

Terapias con inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico: acercando el futuro

✉ Arlhee Díaz, Agustín Lage

Dirección de Investigaciones, Departamento de Inmunoterapia Experimental
Centro de Inmunología Molecular. Calle 216, esquina 15, Atabey,
Playa, C P 16 040, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: arlhee@cim.sld.cu

RESUMEN

La función esencial del receptor del factor de crecimiento epidérmico (REGF) en diversos tipos de tumores sólidos lo ha convertido en un blanco fundamental para el diseño de nuevas drogas. La contribución de las vías de señalización asociadas al REGF en procesos tumorales como la proliferación celular, la angiogénesis y la resistencia a apoptosis ha sido bien establecida. Dos tipos de drogas anti-REGF que están en evaluación clínica incluyen: anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular del REGF (Cetuximab, Nimotuzumab) e inhibidores tirosina kinasa, capaces de bloquear la actividad enzimática del receptor (Gefitinib, Erlotinib). A pesar de los resultados en pacientes tras la aplicación de estos compuestos, existen aún aspectos que necesitan ser esclarecidos, como la búsqueda de marcadores predictores de buenas respuestas al tratamiento, o las secuencias y combinaciones óptimas de estas drogas con las terapias actuales. Es necesario identificar y validar factores predictivos que permitan seleccionar pacientes que responderán a las terapias con inhibidores del REGF, como mutaciones que confieren resistencia, o aquellas que incrementan la sensibilidad al tratamiento. Una mejor comprensión de sus mecanismos de acción permitirá predecir la interacción de estos agentes con las terapias actuales, así como prevenir efectos antagónicos o redundantes, que no incrementen la actividad antitumoral. Finalmente, las investigaciones actuales deberán esclarecer las ventajas tras la aplicación de estos compuestos como primera línea de tratamiento, y sus dosis y esquemas de administración óptimos.

Palabras claves: cáncer, receptor del factor de crecimiento epidérmico, anticuerpos monoclonales, inhibidores tirosina kinasa

Biotecnología Aplicada 2007;24:01-09

ABSTRACT

Therapies against epidermal growth factor receptor: approaching the future. The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is considered an important target for rational drug design due to its key role in numerous tumors. Potential contribution of EGFR-related signaling pathways to promote tumorigenic processes, including cell proliferation, angiogenesis, and resistance to apoptosis has been well established. Two classes of anti-EGFR agents in late-stage clinical testing include monoclonal antibodies against extracellular EGFR domain (Cetuximab, Nimotuzumab) and small molecules tyrosine kinase inhibitors, which inhibit the receptor enzyme activity (Gefitinib, Erlotinib). A considerable body of evidence has emerged since its introduction in the treatment of cancer patients. However, important questions such as reliable surrogate markers to predict response to the treatment, or optimal sequence and combination of these agents with conventional therapies remain to be addressed. Identify and validate predictive factors to select patients likely to respond to EGFR inhibitors, such as mutations that confer resistance versus those associated with sensitivity is required. A better understanding of molecular mechanisms associated with antitumor activity will be useful to predict the interaction of these agents with other therapies in order to avoid antagonisms or overlapping effects resulting in no adding effects. Finally, the benefits derived from EGFR inhibitors as first-line therapy in selected populations, and the optimal doses and ways to delivery to the tumor site resulting in optimal target modulation should be established by the ongoing investigation.

Keywords: cancer, epidermal growth factor receptor, monoclonal antibodies, tyrosine kinase inhibitors

Introducción

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (REGF) ha sido objeto de estudios profundos, debido a la función esencial que ejerce en muchos tipos de tumores humanos [1]. El REGF es una glicoproteína de membrana de 170 kDa, compuesta por tres dominios: un dominio extracelular de unión a ligando, un segmento lipofílico transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad tirosina kinasa [2]. El REGF, también denominado HER1 y ErbB, es un miembro más de la familia de receptores ErbB que comprende, además, al ErbB2 (Neu, HER2), al ErbB3 (HER3) y al ErbB4 (HER4), todos estrechamente relacionados desde el punto de vista estructural y funcional [1]. El REGF ejerce una función muy importante en varias respuestas

fisiológicas asociadas con la regulación de la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de las células [3-8]. Las alteraciones en su fisiología pueden llevar a la génesis y/o progresión de varios tipos de tumores, incluyendo el del pulmón, el de mama, el del ovario, el del cerebro, el del páncreas y el de la próstata [1].

Con respecto al resto de los miembros de la familia ErbB, el REGF tiene la propiedad única de unirse al menos a seis ligandos, incluyendo, entre otros, al EGF y al TGF-alfa. Además, posee la capacidad de formar heterodímeros con otros miembros de la familia ErbB, incrementar notablemente los niveles de complejidad en el proceso de activación del receptor y la especificidad de los ligandos [9]. El REGF forma heterodímeros

1. Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 2001;8(1):11-31.

2. Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu Rev Biochem* 1987;56: 881-914.

3. Klapper LN, Krischbaum MH, Sela M, Yarden Y. Biochemical and clinical implications of ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res* 2000;77:25-79.

preferencialmente con el HER2, una proteína con elevado potencial oncogénico [10, 11], aunque también es común encontrar homodímeros entre dos moléculas del REGF [12], o heterodímeros con HER3 [13] y HER4 [14]. Los heterodímeros, en lo fundamental aquellos que contienen HER2, generalmente inducen señales con mayor actividad biológica [1].

A pesar de que el mecanismo exacto mediante el cual ocurre la activación del REGF luego de la unión del ligando, no se ha esclarecido del todo, en la actualidad, existen dos hipótesis fundamentales para explicar el proceso de dimerización. La primera sugiere que el ligando se une directamente a un monómero del REGF, lo cual provoca una interacción con otro ligando monomérico para la formación de un dímero. La segunda hipótesis apunta que la dimerización ocurre cuando un ligando se une a un dímero del receptor preexistente, seguido de la unión de una segunda molécula del ligando al complejo [10, 12].

La diversidad de ligandos, unido a la posibilidad de formar combinaciones de homodímeros y heterodímeros en la familia de ErbB, a su vez acoplados a diversas vías de señalización intracelular, determinan un elevado grado

de complejidad en el denominado sistema EGF/EGFR (Figura 1). La vía de señalización intracelular más estudiada y, por tanto, mejor caracterizada, es la denominada vía de las MAP kinasas, Ras/Raf/ERK. Varias evidencias experimentales sugieren que muchos de los efectos biológicos observados luego de la activación por ligandos del REGF, pudieran estar asociados a la activación de la vía Ras/Raf/ERK, aunque luego de la activación por el EGF, estos efectos están fundamentalmente asociados a la proliferación celular [10]. Otra vía de señalización intracelular del REGF activado es la asociada a fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K), la cual parece estar relacionada con los niveles de proteína quinasa B (PKB) [15]. Las acciones de la PKB tienen suma importancia en el bloqueo de la función proapoptótica de las proteínas Bcl-2. Por tanto, la activación de la vía PI3K mediada por el REGF está directamente relacionada con la supervivencia de las células tumorales. Otras vías de señalización asociadas al proceso de activación del REGF son: la vía de las proteínas STAT, la vía de la fosfolipasa C- γ (PLC- γ) y la vía de la quinasa c-jun N-terminal (JNK), las cuales se han asociado, sobre todo, a la resistencia a apoptosis, la

4. Di Marco E, Pierce J, Fleming TP, Kraus MH, Molloy CJ, Aaronson SA, *et al.* Autocrine interaction between TGF- α and the EGF-receptor: quantitative requirements for the induction of the malignant phenotype. *Oncogene* 1989;7:831-8.

5. Albanell J, Codony-Servat J, Rojo F, Del Campo JM, Sauleda S, Anido J, *et al.* Activated extracellular signal-regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/Transforming growth factor α expression in head and neck squamous and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments. *Cancer Res* 2001;61:6500-10.

6. Moyer JD, Barbacci EG, Iwata KK, Arnold L, Boman B, Cunningham A, *et al.* Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358, 774, an inhibitor of epidermal growth factor tyrosine kinase. *Cancer Res* 1997;57: 4838-48.

7. Verbeek BS, Adriaansen-Slot SS, Vroom TM, Beckers T, Rijksen G. Overexpression of EGFR and c-erbB2 causes enhanced cell migration in human breast cancer cells and NIH 3T3 fibroblasts. *FEBS Lett.* 1998;425:145-50.

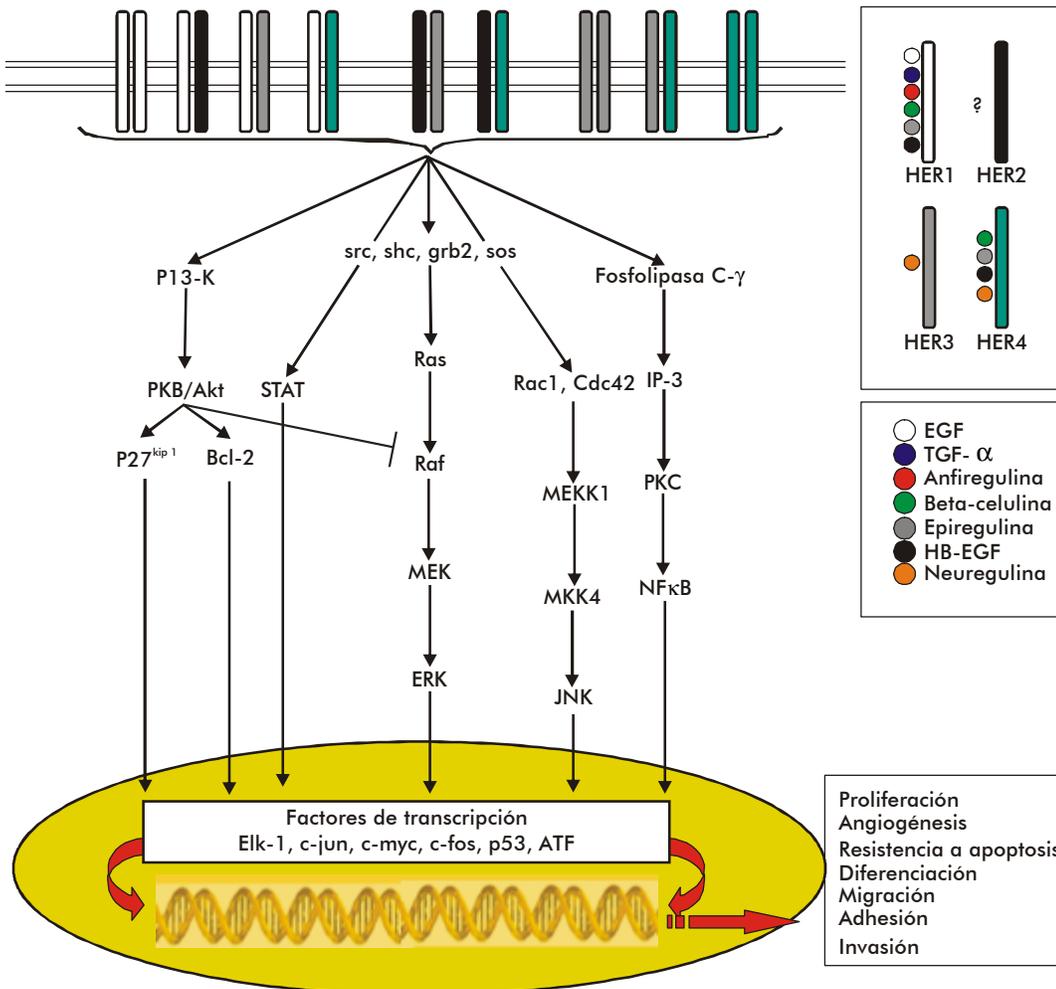


Figura 1. Familia de receptores ErbB y vías de señalización intracelular. Luego de la activación inducida por ligandos, los residuos intracelulares del REGF con actividad tirosina quinasa pueden reclutar diversas proteínas adaptadoras y moléculas de señalización. Este proceso desencadena complejas cascadas intracelulares que culminan con la transcripción de genes que promueven importantes efectos biológicos en las células.

migración celular, así como a la proliferación celular y a la transformación, respectivamente [10].

El REGF se encuentra, por lo regular, expresado en un rango de 20 000 a 200 000 moléculas por célula, sobre todo en tejidos de origen epitelial; mientras que en células malignas este número se puede elevar hasta 2 millones o más de receptores. Varios tipos de tumores sólidos expresan elevados niveles de REGF, entre los que se encuentran: carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, carcinomas renales, carcinomas de pulmón de células no pequeñas y tumores de colon, por solo citar algunos. La sobre expresión del REGF por las células tumorales se debe a diversos mecanismos, que incluyen la amplificación génica, la alteración de eventos transcripcionales, así como debido a delecciones o mutaciones que generan receptores constitutivamente activos [16]. Los efectos oncogénicos relacionados con la alteración de la fisiología del REGF han convertido al sistema EGF/REGF en un blanco muy atractivo y prometedor para la intervención inmunoterapéutica basada en agentes antagonistas específicos del REGF.

Terapias anti-REGF. Anticuerpos monoclonales e inhibidores tirosina kinasa

Actualmente existen varias estrategias encaminadas a inhibir la función del REGF, tales como: inhibidores de la actividad tirosina kinasa (ITK) [17, 18], anticuerpos acoplados a toxinas [19], oligonucleótidos represores de la transcripción del gen del REGF [20, 21], vacunas [22, 23], y anticuerpos monoclonales (AcM) específicos contra el dominio extracelular del receptor o de sus ligandos [24-26]. Dentro de esta amplia gama de productos, los AcM anti-REGF, como el Cetuximab (IMC-225; Erbitux) y el Nimotuzumab (TheraCIM h-R3), y los ITK, como el Gefitinib (ZD1839; Iressa™) y el Erlotinib (OSI-774; Tarceva), son los más estudiados. Algunos de estos productos ya han sido aprobados para el tratamiento a pacientes con diversos tipos de tumores.

Ambas clases de inhibidores han mostrado una elevada efectividad para bloquear las vías de transducción de señales de las MAPK, PI3K/Akt y Jak/STAT [6]. Sin embargo, a pesar de que ambos inhiben la activación del REGF y las vías intracelulares de señalización, sus mecanismos de acción son diferentes y, por tanto, los resultados derivados de su aplicación también difieren (Tabla 1). Mientras los AcM se unen al dominio extracelular del REGF, bloqueando la unión de los ligandos, los ITK actúan en el interior de las células bloqueando la unión del ATP al dominio catalítico del receptor.

Contrario al mecanismo de acción de los ITK, luego de bloquear la activación del REGF, los AcM llevan a una internalización y posterior degradación del receptor en los compartimentos endosomales. La remoción del REGF de la superficie celular incrementa la velocidad de degradación de esta molécula y, a su vez, disminuye el número de moléculas disponibles en superficie para señalizar. En cambio, los ITK no eliminan las moléculas de REGF de la superficie celular, lo cual constituye una posibilidad para la señalización, en caso de que la actividad tirosina kinasa no sea totalmente bloqueada.

Tabla 1. Comparación de las principales características de los anticuerpos monoclonales y los inhibidores tirosina kinasa

Anticuerpos monoclonales	Inhibidores tirosina kinasa
Bloquean la unión de los ligandos al REGF a nivel extracelular	Compiten con el ATP por el sitio de unión al REGF a nivel citoplasmático
Grandes tallas (~150 000D) que dificultan el acceso a algunos tipos de tumores	Pequeñas tallas (~400D) que permiten un mejor acceso a algunos tipos de tumores
No requieren elevados concentraciones para ejercer actividad terapéutica	Requieren elevados concentraciones para ejercer actividad terapéutica
Alta especificidad	Específicos/ no específicos
Baja toxicidad	Elevada toxicidad
Posibilidad de inducir modificaciones químicas para aumentar su potencial terapéutico	Disponibles en forma de compuestos orales
Inducen internalización y degradación del REGF a nivel endosomal	No inducen internalización del REGF
Actúan directamente sobre las células tumorales e inducen la muerte celular	Bajos niveles de respuestas, son empleados como monoterapia
Pueden inducir resistencia tumoral	La presencia de mutaciones altera la sensibilidad a los ITK
Capacidad de reclutar mecanismos inmunes	Capacidad de superar la resistencia tumoral por mecanismos compensatorios (inhibidores no específicos)
Capacidad de potenciar la actividad de la radioterapia y la quimioterapia	Capacidad de potenciar la actividad de la quimioterapia

Debido a su elevada estabilidad y prolongado tiempo de vida media, los AcM pueden administrarse semanalmente, mientras los ITK requieren, por lo general dosis diarias. En comparación con los AcM, que requieren administraciones por vía intravenosa, los ITK ofrecen la ventaja de la biodisponibilidad oral. Los ITK son compuestos de pequeñas tallas moleculares, lo cual les permite entrar fácilmente en contacto con células epiteliales del intestino, a diferencia de los AcM que son macromoléculas y, por lo general, pueden tener acceso limitado a algunos sitios anatómicos a partir de la circulación sistémica. Esta aparente ventaja de los ITK sobre los AcM, pudiera explicar la elevada toxicidad intestinal asociada con la utilización de los ITK.

Otras diferencias entre estas dos clases de compuestos antagonistas del REGF están asociadas con su especificidad y selectividad para inducir el bloqueo del receptor. Los AcM muestran un grado de especificidad superior en comparación con los ITK. Ejemplo de ello son los cuatro grupos fundamentales de ITK, clasificados de acuerdo con su selectividad y modo de ejercer la inhibición de la actividad kinasa: inhibidores reversibles del REGF, inhibidores irreversibles del REGF, inhibidores reversibles de dos miembros de la familia de receptores ErbB y los llamados "inhibidores pan-ErbB", capaces de inhibir de manera inespecífica todos los miembros de la familia de ErbB [27]. En tal sentido, mientras los AcM pudieran resultar inefectivos para inhibir la señalización en tumores en los que el REGF forman heterodímeros con otros miembros de la familia de ErbB, los ITK con actividad sobre más de un tipo de receptor, pudieran tener un éxito mayor. Igualmente, a diferencia de los AcM que requieren un dominio de unión a ligando intacto para ejercer su actividad, los ITK pudieran ser activos también en presencia de formas mutadas del REGF. Sin embargo, esta posible ventaja de los ITK sobre los AcM no se evidenció en los resultados experimentales a partir de la aplicación de estos compuestos: mientras el Gefitinib ha mostrado poca efectividad en la inhibición de tumores NR6M con sobre expresión del REGFvIII [28], una

8. De Jong JS, Van Diest PJ, Van der Valk P, Baak JP. Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II. Correlations with proliferation and angiogenesis. *J Pathol* 1998;184:53-7.

9. Pedersen MW, Poulsen HS. Epidermal growth factor receptor in cancer therapy. *Science & Medicine* 2002;July/August: 206-17.

10. Di Fiore PP, Pierce JH, Fleming TP, Hazan R, Ullrich A, King CR, et al. Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell* 1987;51:1063-70.

11. Stern DF, Kamps MP. EGF-stimulated tyrosine phosphorylation of p185neu: a potential model for receptor interactions. *EMBO J* 1988;7(4):995-1001.

12. Lemmon MA, Bu Z, Ladbury JE, Zhou M, Pinchasi D, Lax I, et al. Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J* 1997;16(2):281-94.

13. Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R, Fedi P, Aaronson SA, et al. Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* 1995;10(9):1813-21.

14. Riese DJ 2nd, Bermingham Y, Van Raaij TM, Buckley S, Plowman GD, Stern DF. Betacellulin activates the epidermal growth factor receptor and erbB-4, and induces cellular response patterns distinct from those stimulated by epidermal growth factor or neuregulin-beta. *Oncogene* 1996;12(2): 345-53.

15. Winograd-Katz SE, Levitzki A. Cisplatin induces PKB/Akt activation and p38 (MAPK) phosphorylation of the EGF receptor. *Oncogene* 2006; (en prensa).

16. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2001;37Suppl4:S9-15.

17. Barker AJ, Gibson KH, Grundy W, Godfrey AA, Barlow JJ, Healy MP, et al. Studies leading to the identification of ZD1839 (IRESSA): an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001; 11(14):1911-4.

variante mutada del REGF con una delección del dominio extracelular de la proteína en los exones 2-7 [29]; el Cetuximab ha mostrado la capacidad de unirse al dominio extracelular del REGFvIII en células de glioma [30].

Por último, los AcM, especialmente aquellos de isotipo IgG1, como el Cetuximab y el Nimotuzumab, pudieran tener la capacidad de activar mecanismos inmunológicos, como la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), mediante la unión de células efectoras del sistema inmune a sus dominios Fc [31].

Cada clase de compuestos presenta características propias que pueden generar potencialidades para el tratamiento a pacientes con cáncer, a partir de lo cual no será tarea fácil predecir cuál de los dos mostrará mayores beneficios.

Cetuximab

Al igual que otros AcM, el Cetuximab es capaz de unirse al dominio extracelular del REGF, bloqueando la unión del ligando, y es exclusivo para el REGF. Al principio, el Cetuximab se desarrolló como un anticuerpo murino y, posteriormente, se quimerizó con una IgG1 humana para disminuir la potencialidad de generar respuestas inmunes contra el anticuerpo murino (HAMA). La quimerización de este anticuerpo llevó a un incremento considerable de su afinidad por el REGF ($K_d = 10^{-10}$ M), por lo que el orden de magnitud fue superior a la afinidad mostrada por el ligando natural EGF y por su predecesor murino 225 ($K_d = 10^{-9}$ M) [32]. El Cetuximab ha mostrado un potente efecto inhibidor en la proliferación de células de carcinoma epidermoide A431, tanto *in vitro*, como en tumores trasplantados en ratones atómicos. A su vez, causó un importante efecto potenciador de la actividad de las drogas citotóxicas y de la radioterapia, lo cual llevó a iniciar su aplicación en estudios clínicos. Los primeros ensayos en pacientes con tumores sólidos con elevada expresión de REGF que incluyen carcinoma colon-rectal, carcinomas de pulmón de células no pequeñas y carcinomas de células escamosas de cabeza y de cuello, entre otros, han demostrado una elevada eficacia del anticuerpo, administrado como monoterapia o en combinación con drogas citotóxicas o con terapia de radiación. Además, se ha apreciado un incremento significativo de la toxicidad inducida por las terapias convencionales. Las reacciones adversas más comunes asociadas con el empleo del Cetuximab incluyen: fiebre, astenia y náuseas, después de la administración prolongada del anticuerpo, y algunas más severas como *rash* acneiforme, y hasta choque anafiláctico en el 2% de los pacientes tratados [33]. Sin embargo, los efectos adversos asociados con la toxicidad de la piel son reversibles y no limitantes para el uso de la dosis terapéutica requerida [34]. El Cetuximab constituye el primer anticuerpo monoclonal antagonista del REGF aprobado por la Agencia Reguladora de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, siglas en inglés) para su aplicación a pacientes. Al principio se registró para su aplicación como monoterapia, o en combinación con Irinotecán, para el tratamiento a pacientes con carcinomas colon-rectales con expresión detectable del REGF en estadios avanzados de la enfermedad [35]; y, recientemente, para el tratamiento de tumores de cabeza

y cuello en combinación con radioterapia. Entre los principales resultados clínicos con el Cetuximab, que lo llevaron a ser aprobado para el tratamiento de colon, se encuentra un ensayo aleatorio Fase II que incluyó 329 pacientes con progresión a la enfermedad luego del tratamiento con Irinotecán [36]. En este ensayo se evaluó la respuesta antitumoral, el tiempo de progresión de la enfermedad, la supervivencia y los efectos colaterales ante el tratamiento con Cetuximab como monoterapia o en combinación con Irinotecán. El tratamiento combinado con Cetuximab e Irinotecán a estos pacientes provocó el 22.5% de respuesta parcial o total de los pacientes tratados, a pesar de que no se incrementó la supervivencia de manera significativa. A pesar de que los efectos tóxicos más frecuentes se observaron en el grupo sometido al régimen de combinación, la incidencia y severidad de estos no fue mayor a la esperada en el tratamiento con el Irinotecán como monoterapia. Otros estudios incluyen pacientes tratados con Cetuximab en combinación con Irinotecán, Fluoracilo y Leucovorin [37, 38], y en todos los casos se reportan importantes niveles de respuesta antitumoral y buena tolerancia a la terapia combinada.

En cuanto a la aplicación del Cetuximab en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, se destacan los resultados de esta droga en combinación con la terapia de radiación a pacientes con enfermedad locorregional avanzada. En un estudio internacional multicéntrico que reunió 424 pacientes, la adición del Cetuximab a la terapia de radiación, prácticamente duplicó el tiempo medio de supervivencia de los pacientes (de 28 a 54 meses), al tiempo que se incrementó el porcentaje de pacientes con supervivencia a los dos y tres años de tratamiento de 55 y 44%, respectivamente, para los pacientes que recibieron radioterapia solamente a 62 y 57%, para el grupo que recibió la combinación terapéutica [39].

Nimotuzumab

El AcM humanizado Nimotuzumab (TheraCIM h-R3), al igual que el Cetuximab, es un anticuerpo específico contra el dominio extracelular del REGF. A pesar de poseer mecanismos de acción similares, existen algunas diferencias importantes previamente establecidas entre los dos anticuerpos [40]: se destaca que el Nimotuzumab presenta menor afinidad por el REGF (10^{-9} M) que el Cetuximab (10^{-10} M), lo cual pudiera explicar la menor toxicidad asociada a los efectos adversos de la piel. En este sentido, los investigadores consideran que existe un rango óptimo de afinidad para los compuestos antagonistas del REGF, lo cual pudiera determinar que agentes con una afinidad no tan elevada por el REGF, como el Nimotuzumab, puedan ejercer una actividad biológica óptima a dosis considerablemente inferiores a la dosis tóxica. Otros aspectos importantes que se deben tener en consideración pudieran ser las diferentes fuentes de obtención de estos anticuerpos. Mientras el Nimotuzumab se obtuvo a partir de la humanización de un anticuerpo murino, desarrollado por la inmunización previa de ratones con placenta humana enriquecida con REGF [41], el Cetuximab es un anticuerpo quimérico, desarrollado a partir de un anticuerpo murino obtenido de una línea celular.

18. Norman P. OSI-774 OSI Pharmaceuticals. *Curr Opin Investig Drugs* 2001;2(2):298-304.

19. Osborne CK, Coronado-Heinsohn E, Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Cancer Cell Lines With a Recombinant Ligand Fusion Toxin (DAB38 9EGF). *Cancer J Sci Am* 1996;3:175.

20. Wang S, Lee RJ, Cauchon G, Gorenstein DG, Low PS. Delivery of antisense oligodeoxyribonucleotides against the human epidermal growth factor receptor into cultured KB cells with liposomes conjugated to folate via polyethylene glycol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995;92:3318-22.

21. He Y, Zeng Q, Drenning SD, Melhem MF, Tweardy DJ, Huang L, et al. Inhibition of human squamous cell carcinoma growth *in vivo* by epidermal growth factor receptor antisense RNA transcribed from the U6 promoter. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998;90:1080-7.

22. González G, Crombet T, Catala M, Mirabal V, Hernández JC, González Y, et al. A novel cancer vaccine composed of human-recombinant epidermal growth factor linked to a carrier protein: report of a pilot clinical trial. *Ann Oncol* 1998;9:431-5.

23. González G, Crombet T, Torres F, Catala M, Alfonso L, Osorio M, et al. Epidermal growth factor based cancer vaccine for non-small cell lung cancer therapy. *Ann of Oncol* 2003;14(3):461-6.

24. Prewett M, Rockwell P, Rockwell RF, Giorgio NA, Mendelsohn J, Scher HI, et al. The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma. *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol* 1996;19:419-27.

25. Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor positive-tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer (Phila.)* 2002;94:1543-611.

26. Crombet T, Torres O, Neningen E, Catala M, Rodríguez N, Ramos et al. Phase I clinical evaluation of a neutralizing monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 2003;16(1):93-101.

27. Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(14):2787-99.

28. Heimberger AB, Learn CA, Archer GE, McLendon RE, Chewing TA, Tuck FL, 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(11):3496-502.

29. Wikstrand CJ, Cokgor I, Sampson JH, Bigner DD. Monoclonal antibody therapy of human gliomas: current status and future approaches. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(4):451-64.

30. Patel D, Patel S, Franklin M, Kang X. Activity and binding mechanism of Cetuximab (Erbix[®]) to the type III EGF deletion-mutant receptor. Presented at 97th AACR Annual meeting Int Conf 2006; abstr 1238.

31. Jefferis R, Lund J. Interaction sites on human IgG-Fc for FcγgammaR: current models. *Immunol Lett* 2002;82(1-2):57-65.

Al igual que el Cetuximab, el Nimotuzumab ha mostrado un potente efecto antitumoral, tanto *in vitro* como en modelos preclínicos, basado en sus capacidades antiproliferativas, antiangiogénicas y proapoptóticas [42]. Entre los principales resultados clínicos del Nimotuzumab se encuentra un ensayo en fase I/II con 24 pacientes portadores de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello en estadio avanzado de la enfermedad, que recibieron tratamiento combinado de radioterapia y diferentes dosis del anticuerpo [40]. Los resultados de este ensayo mostraron un índice de 87.5% de respuesta objetiva (14 de 16 pacientes) y 68.75% de respuesta completa (11 de 16 pacientes) en pacientes tratados con dosis de 200 y 400 mg del anticuerpo. Igualmente se constató un incremento significativo en el tiempo medio de supervivencia de los pacientes tratados con estas dosis (44.30 meses), con respecto a los pacientes que recibieron dosis de 50 y 100 mg del anticuerpo (8.60 meses). La combinación del anticuerpo con la radioterapia fue bien tolerada y la mayor toxicidad estuvo asociada con las mayores niveles de dosis del anticuerpo, y fue clasificada como media o moderada, pues solo se reportó un caso de toxicidad de grado III. Además, resultó significativo que no apareciera *rash* cutáneo en ninguno de los pacientes tratados.

Otro resultado clínico relevante es la aplicación del Nimotuzumab en combinación con radioterapia para el tratamiento de tumores de gliomas malignos. El reporte publicado recientemente por Crombet y cols. [43] acerca de un ensayo multicentro en fase I/II, que incluyó 29 pacientes con glioblastomas o astrocitomas anaplásicos, constituye el primero acerca de la combinación de anticuerpos anti-REGF con radioterapia a pacientes portadores de gliomas malignos. El nivel de respuesta objetiva logrado con el tratamiento fue de 37.9% (17.2% de respuesta completa y 20.7% de respuesta parcial), mientras que en el 41.4% de los pacientes la enfermedad se mantuvo estable. Además, se reportó un incremento relativo en el tiempo medio de la supervivencia de los pacientes en estudio con 29 meses de seguimiento: 17.47 meses, los pacientes con glioblastoma; mientras que los pacientes con astrocitomas aún no se había alcanzado al momento del reporte. La utilización del Nimotuzumab en este estudio no incrementó los efectos tóxicos asociados con la radioterapia. Tampoco se constató la aparición de efectos adversos de grado 3 ó 4, ni de *rash* acneiforme o reacciones alérgicas. Estos resultados se pueden comparar favorablemente con las experiencias previas en glioblastomas con la aplicación de ITK, en que no se reportaron respuestas tumorales objetivas en los grupos de 53 y 19 pacientes tratados con Gefitinib y con Erlotinib, respectivamente [44, 45].

Gefitinib

A diferencia de los resultados tras la aplicación de los AcM en el escenario clínico, con el empleo de los ITK no se han logrado los resultados esperados, ya que no se logró extrapolar los efectos antitumorales importantes observados *in vitro* o en modelos preclínicos. Estos compuestos no han mostrado actividades antitumorales significativas en pacientes con glioblastomas o cáncer de colon, y los resultados más promisorios, aunque modestos, se han registrado

fundamentalmente en carcinomas de pulmón de células no pequeñas [46].

La actividad biológica del Gefitinib se evaluó a dosis diferentes (250 y 500 mg) en 452 pacientes con carcinoma de pulmón de células no pequeñas avanzado, que han sido refractarios a la quimioterapia en dos ensayos multicéntricos conocidos como IDEAL 1 e IDEAL 2 (Iressa™ Dose Evaluation in Advanced Lung cancer) [47, 48].

Estos ensayos llevados a cabo en paralelo por dos grupos distintos no mostraron diferencias entre los diferentes niveles de dosis evaluados en cuanto a la respuesta antitumoral (18.4 frente a 19%), control de la enfermedad (40.3 frente a 37%), o supervivencia de los pacientes. Sin embargo, sí se demostró una mayor toxicidad dosis-dependiente asociada con el tratamiento, evidenciada tanto en un aumento en la frecuencia de efectos adversos, como en la severidad de estos. Por tanto, la recomendación derivada de estos estudios fue el empleo de la dosis de 250 mg diarios para estudios posteriores.

Otros dos grandes ensayos en fase III aleatorizados se realizaron para evaluar la eficacia del Gefitinib como monoterapia o en combinación con quimioterapia como primera línea para el tratamiento de carcinomas de pulmón de células no pequeñas. Estos ensayos, denominados INTACT 1 e INTACT 2 (Iressa NSCLC Trial Assessing Combination Treatment), reclutaron 1 093 y 1 037 pacientes, respectivamente. El resultado de ambos ensayos no fue alentador y derivó en un sinnúmero de interpretaciones, algunas de las cuales serán abordadas a lo largo de este artículo. En el INTACT 1 se evaluó la efectividad del Gefitinib en combinación con Gemcitabine y Cisplatin, en comparación con pacientes que recibieron solamente la quimioterapia y placebo [49]; mientras en INTACT 2 se evaluó el Gefitinib en combinación con Paclitaxel y Carboplatino, con respecto a los pacientes que recibieron solo la quimioterapia y el placebo [50]. En ninguno de los dos ensayos se observaron diferencias en cuanto a la supervivencia o el control de la enfermedad, a partir de la combinación Gefitinib/quimioterapia frente a la quimioterapia sola (supervivencia media para INTACT1: 10.9; 9.9 y 9.9 meses para los grupos que recibieron: placebo, Gefitinib 250 mg y Gefitinib 500 mg, respectivamente; y para INTACT 2: 9.9; 9.8 y 8.7 meses para los grupos que recibieron: placebo, Gefitinib 250 mg y Gefitinib 500 mg).

También se realizó otro ensayo denominado ISEL (Iressa Survival Evaluation in Lung cancer) para evaluar el efecto de Gefitinib en la supervivencia, como segunda y tercera línea de tratamiento a pacientes con tumores de pulmón de células no pequeñas en estadios avanzados, refractarios a Irinotecán u otra quimioterapia [51]. Este ensayo en fase III reclutó 1 692 pacientes de 210 centros de 28 países de Asia, Europa, Australia, América del Sur, además de Estados Unidos y Canadá. A pesar de que los resultados no mostraron diferencias en cuanto a la respuesta objetiva (completa y parcial) a favor del Gefitinib en comparación con el grupo al que se administró placebo (8% frente a 1%), tampoco mostraron diferencias en cuanto a la supervivencia entre los grupos. La supervivencia media (5.6 meses) y la supervivencia al año (27%) de los pacientes tratados

32. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1995;1(11):1311-8.

33. Mendelsohn J. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2002;20(18 Suppl):1S-13S.

34. Needle MN. Safety experience with IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Semin Oncol* 2002;29(5 Suppl 14):55-60.

35. Princeton, NJ. ImClone Systems Erbitux™ (Cetuximab). US Prescribing Information. ImClone Systems, 2004.

36. Saltz L, Rubin M, Hochster H, Tchekmeydian NS, Waksal H, Needle M, et al. Cetuximab (IMC-225) plus irinotecan is active in CPT-11-refractory colorectal cancer (CRC) that expresses epidermal growth factor receptor (EGFR). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001;3a (abstr 7).

37. Rosenberg AH, Loehrer PJ, Needle NM, Waksal H, Hollywood E, Ramos L, et al. Erbitux (IMC-225) plus weekly irinotecan (CPT-11), fluoracil (5FU) and leucovorin (LV) in colorectal cancer (CRC) that express the epidermal growth factor receptor (EGFR). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002;135a (abstr 536).

38. Falprecht G, Lutz M, Schoeffski P, Seufferlein T, Haag C, Beutel G, et al. Cetuximab/irinotecan/high-dose-5-fluoracil/leucovorin (HD-5-FU/LV) in the first-line therapy of metastatic colorectal cancer (CRC). Presented at Am Soc Clin Oncol Gastrointestinal Cancers Symp. 2004;abstr 283.

39. Bonner JA, Giral J, Harari PM, Cohen R, Jones C, Sur RK, et al. Cetuximab prolongs survival in patients with locoregionally advanced squamous cell carcinoma of head and neck: a phase III study of high dose radiation therapy with or without cetuximab. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004;abstr 5507.

40. Crombet T, Osorio M, Cruz T, Roca C, del Castillo R, Mon 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(9):1646-54.

41. Fernández A, Spitzer E, Perez R, Boehmer FD, Eckert K, Zschiesche W, et al. A new monoclonal antibody for detection of EGF-receptors in western blots and paraffin-embedded tissue sections. *J Cell Biochem* 1992;49(2):157-65.

42. Crombet T, Rak J, Pérez R, Vilorio-Petit A. Antiproliferative, antiangiogenic and proapoptotic activity of h-R3: A humanized anti-EGFR antibody. *Int J Cancer* 2002; 101(6):567-75.

43. Crombet T, Figueredo J, Catala M, Gonzalez S, Selva JC, Cruz TM, et al. Treatment of high-grade glioma patients with the humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody h-R3: report from a phase I/II trial. *Cancer Biol Ther* 2006;5(4):375-9.

44. Rich JN, Reardon DA, Peery T, Dowell JM, Quinn JA, Penne KL, et al. Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2004;22(1):133-42.

con Gefitinib no difieren de las de aquellos que recibieron solamente placebo (5.1 meses y 21%). Todos estos resultados han llevado a muchos investigadores a cuestionarse el empleo de los ITK en el tratamiento de los carcinomas de pulmón de células no pequeñas [52].

Erlotinib

El Erlotinib, al igual que el Gefitinib y otros ITK, se ha evaluado fundamentalmente en pacientes con carcinomas de pulmón de células no pequeñas, y aunque sus principales resultados se comparan favorablemente con los obtenidos con el Gefitinib, aún pudieran catalogarse de discretos. Basados en ensayos previos en fase I, se ha establecido la dosis máxima tolerada (DMT) del Erlotinib es 150 mg diarios [53]. En un primer ensayo en fase II que incluyó 57 pacientes con carcinomas de pulmón de células no pequeñas, refractarios al tratamiento previo con quimioterapia, el porcentaje de respuesta ante el Erlotinib fue del 12% y el 40% de los pacientes alcanzó un año de supervivencia [54].

En un ensayo denominado TRIBUTE (Tarceva Response in Conjunction with Taxol and Carboplatin) 1 059 pacientes recibieron Erlotinib o placebo en combinación con Carboplatino y Paclitaxel, como primera línea de tratamiento para carcinomas de pulmón de células no pequeñas avanzado [55]. El Erlotinib en combinación con la quimioterapia no confirió ventajas en la supervivencia (10.6 meses), con respecto a los pacientes tratados con la quimioterapia solamente (10.5 meses). Tampoco se observaron diferencias en cuanto al tiempo de progresión de la enfermedad, los niveles de respuesta objetiva y la duración de la respuesta, entre el grupo tratado con el inhibidor y el grupo al cual se le administró placebo solamente.

Otro ensayo denominado TALENT (TARceva Lung cancer iNvestigaTion) se realizó fuera de Estados Unidos, y en él participaron 1 172 pacientes que recibieron Erlotinib o placebo en combinación con Gemcitabine o Cisplatino [56]. Este ensayo tampoco mostró resultados significativamente diferentes a los anteriores.

Por último, en un ensayo aleatorizado en fase III, realizado por el Instituto Nacional de Cáncer de Canadá (BR21; 731 pacientes), en el cual se comparó la efectividad del Erlotinib en pacientes que habían progresado previamente con la quimioterapia y pacientes a los cuales se les administró placebo y cuidado médico, sí se observó un incremento de los niveles de respuesta objetiva (8.9% frente a menos del 1%) y de la supervivencia de los pacientes (6.7 meses frente a 4.7 meses), a favor del Erlotinib [57]. Estos resultados condujeron a la aprobación del Erlotinib por parte de la FDA como segunda y tercera líneas de tratamiento a pacientes con carcinomas de pulmón de células no pequeñas en estadios tardíos de la enfermedad.

Optimización de terapias basadas en compuestos anti-REGF

Blancos moleculares y factores predictores de respuesta

A diferencia de las terapias citotóxicas tradicionales, como la quimioterapia y la radioterapia, las terapias actuales, basadas en blancos moleculares bien definidos, requieren de una elevada precisión, y es necesario conocer en detalle

cuáles son los blancos vitales capaces de afectar la biología de los tumores y que, por tanto, no deben ser omitidos. Esta necesidad de optimizar las intervenciones inmunoterapéuticas ha inducido la búsqueda de marcadores confiables que permitan predecir de forma temprana la evolución de los pacientes, así como seleccionar poblaciones de pacientes que pudieran resultar más beneficiadas con un tratamiento determinado. El primer blanco seleccionado como posible predictor de eficacia de los tratamientos con agentes bloqueadores de la actividad del REGF fue, precisamente, el receptor, basado quizás en las experiencias previas, que demuestran que la efectividad del Herceptín y del Tamoxifeno dependen, sobre todo, de los niveles de expresión de las moléculas blanco para estos agentes [58].

Por otra parte, los estudios con vistas a establecer la importancia del REGF como factor de pronóstico, independientemente del tratamiento en la evaluación de pacientes con cáncer, han generado un gran debate con una amplia diversidad de criterios. Los niveles de expresión del REGF varían entre un tipo de tumor y otro debido, en parte, a las diferencias en los métodos de detección. El porcentaje de tumores REGF-positivos en algunos tumores sólidos, como los carcinomas de pulmón de células no pequeñas se encuentra en un rango del 40 al 80%, llegando hasta un 100% en los tumores de cabeza y cuello [59]. Otros tumores sólidos como los melanomas exhiben niveles de receptores significativamente inferiores, al punto de que se hace controversial el criterio de positividad o no [60, 61].

En algunos tipos de tumores, como los de células escamosas de cabeza y cuello, la expresión de REGF parece estar estrechamente vinculada con un incremento en la recurrencia de la enfermedad, la reducción de la supervivencia de los pacientes, así como el paso a estadios avanzados del tumor y el incremento en la aparición de metástasis. Existen, además, reportes que asocian la expresión del REGF con un incremento significativo del índice proliferativo, así como una reducción de la supervivencia de pacientes con cáncer de mama [62]. Estos resultados han llevado a los investigadores a considerar los niveles de expresión de REGF como un factor predictor muy importante en estos tumores, superior a otros indicadores. Sin embargo, este mismo criterio no ha sido lo suficientemente sólido para otros tumores como los de carcinomas de pulmón y colon. Existe un excelente trabajo de revisión de Nicholson [16], en el que se analiza la relación existente entre la expresión del REGF, el tiempo libre de recaída de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes, en diez tipos de tumores diferentes. Este análisis agrupó más de 200 estudios y más de 20 000 pacientes. El resultado mostró que el valor predictivo de los niveles de expresión del REGF puede variar de manera significativa entre diferentes tipos de tumores. Por ejemplo, mientras en tumores de cabeza y cuello, ovario, vejiga y esófago, el nivel de expresión de REGF demostró ser un indicador muy apropiado para predecir la evolución de los pacientes; otros tumores como los de mama, gástricos, colon-rectales y de endometrio solo mostraron un nivel predictivo modesto. Más desalentador aún resultó el aporte del REGF en tumores de pulmón de células no pequeñas, en que los niveles de expresión de la proteína raramente ofrecieron información acerca del pronóstico de los pacientes.

45. Krishnan S, Brown PD, Ballman KV, Fiveash JB, Uhm JH, Giannini C, et al. Phase I trial of erlotinib with radiation therapy in patients with glioblastoma multiforme: results of North Central Cancer Treatment Group protocol N0177. North Central Cancer Treatment Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;65(4):1192-9.

46. Penne K, Bohlin C, Schneider S, Allen D. Gefitinib (Iressa, ZD1839) and tyrosine kinase inhibitors: the wave of the future in cancer therapy. *Cancer Nurs* 2005;28(6):481-6.

47. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial). *J Clin Oncol* 2003;21(12):2237-46.

48. Natale RB. Effects of ZD1839 (Iressa, gefitinib) treatment on symptoms and quality of life in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Semin Oncol* 2004;31(3 Suppl 9):23-30.

49. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Miller V, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 1. *J Clin Oncol* 2004;22(5):777-84.

50. Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, Natale RB, Miller V, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 2. *J Clin Oncol* 2004;22(5):785-94.

51. Thatcher N, Chang A, Parikh P, Rodríguez Pereira J, Ciuleanu T, von Pawel J, et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* 2005;366(9496):1527-37.

52. Arteaga CL, Baselga J. Tyrosine kinase inhibitors: why does the current process of clinical development not apply to them? *Cancer Cell*. 2004;5(6):525-31.

53. Hidalgo M, Siu LL, Nemunaitis J, Rizzo J, Hammond LA, Takimoto C, et al. Phase I and pharmacologic study of OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies. *J Clin Oncol* 2001;19(13):3267-79.

54. Perez-Soler R, Chachoua A, Huberman M, Karp D, Rigas J, Hammond L, et al. A phase II trial of the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor OSI-74, following platinum-based chemotherapy, in patients with advanced, EGFR expressing, non small cell lung cancer (NSCLC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001;310a (abstr 1235).

55. Herbst RS, Prager D, Hermann R, Fehrenbacher L, Johnson BE, Sandler A, et al. TRIBUTE Investigator Group. TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(25):5892-9.

56. Sandler A. Clinical experience with the HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitor erlotinib. *Oncology (Williston Park)*. 2003;17(Suppl 12):17-22.

Es lógico pensar que los agentes que ejercen su actividad antitumoral mediante el bloqueo del REGF muestren una mayor efectividad en tumores con elevada expresión de la proteína, mientras su actividad debe disminuir de manera considerable (o desaparecer) en tumores, por definición, negativos al REGF. Es importante recordar que cuando se define un tumor como receptor-negativo, ello no significa necesariamente que no exista expresión de la proteína, ya que los métodos actuales de inmunohistoquímica clasifican los tumores como REGF-positivos solo si expresan más de 30 000 moléculas por célula. Según esta suposición, el Cetuximab, por ejemplo, aprobado para el uso de tumores de carcinomas colon-rectales, solo se indica en aquellos tumores que sean REGF-positivos, de acuerdo con el criterio de positividad a partir del empleo del kit EGFR pharmDx, provisto por DakoCytomation, y también aprobado por la FDA [63]. Sin embargo, los resultados del ensayo en fase II en el cual se aplicó Cetuximab en combinación con Irinotecán, a pacientes con carcinomas colon-rectales refractarios a la quimioterapia, mostraron que la eficacia del tratamiento no tuvo correlación con los niveles de expresión del REGF [64]. Otros resultados similares se han obtenido a partir de la aplicación del Gefitinib en pacientes con cáncer de mama [65] o carcinomas de pulmón de células no pequeñas en estadios avanzados [54]. La idea inicial de tratar muchos tumores de manera similar, como si todos fueran clínica y biológicamente iguales, ha comenzado a abandonarse, y la comunidad científica está aceptando una realidad bien diferente: los niveles de expresión de proteína de REGF pudieran ser necesarios pero insuficientes para predecir el éxito o no de los agentes bloqueadores del REGF. Ello pudiera, en parte, explicar el poco éxito logrado luego del tratamiento con algunos compuestos antagonistas del REGF. Un caso muy ilustrativo lo constituyen los tumores de pulmón de células no pequeñas. Las experiencias clínicas derivadas del uso del Gefitinib en estos tumores indican un mayor nivel de respuesta en adenocarcinomas con respecto a tumores de células escamosas, a pesar de que los niveles de expresión de REGF son significativamente mayores en tumores escamosos (82%) que en adenocarcinomas (44%) [66]. Las interpretaciones que deriven de estos análisis podrían conducir, por una parte, a la búsqueda de nuevos blancos (proteínas o vías de señalización) asociados al REGF; pero también al abandono prematuro de la aplicación de algunos de estos agentes por causa de la falta de resultados alentadores.

Un predictor potencial de respuesta que ha cobrado importancia recientemente lo constituye el nivel basal de activación del REGF y la dependencia de las vías intracelulares de señalización del receptor. Un ejemplo de esto, aún en evaluación preclínica, asocia la presencia de una forma mutada de la proteína fosfatasa PTEN que muestra resistencia a ITK. Algunos investigadores han señalado que el Gefitinib inhibió la fosforilación del REGF en la línea de cáncer de mama MDA-468 a concentraciones tan bajas como 0.1 μM ; sin embargo, se requirieron concentraciones superiores a 1 μM para inhibir la señalización mediante la vía PI-3K/Akt. Esta resistencia se asoció a la presencia de la forma mutada de la proteína PTEN [67]. Más interesante aún resulta el estudio publicado por Li y cols. [68], en el que muestran la incapacidad del Gefitinib para inhibir la activación de Akt y ERK en líneas de glioma malignos, a pesar de

bloquear la activación del REGF y de STAT-3. En esta investigación, los autores concluyen que una inhibición efectiva de la señalización por Akt y ERK no se logra con dosis inferiores a los 2 a 5 μM , mientras los esquemas actuales de dosis de este agente en la clínica recomiendan usualmente dosis de 250 mg/diarios, lo cual equivale a una concentración plasmática de 0.45 μM [69]. Particularmente, en algunos estudios preclínicos en este tipo de tumores, el Gefitinib no ha mostrado buena actividad antitumoral [28].

Otro predictor muy estudiado en la actualidad lo constituye la presencia de dímeros y formas mutadas del REGF. Se ha establecido que la expresión de HER2 puede potenciar la señalización del REGF [70] y contribuir a la transformación y progresión tumoral [71]. Un ejemplo de ello lo demuestran los efectos sinérgicos obtenidos a partir de la utilización conjunta del Cetuximab con anticuerpos anti-HER2 en cáncer de ovario con alta expresión de HER2 [72]; o la potenciación del efecto antitumoral del Trastuzumab en combinación con el Gefitinib en tumores de mama BT-474 xenotrasplantados, con elevada amplificación génica de HER2 [73]. La expresión del HER3 se ha asociado con la respuesta positiva a terapias basadas en ITK. En pacientes con cáncer de pulmón en estadios avanzados de la enfermedad, que recibieron tratamiento con Gefitinib, se constató que un número elevado de copias del gen del HER3 estuvo asociado con un mayor nivel de respuesta (36 frente a 10%) y la disminución del tiempo de progresión a la enfermedad (7.7 frente a 2.7 meses), aunque no así al aumento de la supervivencia (10 frente a 11 meses) [74]. Adicionalmente, la presencia de mutaciones somáticas en el dominio catalítico del REGF se ha propuesto como otro factor importante que se ha de considerar para predecir las respuestas positivas al tratamiento con compuestos ITK [75]. Sin embargo, esto constituye actualmente un tópico de debate, debido a la baja frecuencia de estas mutaciones en importantes grupos poblacionales, así como por el reciente hallazgo de mutaciones secundarias generadas en pacientes con tumores de pulmón tratados con ITK, quienes ofrecen resistencia a este tipo de compuestos [76].

El *rash* cutáneo asociado con el bloqueo del REGF ha constituido otro importante posible predictor de respuesta al tratamiento con compuestos inhibidores del REGF. Varios autores han asociado el *rash* a la inhibición de la señalización en células de la piel, lo cual provoca una detención del ciclo celular en keratinocitos y un aumento de los niveles de la proteína $p27^{Kip1}$ [77]. Sin embargo, varios resultados contradictorios han puesto en duda la hipótesis de que el *rash* es un predictor eficaz de respuesta al tratamiento con agentes bloqueadores del receptor. Un estudio publicado por Saltz y cols. [64] demuestra la aparición de *rash* en el 96% de los pacientes que mostraron buenas respuestas al tratamiento combinado de Cetuximab e Irinotecán. En cambio, este mismo reporte indicó que el 74% de los pacientes que no respondían al tratamiento manifestó reacciones alérgicas similares. Por otra parte, importantes respuestas al tratamiento con el anticuerpo Nimotuzumab no parecen estar asociadas con la aparición de *rash* cutáneo en los pacientes tratados [40, 43]. Esta aparente contradicción pudiera estar dada, en parte, por las diferentes afinidades

57. Shepherd FA, Rodríguez Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005;353(2):123-32.

58. Pegram MD, Pauletti G, Slamon DJ. HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52(1-3):65-77.

59. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *N Crit Rev Oncol Hematol* 1995;19(3):183-232.

60. Real FX, Rettig WJ, Chesa PG, Melamed MR, Old LJ, Mendelsohn J. Expression of epidermal growth factor receptor in human cultured cells and tissues: relationship to cell lineage and stage of differentiation. *Cancer Res*. 1986;46(9):4726-31.

61. Ellis DL, King LE Jr, Nanney LB; Sparrow LE, Heenan PJ. Differential expression of epidermal growth factor receptor in melanocytic tumours demonstrated by immunohistochemistry and mRNA *in situ* hybridization. *Australas J Dermatol* 1999; 40(1):19-24.

62. Macías A, Azavedo E, Hagerstrom T, Klintonberg C, Pérez R, Skoog L. Prognostic significance of the receptor for epidermal growth factor in human mammary carcinomas. *Anticancer Res* 1987;7(3):459-64.

63. Dako Cytomation. EGFR pharmDxTM Package Insert. Carpinteria, CA: Dako, 2004.

64. Saltz L, Rubin MS, Hochster HS, Tchekmeydian NS, Waksal HW, Needle MN, et al. Acne-like rash predicts response in patients treated with cetuximab (IMC-225) plus irinotecan (CPT-11) in CPT-11-refractory colorectal cancer (CRC) that expresses epidermal growth factor receptor (EGFR). Presented at AACR-NCI-EORTC Int Conf 2001; abstr 559.

65. Lacouzio-Donahue CA, Albain KS, Ellegde R, Gradishar W, Hayes RL, Rowinsky E, et al. Determination of response to gefitinib in patients with advanced breast cancer. AACR-NCI-EORTC Int Conf 2003; Boston MA.

66. Hirsch FR, Varella-García M, Bunn PA Jr, Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 2003;21(20):3798-807.

67. Bianco R, Shin I, Ritter CA, Yakes FM, Basso A, Rosen N, et al. Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGF tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2003;22(18):2812-22.

68. 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(21):7443-50.

69. Baselga J, Rischin D, Ranson M, Calvert H, Raymond E, Kieback DG, et al. Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. *J Clin Oncol* 2002;Nov1:20(21):4292-302.

entre ambos anticuerpos por el REGF. Como ya se anunció antes, el Nimotuzumab podría bloquear con efectividad el REGF en los tumores, sin causar efectos adversos en células de la piel. Al respecto, resulta interesante considerar la diferencia entre la dosis óptima propuesta para el Cetuximab en el tratamiento a pacientes, sugerida a partir de los estudios con ratones, y las dosis superiores requeridas para lograr la saturación, verificada en estudios en fase I [78]. Esta diferencia no se observa con el uso del Nimotuzumab, a pesar de que ambos inhibidores poseen la capacidad de unirse al REGF humano, pero no al murino, lo cual sugiere que, a diferencia del Nimotuzumab, el Cetuximab podría ejercer un bloqueo importante en células no tumorales con expresión del REGF.

Otros elementos importantes que se deben considerar con vistas a incrementar el éxito en la aplicación de las terapias antitumorales, están relacionados con la dosificación de estos compuestos. Contrario a las terapias convencionales, en que la dosis máxima permitida depende de la toxicidad de la droga o la terapia que se ha de aplicar, en los agentes inmunoterapéuticos anti-REGF, es necesario definir las dosis biológicas óptimas y los esquemas de tratamiento con los cuales se logre una saturación completa y sostenida y/o inhibición de la actividad del REGF [79]. Algunos ejemplos enunciados antes en esta revisión evidencian que las dosis para la aplicación de algunos de estos compuestos, pudieran no corresponderse con las dosis requeridas para obtener una actividad biológica óptima [68]. De forma análoga, las secuencias óptimas requeridas para los tratamientos con inhibidores del REGF solo podrán definirse a partir de la experiencia y el análisis detallado de los resultados derivados de los ensayos clínicos. Hasta la fecha, estos compuestos se han evaluado generalmente en pacientes con enfermedad metastásica o en estadios muy avanzados, y luego de tratamientos citotóxicos. En el futuro, será necesario evaluar estos agentes como monoterapia o en combinación con las terapias tradicionales, como primera línea de tratamiento. Existen evidencias experimentales que parecen apuntar que esta estrategia es la correcta: la sobre expresión del REGF en lesiones hiperplásicas y neoplásicas sugiere que esta puede ocurrir varios años antes de la aparición de la enfermedad invasiva y metastásica [80]; así como la mayor eficacia mostrada por algunos de estos compuestos como primera línea de tratamiento, con respecto a su aplicación a pacientes con falla previa a terapias citotóxicas [81].

Terapias de combinación

Se puede pensar, entonces, que los escasos resultados tras administrarles inhibidores del REGF a los pacientes, pudieran justificarse, en parte, por la ausencia de marcadores adecuados para predecir respuestas ante este tipo de compuestos. Ello se evidencia en la marcada diferencia de sensibilidad frente al tratamiento en cada paciente: mientras algunos parecen responder de manera muy efectiva al tratamiento, en otros los niveles de respuestas son muy pobres o prácticamente nulos. Una segunda hipótesis, que no excluye la consideración anterior, pudiera asociarse a la redundancia imperante en los sistemas de control del sistema inmune sobre las células tumorales. Esta hipótesis sugiere que el control de la proliferación de las células tumorales pudiera ser

resistente a la intervención inmunoterapéutica sobre un solo punto, lo cual demandará el empleo de combinaciones terapéuticas con vistas a incrementar la eficacia de los efectos antitumorales.

La adquisición de un fenotipo maligno por una célula requiere previamente de todo un conjunto de cambios o alteraciones que lleven a su transformación en célula tumoral [82]. El resultado de este proceso será la alteración de las vías de señalización diversas y redundantes, por lo que la combinación de diferentes agentes con diferentes mecanismos de acción podría ser necesaria con vistas a lograr el nivel de modulación requerido sobre una vía determinada. Esta premisa ha sentado las bases necesarias para la búsqueda y aplicación de combinaciones terapéuticas racionales basadas en las terapias actuales. Muchos de los resultados mostrados anteriormente sugieren que las terapias basadas en la inhibición del REGF pueden ser combinadas de manera favorable con medicamentos citotóxicos, con radiaciones ionizantes, citoquinas y con otros agentes destinados al tratamiento de tumores con alta expresión de REGF.

La observación de que los AcM y los ITK exhiben mecanismos de acción complementarios, unido a que ambas clases de inhibidores se unen a diferentes sitios (no competitivos) del REGF, sugiere la posibilidad de combinarlos para potenciar el efecto antitumoral logrado con ambas clases de compuestos por separado. Esta atractiva idea ha comenzado a investigarse recientemente, y a pesar de que aún se encuentra en estadios de evaluación preclínica, han aparecido resultados primarios que son alentadores [83]. Existen, además, numerosos estudios preclínicos que demuestran que la inhibición del REGF, mediante el empleo de AcM e ITK, puede potenciar la actividad de drogas citotóxicas o de la terapia de radiación en líneas celulares sensibles a los inhibidores del receptor. La radiosensibilización por agentes anti-REGF pudiera estar dada, en parte, por alteraciones en el ciclo celular, por la inhibición de los mecanismos de reparación de daños al ADN debido a la radiación, o por la eliminación de señales de supervivencia esenciales para la célula ocasionada por la detención del ciclo celular, todo lo cual lleva a la apoptosis [84]. La adición de anticuerpos monoclonales, fundamentalmente, a terapias de radiación, ha mostrado superioridad con respecto a la radiación tradicional administrada como monoterapia [39].

La aplicación conjunta de compuestos moleculares inhibidores del REGF y de drogas citotóxicas como el Carboplatino, el Paclitaxel y la Gemcitabina, es quizás donde más experiencia se ha acumulado. A pesar de que algunos resultados no han mostrado el éxito esperado, para muchos las terapias combinadas son superiores a las terapias citotóxicas tradicionales. La anterior afirmación se basa en que los compuestos inhibidores del REGF han mostrado la capacidad de revertir la resistencia generada frente a las terapias convencionales [54, 57, 85].

La combinación de compuestos antagonistas del REGF con drogas que actúen en el interior de las células inhibiendo blancos moleculares específicos de importancia, como las proteínas MAPK o Akt, pudiera aumentar potencialmente la actividad antitumoral. La activación del REGF lleva a un incremento en la transcripción de proteínas, como el receptor del factor

70. Karunagaran D, Zahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, et al. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* 1996;15(2):254-64.

71. Muller WJ, Arteaga CL, Muthuswamy SK, Siegel PM, Webster MA, Cardiff RD, et al. Synergistic interaction of the Neu proto-oncogene product and transforming growth factor alpha in the mammary epithelium of transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1996;16(10):5726-36.

72. Ye D, Mendelsohn J, Fan Z. Augmentation of a humanized anti-HER2 mAb 4D5 induced growth inhibition by a human-mouse chimeric anti-EGF receptor mAb C225. *Oncogene* 1999;18(3):731-8.

73. Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, Bianco R, Simpson JF, Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2001;61(24):8887-95.

74. Cappuzzo F, Toschi L, Domenichini I, Bartolini S, Ceresoli GL, Rossi E, et al. HER3 genomic gain and sensitivity to gefitinib in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 2005;93(12):1334-40.

75. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubha gavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, 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(21):2129-39.

76. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, 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(3):e73.

77. Pérez-Soler R. Can rash associated with HER1/EGFR inhibition be used as a marker of treatment outcome? *Oncology (Williston Park)*, 2003;17(Suppl 12):23-8.

78. Baselga J, Pfister D, Cooper MR, Cohen R, Burtless B, Bos M, 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(4):904-14.

79. Kawamoto T, Mendelsohn J, Le A, Sato GH, Lazar CS, Gill GN. Relation of epidermal growth factor receptor concentration to growth of human epidermoid carcinoma A431 cells. *J Biol Chem* 1984;259(12):7761-6.

80. Rusch V, Klimstra D, Linkov I, Dmitrovsky E. Aberrant expression of p53 or the epidermal growth factor receptor is frequent in early bronchial neoplasia and coexpression precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Res*. 1995; 55(6):1365-72.

81. Yang CH, Shih JY, Chen KC, Yu CJ, Yang TY, Lin CP, et al. Survival outcome and predictors of gefitinib antitumor activity in East Asian chemo-naïve patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2006 (en prensa).

82. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.

de crecimiento de la vasculatura endotelial (RVEGF). Por tanto, la inhibición del REGF puede modular la expresión de estas proteínas, y facilitar así la acción de compuestos que actúen directamente sobre estos blancos. Un ejemplo reciente de ello lo demuestra el estudio realizado por Lamszus y cols. [86] mediante la potenciación del efecto inhibitorio de la angiogénesis, lograda con la aplicación conjunta del AcM anti-REGF C225 y un anticuerpo anti-RVEGF-2 (receptor tipo 2 del VEGF). Igualmente, las células de A431, un carcinoma epidermoide con alta expresión de REGF, sensible al bloqueo por AcM anti-REGF, muestran un incremento en la resistencia al tratamiento con los anticuerpos Cetuximab y Nimotuzumab, debido al aumento en la expresión y secreción de VEGF *in vivo* [87]. Estos resultados indican, por tanto, que la terapia combinada de agentes anti-REGF con inhibidores de la angiogénesis podría actuar en ambos sentidos, incrementando simultáneamente la eficacia de ambos tipos de compuestos, con una potenciación del efecto antitumoral que ocurre posteriormente.

Aunque no se ha podido demostrar si los pacientes con cáncer presentan o no una capacidad limitada para responder al tratamiento con AcM, que estimule respuestas de ADCC, esta podría ser una premisa fundamental para la administración de AcM en combinación con citoquinas inmunopotenciadoras, como la interleuquina 2 (IL-2), las cuales estimulan funciones inmunes efectoras. Este aspecto podría resultar de vital importancia, principalmente en el tratamiento a pacientes de mucha edad, en estadios avanzados de la enfermedad, o sometidos a rigurosos tratamientos citotóxicos como la quimioterapia o la radioterapia, factores estos que están asociados con importantes estados de inmunosupresión.

Recibido en noviembre de 2006. Aprobado en marzo de 2007.

Conclusiones

Las terapias para inhibir el crecimiento de tumores mediante el bloqueo del REGF con agentes moleculares, representan una nueva oportunidad de éxito en el tratamiento a los pacientes con cáncer (Tabla 2). Estas terapias parecen ser sustancialmente superiores a las modalidades convencionales empleadas hasta la fecha. Algunos de estos agentes ya han comenzado a evaluarse en pacientes. Corresponderá ahora a la investigación preclínica, de conjunto con la evaluación derivada de los ensayos clínicos, la búsqueda y selección de marcadores apropiados que permitan predecir de forma temprana qué tipos de tumores resultarán más afectados con un tratamiento determinado, con vistas a incrementar los efectos beneficiosos en los pacientes, y al mismo tiempo evitar exposiciones innecesarias a terapias, muchas veces invasivas. La aplicación combinada de manera racional de estos agentes moleculares, con las llamadas terapias citotóxicas tradicionales, podría conducir a una etapa superior en el tratamiento del cáncer, en que por fin sea común observar remisiones tumorales o estabilizaciones de la enfermedad, así como emplear tratamientos prolongados de baja toxicidad y, a su vez, extender la supervivencia de los pacientes con una calidad de vida apropiada.

83. Matar P, Rojo F, Cassia R, Moreno-Bueno G, Di Cosimo S, Tabernero J, *et al.* Combined epidermal growth factor receptor targeting with the tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839) and the monoclonal antibody cetuximab (IMC-C225): superiority over single-agent receptor targeting. *J Clin Cancer Res* 2004;10(19):6487-501.

84. Bonner JA, Raich KP, Trummell HQ, Robert F, Meredith RF, Spencer SA, *et al.* Enhanced apoptosis with combination C225/radiation treatment serves as the impetus for clinical investigation in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 2000;18(21 Suppl):47S-53S.

85. Baselga J, Albanell J. Epithelial growth factor receptor interacting agents. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002 Oct;16(5):1041-63.

86. Lamszus K, Brockmann MA, Eckerich C, Bohlen P, May C, Mangold U, *et al.* Inhibition of glioblastoma angiogenesis and invasion by combined treatments directed against vascular endothelial growth factor receptor-2, epidermal growth factor receptor, and vascular endothelial-cadherin. *Clin Cancer Res* 2005;11(13):4934-40.

87. Vilorio-Petit A, Crombet T, Jothy S, Hicklin D, Bohlen P, Schlaeppli JM, *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(13):5090-101.

Tabla 2. Resumen de las principales razones que convierten al REGF en un blanco relevante para la terapia del cáncer

Número	REGF: un blanco relevante en el tratamiento del cáncer
1	El REGF es una proteína TK relacionada con el proceso de señalización celular
2	El REGF es el producto de un oncogén
3	El REGF se expresa en muchos tipos de tumores en niveles relativamente muy superiores a los encontrados en tejidos normales
4	La sobre expresión del REGF parece estar asociada con un mal pronóstico y con una mala evolución de la enfermedad en algunos tipos de tumores
5	Varios agentes inmunoterapéuticos específicos contra el REGF son capaces de inhibir su actividad, lo que lleva a importantes efectos antitumorales