diagnostican con esta enfermedad sobrevive los cinco años siguientes. El AcM h-R3 se ha usado en pacientes compasionales de cáncer de pulmón de células no pequeñas, y su sobrevida ha mejorado. Con el objetivo de que los resultados estuviesen más cercanos a la realidad clínica, se utilizaron dosis del AcM 7A7 en el rango de las usadas en los pacientes con los AcM anti-EGFR (56 µg de 7A7 que representa la dosis de 200 mg usada en los ensayos clínicos) y se trabajó con un modelo de metástasis experimental, en el que las células son administradas por vía intravenosa y se obtiene un alto número de metástasis pulmonares. En este escenario, el AcM 7A7 produjo un efecto antimetastático significativo sobre las metástasis del tumor 3LL D122 establecidas en el pulmón (Figura 1) [10].

Se ha demostrado que los AcM anti-EGFR humano bloquean la progresión del ciclo celular e inducen apoptosis de múltiples líneas tumorales. El AcM 7A7 fue capaz de inhibir vías de señalización intracelulares relacionadas con la proliferación celular y los estímulos antiapoptóticos, tales como las rutas de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinases*), del activador de la transcripción y transductor de señales 3 (Stat 3, del inglés *signal transducer and activator of transcription 3*) y de la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3K, del inglés *phosphatidylinositol 3-kinase*). En este trabajo se muestra que el cultivo de las células 3LL-D122 con este AcM indujo un efecto antiproliferativo diferencial cuando se compara con el AcM control, que correlacionó con la detención de las células en la fase G0-G1 del ciclo celular. El tratamiento con el AcM 7A7 provocó, además, la muerte de las células 3LL-D122, asociada, entre otros posibles mecanismos, a la inducción de apoptosis. Los efectos antes descritos se

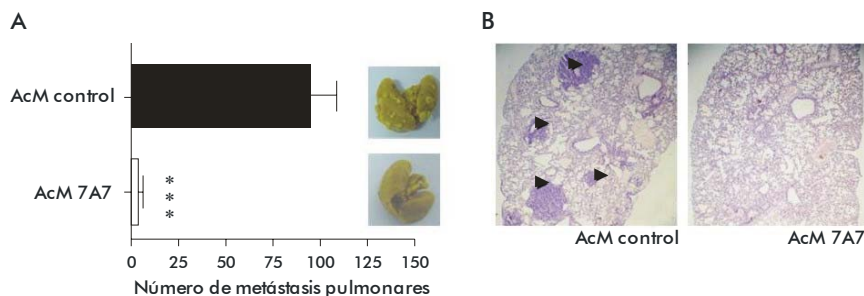


Figura 1. Efecto antimetastático sobre el tumor 3LL-D122. (A) Ratones C57BL6 inoculados el día 0 con células 3LL-D122 por vía intravenosa. Los AcM (7A7 o control) se administraron a los ratones por esta misma vía, tres veces por semana y a partir del día 6 después de la inoculación del tumor. Los ratones se sacrificaron el día 21 y el número de metástasis pulmonares fue contado. Cada barra representa la media de la medición ± desviación estándar de 10 ratones por tratamiento (AcM 7A7 frente a AcM control: ***p < 0.001, prueba de la U de Mann Whitney). El gráfico es representativo de dos experimentos individuales. También se muestra un pulmón representativo de cada grupo. (B) Se tiñeron con hematoxilina y eosina los lóbulos pulmonares provenientes de ratones tratados con el AcM control o el AcM 7A7 como se describe previamente. Las zaetas negras indican los nódulos metastásicos (40x). Las fotografías son láminas representativas de tres tinciones en forma independiente.

verificaron en las metástasis de 3LL-D122 en los pulmones, donde el tratamiento repetido con el AcM 7A7 provocó una detención de la mitosis, seguido por la condensación del material nuclear y la aparición de múltiples cuerpos apoptóticos, a niveles semejantes a los que se reportan con el tratamiento *in vivo* de carcinomas murinos con una dosis de taxol [10]. Estos resultados demuestran que la inhibición del crecimiento celular y la inducción de apoptosis, son mecanismos que contribuyen al efecto antimetastático del AcM 7A7 sobre el tumor 3LL D122.

Múltiples estudios revelan una asociación entre la expresión incrementada del EGFR y la capacidad metastásica de determinados tumores. Los mecanismos moleculares involucrados en esta relación no están completamente dilucidados, pero existen estudios que vinculan a la ruta de las MAPK. En este estudio se demuestra que el AcM 7A7 disminuyó completamente la fosforilación de las cinasas principales de la ruta de las MAPK e inhibió la migración quimiotáctica de las células 3LL-D122 [10]. Estos resultados sugieren otro efecto terapéutico del bloqueo del EGFR, que pudiese ser muy relevante para la capacidad antimetastática del AcM 7A7.

La inducción de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) por los AcM anti-EGFR humano no se ha explorado. Los experimentos *in vitro* muestran que el AcM 7A7 es capaz de mediar la CDC autólogo en las células 3LL-D122 [11]. La participación de la activación del complemento en la acción de los AcM anti-EGFR se debe verificar *in vivo*, pues existen varios estudios de la expresión incrementada en tumores humanos de factores de restricción del complemento, como mecanismo de escape a la CDC. De hecho, estudios en nuestro grupo de investigación han revelado que la resistencia a la acción del complemento puede ser un mecanismo de escape tumoral a la terapia con el AcM 7A7 [11].

La citotoxicidad celular dependiente de Ac (ADCC, del inglés *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) aparece como uno de los mecanismos efectores más importantes de muchos de los AcM que se usan para el tratamiento de pacientes con cáncer. Varios descubrimientos sugieren que los AcM anti-EGFR hu-

7. Roda JM, Parihar R, Magro C, Nuovo GJ, Tridandapani S, Carson WE 3rd. Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells. *Cancer Res* 2006; 66:517-26.

8. Crombet T, Figueredo J, Catalá M, González S, Selva JC, Cruz TM, Toledo C, Silv S, et al. Treatment of High-Grade Glioma Patients with the Humanized Anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Antibody h-R3. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 375-9.

9. Garrido G, Sánchez B, Rodríguez HM, Lorenzano P, Alonso D, Fernández LE. 7A7 Mab: a new tool for the pre-clinical evaluation of EGFR-based therapies. *Hybrid Hybridomics* 2004; 23:168-75.

10. Garrido G, Lorenzano P, Sánchez B, Beausoleil I, Alonso DF, Pérez R, Fernández LE. T cells are crucial for the anti-metastatic effect of anti-EGFR antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56:1701-10.

11. Garrido G, Sánchez B, Pérez R, Fernández LE. The anti-tumor activity of the 7A7 antibody, specific to murine EGFR, is independent of target expression levels in immunocompetent mice. *Biotechnol Appl* 2007; 24:26-32.

mano podrían incrementar la toxicidad sobre las células tumorales, mediante la iniciación de este tipo de respuestas. Sin embargo, hasta el momento no hay estudios *in vivo* que lo confirmen. Como muestran estos resultados, el AcM 7A7 indujo *in vitro* una potente ADCC en células 3LL-D122. Para verificar la relevancia de este mecanismo en el efecto antimetastásico obtenido, durante el protocolo de administración del AcM 7A7, se eliminaron las células asesinas naturales (NK, del inglés *natural killers*). En estas condiciones, la actividad antimetastásica de este AcM sobre las células 3LL-D122 no se afectó (Figura 2A). Es notorio destacar que el AcM 7A7 incluso revirtió el efecto prometastásico de la eliminación de las células NK [10]. Este resultado demuestra que, a través de las células NK, la ADCC no contribuye al efecto antimetastásico del AcM 7A7, pero no se puede descartar que la ADCC mediada por otra población celular esté involucrada en dicho efecto. A diferencia de lo obtenido con las células NK, la eliminación de las células CD8⁺ y CD4⁺ durante el tratamiento con el AcM 7A7, impidió completamente su efecto antimetastásico sobre el tumor 3LL-D122 (Figura 2 B y C) [10].

Para comprender mejor este fenómeno se requieren estudios adicionales. Un conjunto de consideraciones recientes sustentan que una terapia antitumoral que provoque apoptosis puede activar la inmunidad adquirida. Por mucho tiempo se ha considerado la muerte por apoptosis como tolerogénica o no inmunogénica, por ocurrir en ausencia de “señales de peligro”. Sin embargo, actualmente está claro que no siempre la apoptosis es una muerte “silente” para el sistema inmune. En determinadas situaciones, la apoptosis puede estar acompañada de “señales inflamatorias” que activan potentes respuestas inmunes. Este es el caso de la apoptosis masiva, denominada también como “necrosis secundaria”, en la que las células apoptóticas secretan

cantidades significativas de “señales de peligro” endógenas que activan las células dendríticas (DC, del inglés *dendritic cells*). En este sentido cabría plantearse la hipótesis de que los altos niveles de apoptosis inducidos por el AcM 7A7 en el sitio metastásico propician la formación de un “ambiente inflamatorio”. Mediante este proceso, las DC que han capturado cuerpos apoptóticos se activarían y presentarían péptidos tumorales en las moléculas del sistema principal de histocompatibilidad de clase I. Esta pudiera ser una vía a través de la cual el tratamiento con el AcM 7A7 genera células T CD8⁺ específicas por el tumor.

Los resultados en este trabajo confirman que los AcM anti-EGFR son drogas efectivas para el tratamiento de tumores en estadios metastásicos, y aportan nuevos conocimientos sobre los mecanismos a través de los cuales se controla la diseminación tumoral. En este sentido, se confirmó la importancia del bloqueo del EGFR y la inducción de respuestas citotóxicas, como vías que pueden contribuir al potencial antimetastásico de estos agentes, y se obtuvieron los primeros reportes que involucran a las células efectoras del sistema inmune adaptativo en este efecto. En particular, estos estudios sugieren que la actividad antimetastásica del AcM 7A7 depende de la acción de las células T CD4⁺ y CD8⁺. La validación de estos resultados en los pacientes con cáncer tratados con el AcM h-R3 constituye un elemento esencial.

Además, estos estudios validan al AcM 7A7 como una herramienta muy útil para la selección de modelos tumorales murinos EGFR-positivos. Este AcM también podría usarse para la modelación en ratones inmunocompetentes de combinaciones terapéuticas de AcM anti-EGFR con otros agentes anti-EGFR, terapias convencionales o incluso agentes inmunomoduladores. La posibilidad de hacer estas mediciones conduciría a una mejor extrapolación de los resultados en la experimentación animal a la fase clínica.

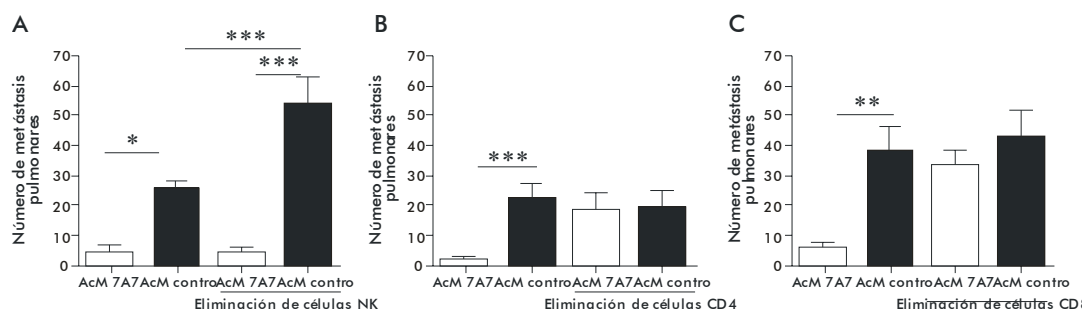


Figura 2. Efecto de la eliminación de las células NK 1.1⁺, CD4⁺ y CD8⁺ en el potencial antimetastásico del AcM 7A7. Ratones C57BL6 se inocularon con células 3LL-D122 por vía intravenosa. Los AcM (7A7 o control) se administraron a los animales por esa misma vía tres veces por semana comenzando el día 6 después de la administración del tumor. Conjuntamente, los ratones se trataron cada cuatro días con AcM que eliminaron las subpoblaciones de (A) células NK 1.1⁺, (B) células CD4⁺ y (C) células CD8⁺. Los animales se sacrificaron el día 21 tras la inoculación, y la determinación del número de metástasis pulmonares. Cada barra representa la media de la medición $\pm$ desviación estándar en 10 ratones por tratamiento (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, prueba de Dunn). En tres experimentos independientes se obtuvieron resultados similares.