

Universidad de La Habana

Facultad de Biología



**Mecanismo de reconocimiento de antígenos relacionados con el gangliósido  
NeuGcGM3 y el receptor del factor de crecimiento epidérmico, por  
anticuerpos anti-tumorales: una aproximación estructural**

Tesis presentada en opción al grado científico  
de Doctor en Ciencias Biológicas

Autor: Lic. Ariel Talavera Pérez

Tutor: DrC. Ernesto Moreno Frías



*Centro de Inmunología Molecular*

*Ciudad de La Habana*

*2009*



## Síntesis

Diversas biomoléculas han sido identificadas como blancos para el tratamiento del cáncer, empleando por ejemplo anticuerpos monoclonales. En este trabajo se estudiaron tres anticuerpos (14F7, P3 y 1E10) relacionados con el gangliósido N-glicolil-GM3, un antígeno tumor-específico. Además se estudió el anticuerpo Nimotuzumab, dirigido contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que es un antígeno asociado a tumores. Se construyeron los modelos de los complejos formados por estos anticuerpos con sus antígenos. Estos modelos concuerdan con datos experimentales previos y otros presentados en esta tesis.

Las estructuras cristalinas de los anticuerpos 14F7 y P3 sirvieron como punto de partida para proponer sendos modelos teóricos de sus complejos con el gangliósido. Además, para el anticuerpo 1E10, anti-idiotipo del P3, se propuso un mecanismo que describe su capacidad de generar anticuerpos anti-gangliósidos N-glicolilados, cuando es usado como vacuna.

Usando la estructura cristalina del Nimotuzumab, se obtuvo un modelo de su complejo con el EGFR. Este modelo predice un mecanismo de inhibición de la señalización a través de este receptor, que es diferente al descrito para otros anticuerpos anti-EGFR. Este nuevo mecanismo explica la baja toxicidad del Nimotuzumab en los diferentes ensayos clínicos.

El enfoque estructural de esta tesis condujo a la postulación de mecanismos novedosos de mimica de gangliósidos por anticuerpos anti-idiotipos, y de inhibición de la activación del EGFR. Estos resultados contribuyen a la comprensión de las propiedades antitumorales de anticuerpos específicos por estos blancos.

## Lista de artículos incluidos en la tesis

Esta tesis está compuesta por siguientes artículos, los cuales serán referidos por sus números romanos.

- I. Krenzel U, Olsson LL, Martínez C, **Talavera A**, Rojas G, Mier E, Angström J, Moreno E. Structure and molecular interactions of a unique antitumor antibody specific for N-glycolyl GM3. *J Biol Chem.* 2004 Feb 13;279(7):5597-603
- II. **Talavera A**, Eriksson A, Lopez-Requena A, Ökvist M, Fernández-Marrero Y, Pérez R, Moreno E, Krenzel U. Structure of an anti-ganglioside antibody and models of its interaction with the NeuGc-GM3 ganglioside and an anti-idiotypic antibody. *Mol. Immunol.* (2009), doi:10.1016/j.molimm.2009.07.032.
- III. **Talavera A**, Friemann R, Gómez-Puerta S, Martínez-Fleites C, Garrido G, Rabasa A, Lopez-Requena A, Pupo A, Johansen RF, Sánchez O, Krenzel U y Moreno E. Nimotuzumab, an anti-tumor antibody that targets the epidermal growth factor receptor, blocks ligand binding while permitting the active receptor conformation. *Cancer Res.* 2009 Jul 15;69(14):5851-9.

## Artículos relacionados

- López-Requena A, Rodríguez M, de Acosta CM, Moreno E, Puchades Y, González M, **Talavera A**, Valle A, Hernández T, Vázquez AM, Pérez R. Gangliosides, Ab1 and Ab2 antibodies II. Light versus heavy chain: An idio-type-anti-idio-type case study. *Mol Immunol.* 2007 Feb;44(5):1015-28.
- López-Requena A, De Acosta CM, Moreno E, González M, Puchades Y, **Talavera A**, Vispo NS, Vázquez AM, Pérez R. Gangliosides, Ab1 and Ab2 antibodies I. Towards a molecular dissection of an idio-type-anti-idio-type system. *Mol Immunol.* 2007 Jan;44(4):423-33.
- Light-chain shuffling results in successful phage display selection of functional prokaryotic-expressed antibody fragments to N-glycolyl GM3 ganglioside. Rojas G, **Talavera A**, Munoz Y, Rengifo E, Krenzel U, Angström J, Gavilondo J, Moreno E. *J Immunol Methods.* 2004 Oct;293(1-2):71-83.

## Abreviaturas más frecuentes

Ab1	Anticuerpo anti-antígeno nominal
Ab2	Anticuerpo anti-idiotipo
Ab3	anticuerpo anti-anti-Ab2
Ab3 <sub>P3</sub>	Anticuerpos generados contra el anticuerpo 1E10 capaces de reconocer a gangliósidos <i>N</i> -glicosilados
AcM	Anticuerpo monoclonal
CDR	Región determinante de la complementariedad
CH	Dominio constante de la cadena pesada de un anticuerpo
CL	Dominio constante de la cadena ligera de un anticuerpo
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
eEGFR	Región extracelular del receptor de EGF
EGFR	Receptor de EGF
Fab	Fragmento de anticuerpo que contiene una cadena ligera, así como el dominio variable y el primer dominio constante de una cadena pesada
PDB	Siglas del inglés “Protein Data Bank”
VH	Región variable de la cadena pesada
VL	Región variable de la cadena ligera



# Índice

<b>1 Introducción</b>	<b>9</b>
<b>2 Revisión Bibliográfica</b>	<b>15</b>
2.1 Los anticuerpos	15
2.1.1 Estructura de los anticuerpos	15
2.1.2 Humanización de anticuerpos	17
2.1.3 Los anticuerpos anti-idiotipo	17
2.2 Gangliósidos	19
2.2.1 Estructura, localización y función	19
2.2.2 Gangliósidos N-glicolilados	20
2.2.3 Anticuerpos anti-gangliósidos	21
2.2.3.1 Los anticuerpos monoclonales 14F7 y chP3	22
2.2.4 Anticuerpos anti-idiotipo relacionados con el sistema de los gangliósidos	23
2.2.4.1 El AcM 1E10	24
2.3 Receptor del factor de crecimiento epidérmico	25
2.3.1 Estructura y función	25
2.3.2 Cascada de señalización del EGFR	27
2.3.3 Anticuerpos anti-EGFR	28
2.3.3.1 El AcM Nimotuzumab	29
2.4 Cristalografía de proteínas	29
2.4.1 Cristalización de proteínas.	30
2.4.2 Difracción de rayos X	31
2.4.3 El problema de fase	32
2.4.4 Reemplazo molecular.	33
2.4.5 Refinamiento estructural y validación	34
2.5 Modelación computacional	36
2.5.1 Dinámica molecular	36
2.5.2 Predicción de complejos	36
<b>3 Resumen de resultados</b>	<b>39</b>
3.1 Anticuerpos relacionados con el gangliósido NeuGcGM3	39
3.1.1 El AcM 14F7 (artículo I)	39
3.1.1.1 La estructura del fragmento Fab del 14F7	39
3.1.1.2 Modelo del complejo 14F7-NeuGcGM3	39
3.1.2 Los AcMs P3 y 1E10 (artículo II)	40
3.1.2.1 Estructura del fragmento Fab del anticuerpo chP3	40
3.1.2.2 Estudios de mutagénesis dirigida en la cadena pesada del P3	40
3.1.2.3 Modelo del complejo chP3/NeuGcGM3	41
3.1.2.4 Modelo de la interacción entre el AcM P3 y su anti-idiotipo, el AcM 1E10	42
3.2 El AcM anti-EGFR Nimotuzumab	44
3.2.1 Estructura del fragmento Fab del Nimotuzumab	44
3.2.2 Ensayos de competencia	45
3.2.3 Modelo del complejo Nimotuzumab/eEGFR	45

3.2.4 Estudios de mutagénesis dirigida que sustentan el modelo del complejo Nimotuzumab/eEGFR	46
3.2.5 El Nimotuzumab bloquea la unión del EGF sin inhibir la conformación activa del EGFR	47
<b>4 Discusión general</b>	<b>49</b>
4.1 Comparación de los modelos 14F7/ NeuGcGM3 y chP3/NeuGcGM3	49
4.2 Mimetiza el AcM 1E10 a los gangliósidos N-glicolilados?	51
4.3 Propuesta de un novedoso mecanismo de inhibición del EGFR	52
4.3.1 Implicaciones del modelo propuesto	53
<b>5 Conclusiones</b>	<b>55</b>
<b>6 Recomendaciones</b>	<b>56</b>
<b>7 Referencias Bibliográficas</b>	<b>57</b>

# 1 Introducción

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por la proliferación descontrolada de las células, la invasividad hacia tejidos vecinos y las metástasis a otros órganos a través de los nodos linfáticos o la sangre. Prácticamente todos los cánceres son causados por anomalías en el material genético de las células tumorales.

Las células tumorales pueden ser identificadas por la expresión de ciertas moléculas que le conceden a estas ventajas para la proliferación con respecto a los tejidos normales. Estas moléculas pueden ser únicamente expresadas por las células tumorales, en cuyo caso se les denomina como antígenos tumor-específicos, o pueden tener una expresión diferencial en estas células, llamándose entonces antígenos tumor-asociados. La identificación de estas moléculas es importante para el diagnóstico del cáncer y, más aún, provee nuevos blancos para el tratamiento de esta enfermedad.

El Centro de Inmunología Molecular (CIM) ha orientado parte de su trabajo hacia el desarrollo de terapias activas y pasivas, que tienen como blancos el gangliósido *N*-glicolil (NeuGc) GM3 (Fernández y cols., 2003), que es un antígeno tumor-específico, y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, siglas del inglés “epidermal growth factor receptor”) (González y cols., 2007; Ramos y cols., 2006; Ramos y cols., 2006; Vázquez y cols., 1995), un antígeno tumor-asociado. Dos anticuerpos monoclonales (AcMs) diferentes, llamados P3 (Vázquez y cols., 1995) y 14F7 (Carr y cols., 2000), han sido desarrollados contra el gangliósido NeuGcGM3, así como el anticuerpo 1E10 (Vázquez y cols., 1998), que es un anti-idiotipo del P3. Por otro lado, contra el EGFR se generó un AcM murino (Fernández y cols., 1992), del cual se obtuvo posteriormente su versión humanizada, denominada Nimotuzumab (también conocida como h-R3) (Mateo y cols., 1997).

La forma *N*-acetilada del gangliósido GM3 (NeuAcGM3) se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos humanos normales. En contraste, su variante *N*-glicolilada, el NeuGcGM3, es expresada por algunos tipos de células tumorales (Carr y cols., 2000; Marquina y cols., 1996), mientras que su presencia en células de tejidos normales es prácticamente indetectable (Malykh y cols., 2001). Esto hace que el NeuGcGM3 se considere

un antígeno tumor-específico.

El AcM P3 es una inmunoglobulina de ratón de isotipo IgM que reconoce varios gangliósidos *N*-glicolilados y sulfátidos (Vázquez y cols., 1995). El P3 es capaz de distinguir tumores humanos de tejidos normales (Alfonso y cols., 2002; Vázquez y cols., 1995). De manera similar, el AcM 14F7 también se generó contra el gangliósido NeuGcGM3, pero con una estrategia de inmunización diferente, y a diferencia del P3, sólo reconoce a este antígeno (Carr y cols., 2000). Las variantes *N*-acetilada y *N*-glicolilada del gangliósido GM3 sólo se diferencian entre sí en el cambio de un átomo de hidrógeno en la primera por un grupo hidroxilo en la segunda. Sin embargo, los anticuerpos P3 y 14F7 son capaces de discriminar entre estas dos variantes.

El AcM anti-idiotípico 1E10 se generó mediante la inmunización de ratones con el AcM P3, y se seleccionó por su capacidad de bloquear la unión del P3 con el NeuGcGM3 (Vázquez y cols., 1998). En los pacientes inmunizados con el 1E10 se generaron anticuerpos capaces de reconocer gangliósidos *N*-glicolilados (Alfonso y cols., 2002; Díaz y cols., 2003; Guthmann y cols., 2006; Hernández y cols., 2008; Neninger y cols., 2007). Este resultado también se obtuvo en pollos (Hernández y cols., 2008), donde, al igual que en los humanos, estos antígenos no están presentes en los tejidos normales (Miyoshi y cols., 1982).

Las interacciones idiotipo-antiidiotipo han sido estudiadas desde el punto de vista estructural en muy pocos casos, mediante la determinación de la estructura de los complejos idiotipo/ligando e idiotipo/anti-idiotipo. Como ejemplo, está el caso de los complejos del anticuerpo anti-lisozima D1.3 con la lisozima (D1.3/lisozima), y con su anti-idiotipo el AcM E5.2 (Fields y cols., 1995). En este estudio se encontró cierta mímica estructural entre los epítomos de la lisozima y del AcM E5.2. Esta mímica, llamada funcional, se caracteriza porque gran parte de las interacciones que se establecen entre, tanto la lisozima como el anticuerpo anti-idiotipo E5.2, con el AcM D1.3, son a través de grupos químicos similares, ubicados en posiciones espaciales equivalentes, y no debido a una réplica topológica exacta. Otro ejemplo son las estructuras de los complejos formados por el anticuerpo anti-HIV-1 2F5 con su ligando, la proteína gp120, y con su anti-idiotipo el AcM 3H6, respectivamente (Bryson y cols., 2008). En esta ocasión, no se encontraron evidencias de mímica estructural entre el

ligando y el anticuerpo anti-idiotipo.

El EGFR, por otra parte, es una glicoproteína que está involucrada en la proliferación de la células de origen epitelial. La activación del EGFR se debe fundamentalmente a su homodimerización, la cual acerca sus dominios tirosina cinasa, que se fosforilan e inician la señal para la proliferación celular (Garrett y *cols.*, 2002; Ogiso y *cols.*, 2002). Para que ocurra esta dimerización, el receptor tiene que sufrir un cambio conformacional que lo haga pasar de su conformación inactiva a la activa (dimerizante) (Ferguson y *cols.*, 2003). Esta conformación activa es estabilizada en presencia de sus ligandos, el factor de crecimiento epidérmico (EGF, siglas del inglés “epidermal growth factor”) y el factor  $\alpha$  transformador del crecimiento (TGF $\alpha$ , siglas del inglés “transforming growth factor  $\alpha$ ”) (Dawson y *cols.*, 2007; Ferguson y *cols.*, 2003). La correlación que existe entre la sobre-expresión del EGFR y el desarrollo de tumores, lo ha hecho un blanco atractivo para la terapia del cáncer (Ciardiello, F. and Tortora, G., 2008). Se han desarrollado dos enfoques principales para inhibir la señalización a través del EGFR en las células tumorales. Uno de ellos consiste en el uso de pequeñas moléculas que bloquean la fosforilación de los dominios intracelulares tirosina cinasa (Zhang y *cols.*, 2007). El segundo se basa en el uso de diferentes AcMs (Friedländer y *cols.*, 2008) que reconocen específicamente el dominio extracelular del EGFR (eEGFR), y que inhiben la señalización a través de este.

El AcM Nimotuzumab inhibe la actividad del EGFR debido a que bloquea su interacción con el EGF (Mateo y *cols.*, 1997). Para otros anticuerpos anti-EGFR, como el Cetuximab y el IMC-11F8, se determinó la estructura, por cristalografía de proteínas, de los complejos formados entre estos anticuerpos y el EGFR (Li y *cols.*, 2005; Li y *cols.*, 2008). De esta manera, se observó que estos anticuerpos inhiben la actividad del receptor no solo porque bloquean directamente la unión de sus ligandos, sino además porque impiden el cambio conformacional necesario para su dimerización.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se formularon las siguientes **hipótesis de trabajo**:

- Los AcMs 14F7 y P3 usan grupos químicos similares en su interacción con el gangliósido NeuGcGM3, que le permiten discriminar entre este ligando y su variante *N*-acetilada. Además, el AcM 1E10 porta una mímica funcional del gangliósido

NeuGcGM3, que le permite generar una respuesta de anticuerpos específica por gangliósidos N-glicolilados.

- El AcM Nimotuzumab se une al EGFR por una zona donde solapa parcialmente el sitio de unión del EGF e impide que el receptor adopte su conformación activa..

Para aceptar o refutar estas hipótesis nos trazamos los siguientes **objetivos**:

- Obtener las estructuras cristalográficas de los fragmentos Fab de los AcMs 14F7, chP3 y Nimotuzumab
- Obtener modelos, con detalles a nivel atómico, de la interacción entre el gangliósido NeuGcGM3 y los anticuerpos P3 y 14F7, respectivamente, y del P3 con su antiidiotipo 1E10.
- Construir un modelo del complejo formado entre el AcM Nimotuzumab y el EGFR, que permita describir a nivel molecular la interacción entre estas dos moléculas.

La **novedad científica** de este trabajo reside fundamentalmente en la propuesta de un mecanismo de mímica funcional del gangliósido NeuGcGM3 por el AcM 1E10, así como la postulación del mecanismo mediante el cual el anticuerpo Nimotuzumab bloquea la señalización a través del EGFR.

La **importancia práctica** de estos resultados está en su aporte a la comprensión de los mecanismos antitumorales de la vacuna anti-idiotípica 1E10 y del Nimotuzumab. El mejor entendimiento de las bases moleculares de la vacuna antiidiotípica 1E10 pudiera tener impacto en el desarrollo futuro de vacunas proteicas que mimeticen carbohidratos. Por otra parte, para el AcM Nimotuzumab se propuso un mecanismo novedoso de inhibición de la señalización a través del EGFR. Esto permite una diferenciación con respecto a otros anticuerpos anti-EGFR que también se encuentran en la clínica, así como una posible explicación de las bases moleculares del mejor perfil de seguridad mostrado por este anticuerpo en los diferentes ensayos clínicos.

Los resultados presentados en esta tesis forman parte de tres publicaciones científicas, una publicada en la revista *Journal of Biological Chemistry*, otra en *Cancer Research* y la otra en

*Molecular Immunology*. Estos trabajos también se han presentado en diferentes eventos nacionales e internacionales.

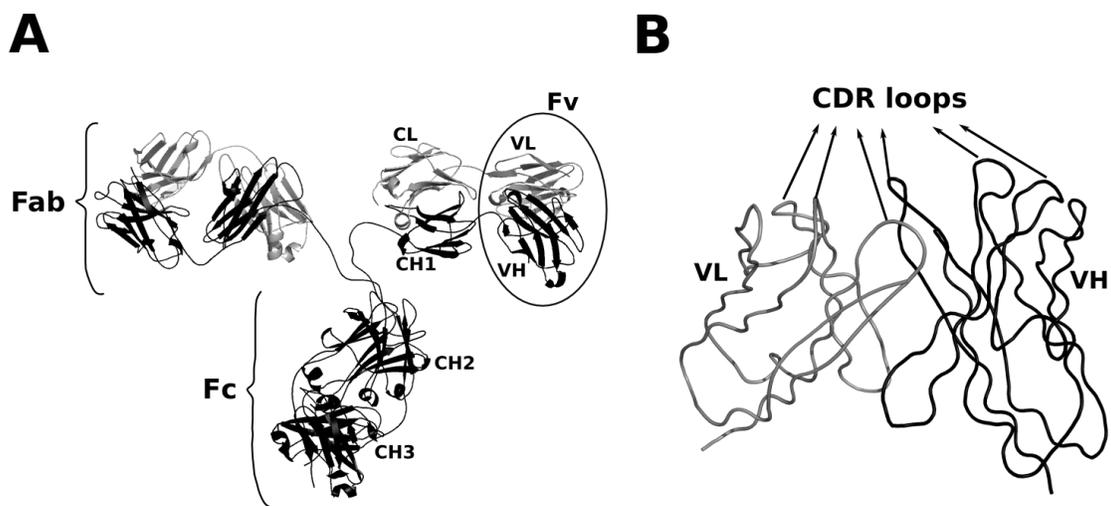


## 2 Revisión Bibliográfica

### 2.1 Los anticuerpos

#### 2.1.1 Estructura de los anticuerpos

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glicoproteínas producidas por el sistema inmune de los vertebrados para la detección y neutralización de una amplia gama de antígenos. Las inmunoglobulinas monoméricas como la IgG1 están compuestas por dos cadenas ligeras (L) de 25 kDa cada una, y dos cadenas pesadas (H, abreviatura del inglés “heavy”) de 50 kDa cada una. Una molécula de anticuerpo puede ser dividida en tres grandes fragmentos: dos Fabs idénticos y un Fc (Figura 2.1A). Cada fragmento Fab contiene una cadena ligera completa (dominios variable y constante, VL y CL, respectivamente) y los primeros dos dominios (variable y constante, VH y CH1, respectivamente) de una de las cadenas pesadas. El fragmento Fc está formado por los otros dos dominios constantes de las dos cadenas pesadas (CH2 y CH3), con una cadena de carbohidratos unida a cada uno de los dominios CH2.



**Figura 2.1.** Estructura de anticuerpo. A) Vista general de la estructura de un anticuerpo. La cadena pesada en negro y las cadenas ligeras en gris. Las diferentes partes y dominios están señaladas. B) Ampliación de la región variable (Fv) del anticuerpo.

La amplia diversidad de especificidades de los anticuerpos está determinada por los dominios *N*-terminales de las cadenas ligera y pesada, conocidos en conjunto como fragmento Fv, que es variable en secuencia. La mayor variabilidad de este fragmento está concentrada en las regiones hipervariables, que consisten en seis lazos (tres de la cadena ligera y tres de la pesada) que conectan los hilos  $\beta$  de la parte superior de la región Fv. Los aminoácidos presentes en estos lazos son los responsables de la especificidad de los anticuerpos y conforman la mayor parte de la superficie de interacción con el ligando. Por esta razón, estos lazos son denominados como “regiones determinantes de la complementariedad” (CDRs, siglas del inglés “complementarity determining regions”) (Figura 2.1B). Los CDRs están definidos en el dominio VL entre los residuos de aminoácidos del 24-34 (CDR1), del 50-56 (CDR2) y del 89-97 (CDR3). En el dominio VH, el CDR1 está ubicado entre los residuos 31-35, el CDR2 entre el 50-65 y el CDR3 entre el 95-102 (en todos los casos según la numeración de Kabat). El CDR3 del dominio VH (CDR H3) es particularmente variable (Padlan, 1994). Los CDRs están flanqueados por segmentos de secuencia más conservados llamados marcos (FR, abreviaturas del inglés “framework”), que están altamente conservados entre anticuerpos diferentes de una misma familia.

A pesar de su variabilidad, se ha observado que los CDRs, en su mayoría, adoptan conformaciones espaciales discretas: las llamadas estructuras canónicas. Las mismas parecen ser determinadas por la naturaleza de un pequeño número de residuos de los FRs, que interactúan con los CDRs (Chothia y cols., 1989; Chothia y Lesk, 1987; Tramontano y cols., 1990). Estas estructuras aparecen en los CDRs de la mayoría de las regiones variables de diferentes anticuerpos analizados por cristalografía (Chothia y Lesk, 1987). Los FRs influyen en los CDRs de forma tal que pequeñas variaciones en su arquitectura afectan la topografía de la superficie del CDR.

Los fragmentos Fab de los anticuerpos son unas de las proteínas más estudiadas desde el punto de vista estructural, con cerca de mil estructuras depositadas en la base de datos de estructura de macromoléculas biológicas (PDB, siglas del inglés “Protein Data Bank”) (Berman y cols., 2003). De manera general, la estructura de los fragmentos Fab está bien conservada. Cada dominio del fragmento Fab (CH1, VH, CL y VL) está formado por dos hojas  $\beta$  ( $\beta$ -sandwich),

unidos por un puente disulfuro.

### 2.1.2 *Humanización de anticuerpos*

La generación de AcMs se basa mayormente en la tecnología de hibridoma (Köhler y Milstein, 1975). Esta tecnología consiste en la fusión de esplenocitos, usualmente de ratones previamente inmunizados con el antígeno deseado, con células de mieloma murino. El mayor inconveniente para el uso de estos anticuerpos en humanos es la inducción de anticuerpos humanos anti-ratón (Klee, 2000), conocida como respuesta HAMA (siglas del inglés “Human Anti-Mouse Antibodies”), lo que resulta en una rápida eliminación de los anticuerpos de ratón circulantes. Por esta razón, se hace necesario el uso de la ingeniería genética para la humanización de estos anticuerpos para su uso en pacientes.

Los procedimientos más comunes para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos murinos son la construcción de anticuerpos quiméricos (Morrison y cols., 1984) y el injerto de los CDRs (Riechmann y cols., 1988). Los anticuerpos obtenidos por estos métodos se diferencian en la proporción del anticuerpo murino original que es conservado en la versión humanizada. Un anticuerpo quimérico mantiene la región Fv de ratón, mientras que el resto proviene de una inmunoglobulina humana. En la otra variante, los CDRs murinos se injertan en FRs humanos.

Usando la amplia gama de especificidades que puede ser generada, los anticuerpos han sido usados para el tratamiento y diagnóstico de varias enfermedades. La agencia regulatoria para medicamentos y alimentos de los Estados Unidos (FDA, en inglés “Food and Drug Administration”) ha aprobado, hasta el momento, el uso de 26 anticuerpos para su uso en humanos.

### 2.1.3 *Los anticuerpos anti-idiotipo*

En 1974 Niels Jerne propuso la teoría de la red idiotípica (Jerne, 1974), que plantea que el sistema inmune es controlado internamente por una red de idiotipos y anti-idiotipos. Se le denomina idiotipo al conjunto de determinantes epitópicos asociados a la región variable de las inmunoglobulinas. Por otra parte, los anticuerpos portan sitios de combinación con los antígenos convencionales, que a su vez pueden ser reconocidos por otras moléculas de inmunoglobulina. Jerne denominó este sitio como paratopo.

Jerne postuló que los idiotipos podían constituir dianas regulatorias del sistema inmune y que existían parejas de regiones V complementarias que coexistían en el repertorio de cada individuo. En una versión posterior (Jerne, 1984), propuso que la línea germinal codificaba “pares” de autoanticuerpos y anticuerpos anti-idiotipo dirigidos contra los mismos, que de esta forma establecían series de anticuerpos interactuantes (Ab1, Ab2, Ab3, ...). El postulado fundamental de la teoría de la red idiotípica es que debido a la extraordinaria diversidad de las regiones variables en las inmunoglobulinas, estas expresan idiotopos que reaccionan cruzadamente con un gran número de epítomos, si no con todos. Por lo tanto, en la colección de idiotopos del individuo existe una configuración molecular similar a las encontradas en los determinantes de los antígenos involucrados en la inmunización natural o experimental. Los anticuerpos portadores de estos idiotopos miméticos, pueden interactuar con los anticuerpos antígeno-específicos. Un anticuerpo antígeno-específico, denominado Ab1, presenta múltiples idiotopos, por lo que la respuesta anti-idiotípica es muy heterogénea y se clasifica frecuentemente de la siguiente forma: Ab2 $\alpha$ , que reconocen idiotopos en el Ab1 que no están relacionados estructuralmente con el sitio de combinación con el antígeno; Ab2 $\beta$ , que reconocen el idiotopo que corresponde con el sitio de unión con el antígeno (paratopo) y mimetizan el epítomo reconocido por el Ab1; Ab2 $\gamma$ , que reconocen idiotopos asociados estructuralmente con el sitio de combinación del Ab1 con el antígeno, pero no son capaces de mimetizarlo.

De la teoría de la red idiotípica postulada por Jerne, se deriva la posibilidad de la presentación de epítomos antigénicos mediante la utilización de anticuerpos anti-idiotipo de la clase Ab2 $\beta$ . Esto se basa en la capacidad que tienen estos anticuerpos de mimetizar de alguna manera el antígeno original.

En un principio se pensó que los anticuerpos Ab2 $\beta$  podían verse como copias estereoquímicas de los antígenos nominales (Bona y cols, 1984), lo cual no era evidente para antígenos de origen no proteico. Años más tarde, estudios a partir de la determinación de las estructuras por difracción de rayos X de los complejos formados entre el fragmento Fv del anticuerpo D1.3 (Ab1) con la lisozima y con el fragmento Fv de su AcM anti-idiotipo E5.2 (Ab2 $\beta$ ), el cual induce una respuesta anti-lisozima cuando es usado como inmunógeno, demostraron que la

mímica del Ab2 $\beta$  es funcional (Braden y cols., 1996; Fields y cols., 1995). Esto significa que el Ab2, más que ser una réplica topológica, provee interacciones con el Ab1 similares a las del antígeno, lo cual daba una explicación más acertada acerca de la mímica de antígenos no proteicos.

Los anticuerpos Ab2 $\beta$  han sido utilizados para la obtención de respuesta contra antígenos tumor-asociados. Los antígenos tumor-asociados son frecuentemente componentes normales del organismo, que inducen una baja respuesta en pacientes con cáncer debido a los mecanismos de tolerancia inmunológica. Estos problemas se intensifican cuando los antígenos son de naturaleza no proteica, ya que por lo general son menos inmunogénicos y se caracterizan por provocar respuestas timo-independientes (Livingston, 1995).

## **2.2 Gangliósidos**

### *2.2.1 Estructura, localización y función*

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico en su estructura. Estas moléculas están compuestas por una cadena ceramida (*N*-acil-esfingosina) con características hidrofóbicas, y una parte polar compuesta por un oligosacárido lineal de hasta cuatro residuos neutros al que se encuentran unidos uno o más residuos de ácido siálico. Este último tiene como configuraciones más frecuentes el ácido *N*-acetil (NeuAc) neuramínico (NANA, siglas del inglés “*N*-acetyl neuraminic acid”) y el ácido *N*-glicolil (NeuGc) neuramínico (NGNA, siglas del inglés “*N*-glycolyl neuraminic acid”).

La síntesis de los gangliósidos ocurre en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. Las enzimas glicosiltransferasas y sialiltransferasas catalizan la transferencia de monómeros de azúcares a la molécula de ceramida (Maccioni, 2007).

La inserción de los gangliósidos en la monocapa lipídica exterior de la membrana de los vertebrados tiene una importante contribución a la carga negativa de la superficie celular. Estas moléculas mayormente se encuentran formando parte de estructuras supramoleculares ricas en colesterol con menor fluidez que el resto de la membrana, llamadas parches lipídicos (Simons y Ikonen, 1997).

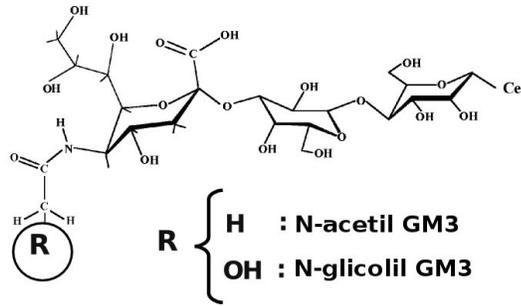
Los gangliósidos están involucrados en una gran diversidad de procesos biológicos. Pueden actuar en la unión o liberación de transmisores (Cumar y cols, 1978), la regulación del ciclo celular (Usuki y cols, 1988), la diferenciación celular (Spiegel y Merrill, 1996), la regulación de la embriogénesis (Yamashita y cols, 1999), la adhesión célula-célula (Hakomori Si, 2002), y la transducción de señales (Allende y Proia, 2002). Además, se les ha asignado un papel importante en los eventos de progresión tumoral y metastización (Birklé y cols., 2003).

Esta diversidad de funciones de los gangliósidos está dada por su expresión diferenciada de acuerdo al tipo de célula o a la etapa de diferenciación en que se encuentre (Nagai y Iwamori, 1984; Reglero y cols., 1982; de Mello Coelho y cols, 2004). Por ejemplo, las células de melanoma humano presentan una elevada expresión de gangliósidos GM3 y GD3, mientras que los melanocitos normales solo expresan el GM3 (Portoukalian y cols, 1987). En carcinomas renales se ha detectado el incremento de la expresión de los gangliósidos GD1a, GM1 y GM2 con respecto a las células normales del riñón (Hoon y cols, 1993). El gangliósido GD2 está en altos niveles en el suero de pacientes con neuroblastoma y retinoblastoma (Ladisch y cols., 1987; Portoukalian y cols, 1993). El GM3 también aumenta su expresión en pacientes con hepatoma y carcinoma de cabeza y cuello (Portoukalian y cols, 1989).

### 2.2.2 *Gangliósidos N-glicolilados*

La expresión de los gangliósidos *N*-glicolilados por algunas células tumorales humanas, es otro de los cambios en la expresión de estos glicoesfingolípidos durante la transformación neoplásica.

La única diferencia entre las variantes NANA y NGNA radica en que la primera presenta un hidrógeno unido al radical acilo que se encuentra sustituyendo al nitrógeno del ácido siálico, mientras que la segunda tiene un grupo hidroxilo en esta posición (Figura 2.2).



**Figura 2.2.** Dibujo esquemático de la estructura trisacáridica del gangliósido GM3, donde se observan las ligeras diferencias químicas entre las variantes *N*-acetil (NeuAc) y *N*-glicolil (NeuGc).

Los gangliósidos que contienen NANA están expresados constitutivamente en los tejidos humanos, mientras las variantes que contienen NGNA no se encuentran en los tejidos normales (Malykh y cols., 2001). Los pollos tampoco expresan gangliósidos *N*-glicolilados en sus tejidos (Ledeen y Yu, 1982; Miyoshi y cols., 1982).

La biosíntesis de NGNA no ocurre en los humanos debido a la inactivación de la enzima monofosforil citidina-*N*-acetil ácido siálico hidroxilasa, que es la encargada de catalizar la transformación de NANA a NGNA. Esta inactivación es causada por la eliminación de 92 pares de bases del segmento génico que codifica su porción N-terminal (Chou y cols., 1998; Irie y Suzuki, 1998). Sin embargo, se ha detectado la presencia de gangliósidos *N*-glicolilados en varios tumores humanos, como melanomas y retinoblastomas (Higashi y cols, 1988), en tumores de células germinales y en cáncer de colon ((Miyake y cols, 1990; Watarai y cols, 1995). En particular, se ha demostrado la expresión del gangliósido NeuGcGM3 en el carcinoma ductal infiltrante de mama (Marquina y cols., 1996; Oliva y cols., 2006), así como en células de melanoma (Carr y cols., 2000). Se ha postulado que la dieta es la principal fuente de los gangliósidos *N*-glicolilados (Tangvoranuntakul y cols., 2003), y su incorporación preferencial a las células tumorales se debe al metabolismo acelerado de estas (Bardor y cols., 2005).

### 2.2.3 Anticuerpos anti-gangliósidos

El papel de los gangliósidos en la modulación del sistema inmune, así como la variación en sus patrones de expresión durante el desarrollo de ciertos tumores, los han hecho atractivos para la terapia del cáncer. Estas moléculas han sido blanco de terapias pasivas con anticuerpos

(Modak y Cheung, 2007) y de vacunas (Fernández y cols., 2003).

Varios anticuerpos anti-gangliósidos han sido usados en la clínica. Por ejemplo, el AcM R24 (Kirkwood y cols., 2000) y el AcM KM871 (Scott y cols., 2005), que reconocen el GD3, han mostrado una respuesta clínica caracterizada por la presencia de un infiltrado de linfocitos CD4+ en el tumor y una respuesta citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos. Anticuerpos anti-GD2 usados en ensayos clínicos fase I/II en neuroblastoma también han mostrado buenos resultados, debido a su acción directa (Simon y cols., 2005) o conjugados a yodo 131 (Dauer y cols., 2007). Otro blanco de interés es el gangliósido NeuAcGM3. Ese es el caso del anticuerpo L612, que reconoce este gangliósido, y que induce una respuesta favorable en pacientes de melanoma metastásico (Azuma y cols., 2007).

#### 2.2.3.1 *Los anticuerpos monoclonales 14F7 y chP3*

El 14F7 es un AcM murino que reconoce el gangliósido NeuGcGM3 (Carr y cols., 2000), e induce muerte celular en líneas de células tumorales que expresan este ligando (Carr y cols., 2000). Este anticuerpo ha sido usado para el radio-inmunodiagnóstico en pacientes de cáncer de mama (Oliva y cols., 2006). El AcM 14F7 posee propiedades antitumorales tanto *in vitro* como *in vivo* contra células malignas que expresan el NeuGcGM3 (Carr y cols., 2000; Roque-Navarro y cols., 2008). El mecanismo de muerte celular que induce el 14F7 es independiente de complemento y dependiente de la presencia del gangliósido, y provoca la pérdida de la integridad de la membrana celular (Roque-Navarro y cols., 2008).

El AcM P3 es un anticuerpo murino de isotipo IgM generado en el CIM. Se obtuvo mediante la fusión de esplenocitos de un ratón BALB/c previamente inmunizado con liposomas que contenían gangliósido NeuGcGM3 y toxoide tetánico, con células del mieloma murino P3X63 (Vázquez y cols., 1995). Este anticuerpo reconoce varios tipos de gangliósidos que contienen el NGNA, pero no sus variantes acetiladas. Además, se ha detectado su unión a glicolípidos sulfatados (Moreno y cols., 1998; Vázquez y cols., 1995). Mediante el uso de pruebas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, se ha demostrado que el AcM P3 reconoce líneas celulares y tejidos de tumores de mama y melanoma (Alfonso y cols., 2002; Vázquez y cols., 1995).

Cuando este anticuerpo se usa para la inmunización de ratones BALB/c, genera una fuerte respuesta anti-idiotípica, aún en la ausencia de adyuvantes o proteínas transportadoras (Vázquez y cols., 1998). El dominio VH del AcM P3 es el principal responsable de su inmunogenicidad y de la unión a su ligando (López-Requena y cols., 2007a; López-Requena y cols., 2007b). La arginina 31 de la cadena pesada (Arg H31) es imprescindible para la unión tanto del gangliósido NeuGcGM3 como de sus AcMs anti-idiotipo, ya que la mutación de este residuo por serina abroga completamente la unión del P3 con ambos tipos de moléculas (López-Requena y cols., 2007a). Por otra parte, las mutaciones individuales de arginina 98 ó 100A por serina, no afectan la interacción con los anti-idiotipos pero sí con el gangliósido (López-Requena y cols., 2007a; López-Requena y cols., 2007b).

Los dominions VH y VL del P3 se combinaron con los correspondientes dominios constantes de IgG1 humana y se obtuvo el anticuerpo quimérico chP3 (acrónimo del inglés chimeric P3) (López-Requena y cols., 2003), el cual a pesar del cambio de IgM murina a IgG humana mantiene la reactividad con el gangliósido y los AcMs anti-idiotipo.

*2.2.4 Anticuerpos anti-idiotipo relacionados con el sistema de los gangliósidos*  
Varios anticuerpos anti-idiotipo, del tipo Ab2 $\beta$  contra Ab1 anti-gangliósidos, se han probado en la clínica para el tratamiento del cáncer (Bhattacharya-Chatterjee y cols, 2000). El más estudiado de estos es el AcM Bec2, el cual mimetiza al gangliósido NeuAcGD3 (Chapman y Houghton, 1991). Este Ab2 se probó en pacientes con tumores de origen neuroectodérmico, como melanoma y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) (Chapman, 2003). Sin embargo, un ensayo clínico fase III con Bec2/bacille Calmette-Guerin (BCG) en pacientes de CPCP falló al no prolongar la sobrevida, ni el tiempo libre de progresión, ni la calidad de vida de los pacientes. Solo se observó respuesta contra el NeuAcGD3 en un tercio de los pacientes, dentro de los cuales tampoco se encontró un aumento significativo de la sobrevida (Giaccone y cols, 2005).

Recientemente, de un paciente de neuroblastoma (Uttenreuther-Fischer, y cols, 2006) tratado con un anticuerpo anti-gangliósido GD2 (Ab1) (Mueller y cols, 1990), se derivó un Ab2 candidato a vacuna contra cáncer. Las células B del paciente se emplearon para aislar anticuerpos Ab2 a través de la construcción de bibliotecas de fagos. Se identificaron dos

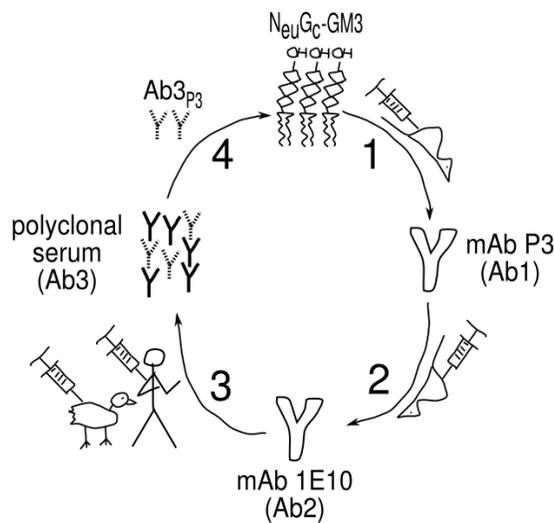
anticuerpos que indujeron Ab3 anti-gangliósidos en conejos vacunados. Uno de ellos (GK8) se propuso como una vacuna potencial para tumores que expresen GD2, debido a su capacidad de inhibir la unión del Ab1 al gangliósido y la unión de los Ab2 del suero del paciente al Ab1 (Uttenreuther-Fischer y cols., 2006).

#### 2.2.4.1 El AcM 1E10

El AcM anti-idiotipo, o Ab2, 1E10 se obtuvo mediante la inmunización de ratones BALB/c con el AcM P3 acoplado a KLH. El 1E10 reconoce al P3 y bloquea su unión al gangliósido NeuGcGM3 (Vázquez y cols., 1998).

La administración por vía intravenosa del AcM 1E10 en ratones C57BL/6, que habían sido inoculados con células de melanoma B16, provocó la reducción de las metástasis pulmonares en comparación con ratones tratados con anticuerpos irrelevantes. Un resultado similar se obtuvo con el crecimiento del tumor mamario F3II y sus metástasis pulmonares espontáneas, en ratones BALB/c. Los resultados obtenidos en estos experimentos sugieren la activación de más de un mecanismo de respuesta antitumoral contra células de tumor mamario y melanoma (Vázquez y cols., 2000).

Este anticuerpo ha sido utilizado en ensayos clínicos con pacientes de melanoma (Alfonso y cols., 2002), cáncer de mama (Díaz y cols., 2003; Guthmann y cols., 2006) y en cáncer de pulmón de células pequeñas (Neninger y cols., 2007) y no pequeñas (Alfonso y cols., 2007; Hernández y cols., 2008). En varios de estos pacientes se indujo la producción de anticuerpos Ab3 capaces de inhibir la unión del 1E10 al P3. También se detectaron Ab3 con una fuerte y específica respuesta contra gangliósidos *N*-glicolilados (Alfonso y cols., 2002; Díaz y cols., 2003; Guthmann y cols., 2006; Hernández y cols., 2008; Neninger y cols., 2007). En experimentos realizados en pollos que se inocularon con el AcM 1E10, también se detectaron anticuerpos Ab3 que reconocían a gangliósidos *N*-glicolilados (Hernández y cols., 2005). Por otro lado, este resultado no se observó cuando el 1E10 se usó para inmunizar modelos animales como ratones (Vázquez y cols., 1998) o monos (Hernández y cols., 2005), donde estos antígenos son propios. Un resumen de lo antes expuesto se presenta esquemáticamente en la Figura 2.3.



**Figura 2.3.** Esquema del ciclo completo de la respuesta anti-idiotípica del gangliósido NeuGcGM3. En el paso 1 el AcM P3 es obtenido por la inmunización de ratones Balb/c con el gangliósido NeuGcGM3. Paso 2, generación del AcM anti-idiotípico 1E10 por inmunización de ratones Balb/c con el AcM P3 como antígeno. Paso 3, el AcM 1E10 es usado como vacuna en ensayos clínicos en humanos o inmunizando pollos, siendo capaz de inducir respuesta de anticuerpos. Paso 4, los anticuerpos presentes en el suero de pacientes o pollos (llamados aquí Ab3<sub>P3</sub>) reconocen el gangliósido NeuGcGM3, o sea, el antígeno original.

## 2.3 Receptor del factor de crecimiento epidérmico

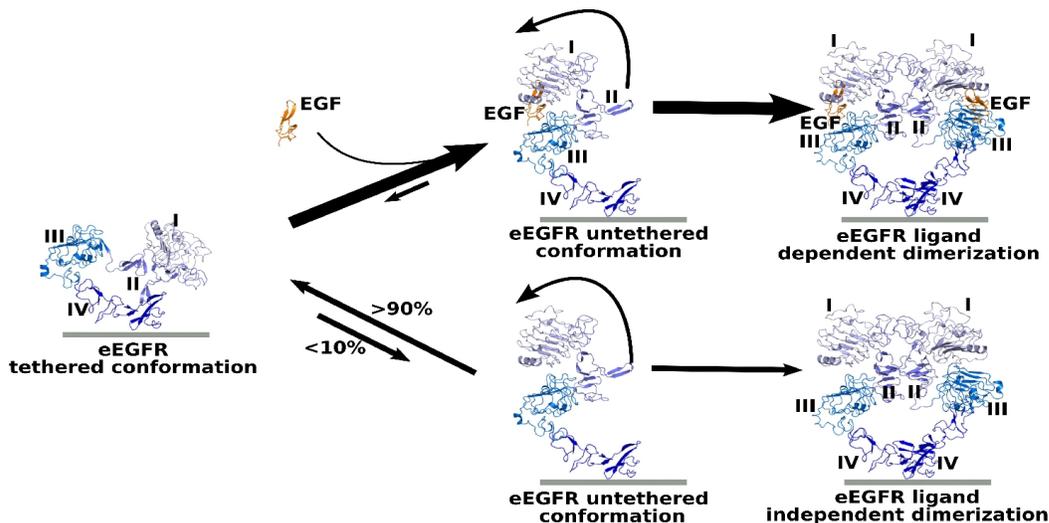
### 2.3.1 Estructura y función

El EGFR es una glicoproteína transmembranaria con un peso molecular de 170 kDa, cuya cadena polipeptídica consta de 1186 aminoácidos, y contiene 40 kDa de oligosacáridos enlazados a residuos de asparagina en 11 ó 12 sitios potenciales de glicosilación (Stroop y cols, 2000; Ullrich y cols, 1984). El EGFR pertenece a una familia de receptores con actividad tirosina cinasa que inician una cascada de señalización intracelular a partir de la unión de los factores de crecimiento. Estas cascadas de señales intervienen en diversas funciones biológicas como la proliferación, la migración, la diferenciación y la apoptosis (Holbro y Hynes, 2004).

El EGFR está compuesto por un dominio extracelular (eEGFR), constituido por cuatro subdominios (I, II, III y IV), un segmento transmembrana y un dominio tirosina cinasa intracelular. La principal fuente de activación de este receptor es la unión de uno de sus ligandos, como por ejemplo el EGF o el TGF $\alpha$ , a los subdominios I y III. Según los datos de diferentes estructuras cristalinas, se ha visto que con posterioridad a la unión de sus ligandos el receptor sufre un drástico cambio conformacional, mediante el cual expone el subdominio II, por el cual homodimeriza (Ferguson y cols., 2003; Garrett y cols., 2002; Ogiso y cols., 2002). De esta manera, los dos dominios tirosina cinasa intracelulares se acercan y fosforilan,

comenzando así la cascada de señalización. También se ha informado la capacidad de señalización y dimerización del EGFR independiente del ligando. Por ejemplo, Kang y colaboradores (Kang y *cols.*, 2007) demostraron que la incubación de células de epitelio intestinal de rata con un inhibidor de la proteína cinasa MEK, llamado U0126, aumentaba la fosforilación de este receptor en ausencia de ligando. Por otra parte, Kumagai y colaboradores (Kumagai y *cols.*, 2003) también observaron que el EGFR es capaz de heterodimerizar con el receptor p185c-neu (homólogo del ErbB 2 humano, miembro de la familia del EGFR) y mantener cierto grado de fosforilación en ausencia de ligando.

La conformación del dominio extracelular del EGFR se encuentra en un equilibrio entre dos geometrías, llamadas activa e inactiva (Dawson y *cols.*, 2007; Ferguson y *cols.*, 2003). En la conformación activa el subdominio II se encuentra expuesto y listo para la dimerización, mientras que en la conformación inactiva este subdominio está escondido debido a su interacción con el subdominio IV. En presencia del ligando el equilibrio se desplaza hacia la conformación activa, lo que provoca una fuerte señalización a través de este receptor (Figura 2.4). Por otro lado, en ausencia de ligando, se ha estimado que el 90% de estos receptores están en su conformación inactiva (Dawson y *cols.*, 2007; Ferguson y *cols.*, 2003).



**Figura 2.4.** Mecanismos de activación del EGFR, ligando dependiente y ligando independiente. La activación ligando dependiente (superior) produce una señal fuerte de transducción, mientras que la activación ligando independiente (debajo) mantiene a una señal débil o basal.

La porción intracelular del receptor está compuesta por una región yuxtamembrana, un dominio tirosina cinasa y el lazo regulatorio C-terminal. Estudios estructurales y de mutaciones puntuales apoyan la idea de que el dominio intracelular tirosina cinasa posee una conformación inactiva en ausencia de ligando (Ferguson y cols, 2008). La estructura cristalina del dominio tirosina cinasa activado del EGFR sugiere que la fosforilación de los residuos de tirosina Tyr992, Tyr1068, Tyr1086, Tyr1148 y Tyr1173 (Boerner y cols, 2003) se produce por la formación de un dímero asimétrico que lo activa (Lamers y cols, 2006).

### 2.3.2 *Cascada de señalización del EGFR*

El EGFR está involucrado en la transducción de varios tipos de señales. Una de ellas está dada por la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs, siglas del inglés, “mitogen-activated protein kinases”). Cuando el EGFR se activa, la proteína Grb2 interactúa con él y a su vez activa el factor de cambio Sos, que entonces activa la proteína Ras. La cascada continúa con la activación de Raf y MEK 1 y 2, la fosforilación de MAPK Erk 1/2 (del inglés, “extracelular signal-regulated kinase 1 and 2”), las cuales inducen la expresión de factores de transcripción como Elk-1 y *c-fos* (Prenzel y cols, 2001). La activación de las MAPK está relacionada con los procesos de división celular, y su actividad descontrolada puede estar relacionada con el crecimiento de algunos tumores.

El EGFR también puede transmitir señales al núcleo celular a través de la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3K, acrónimo del inglés, “phosphatidylinositol-3-kinase”). Esta última promueve señales anti-apoptóticas por la vía del factor de transcripción  $\kappa$ .

Otra vía de señalización tiene lugar mediante la activación de una tirosina cinasa citoplasmática llamada c-Src, la cual está involucrada en procesos mitogénicos (Prenzel y cols, 2001). Esta proteína participa en la activación del factor de transcripción y transductor de señales 3 (STAT3, siglas del inglés “signal transducer and activator of transcription 3”). Esta vía tiene particular importancia en la proliferación y supervivencia de células tumorales (Grandis y cols, 1998).

Estos son sólo algunos ejemplos de las cascadas de señales que pueden ser desencadenadas luego de la activación del EGFR. De manera general, la señalización intracelular a partir de la

activación de los receptores ErbB converge en el núcleo, donde los reguladores del ciclo celular y los factores de transcripción controlan la respuesta biológica a la activación de dichos receptores.

### 2.3.3 *Anticuerpos anti-EGFR*

Debido al papel del EGFR en la proliferación celular y la estrecha correlación entre su sobreexpresión y el desarrollo del cáncer, esta molécula constituye un blanco atractivo para el tratamiento de esta enfermedad. De hecho, el EGFR fue la primera proteína de la superficie celular en ser usada como blanco para la terapia del cáncer (Todaro y cols., 1976). Para inhibir la señalización a través de este receptor en las células tumorales, se han seguido dos aproximaciones principales. Una es el uso de pequeñas moléculas que inhiben su actividad tirosina cinasa (Zhang y cols., 2007) porque interfieren con la unión del ATP al receptor. La segunda aproximación consiste en el uso de anticuerpos que reconocen el eEGFR (Friedländer y cols., 2008), inhibiendo así su dimerización y posterior fosforilación.

Los anticuerpos Cetuximab (Graham y cols., 2004) y Panitumumab (Giusti y cols., 2007) son los dos AcMs que reconocen el eEGFR que han sido aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer en diferentes localizaciones. Un tercer anticuerpo, llamado Trastuzumab (Graziano, 1998), dirigido contra otro miembro de la familia del EGFR llamado HER2, también ha sido registrado para el tratamiento de algunos tumores. Otros anticuerpos que también tienen como blanco el EGFR, como el mab806 (Perera y cols., 2007), el IMC-11F8 (Lu y cols., 2005), el Matuzumab (Schmiedel y cols., 2008) y el Zalutumumab (Lammerts van Bueren y cols., 2008), todavía se encuentran en distintos estadios de ensayos clínicos. El Nimotuzumab (también conocido como h-R3) (Mateo y cols., 1997) es otro de los anticuerpos que reconocen el EGFR que ha avanzado en diferentes ensayos clínicos, mostrando un mejoramiento significativo en la supervivencia de los pacientes tratados (Crombet y cols., 2004; Ramos y cols., 2006).

Todos los anticuerpos anti-EGFR cuyas estructuras en complejo con este receptor han sido ya publicadas, Cetuximab, IMC-11F8, Matuzumab y Zalutumumab, se unen al dominio III del eEGFR (Schmitz y Ferguson, 2009). Los anticuerpos Cetuximab, IMC-11F8 y Zalutumumab tienen un mecanismo de inhibición similar, bloqueando la unión del EGF, e impidiendo el

cambio conformacional necesario para la dimerización del receptor. Por otra parte, el epítipo del Matuzumab también está en el dominio III del eEGFR pero no interfiere con la unión del EGF. No obstante, este anticuerpo es capaz de inhibir el cambio conformacional que conduce a la dimerización del receptor. El mismo efecto de bloqueo de la dimerización del EGFR puede lograrse por la unión a otros dominios del eEGFR, como el caso del AcM mab806, el cual se une al dominio II (Sivasubramanian y cols., 2006).

El uso de inhibidores del EGFR, ya sean anticuerpos o moléculas pequeñas, puede generar en algunos casos severas reacciones adversas (Lenz, 2006; Saif y Kim, 2007), usualmente expresadas como un fuerte rash cutáneo, que en algunos casos puede conducir a la interrupción del tratamiento. Entre todos los AcMs anti-EGFR que se encuentran en la clínica, Nimotuzumab se destaca por su mejor perfil de seguridad (Allan, 2005).

#### 2.3.3.1 El AcM Nimotuzumab

Nimotuzumab es un AcM humanizado que reconoce el eEGFR (Mateo y cols., 1997). Este AcM se obtuvo mediante la inserción de los CDRs del AcM murino ior/r3, el cual se generó por la inmunización de ratones con placenta humana enriquecida en EGFR (Fernandez y cols., 1992), en los FRs de una IgG1 humana. Debido a la inhibición de la señalización a través del EGFR, Nimotuzumab posee actividad anti-proliferativa, anti-angiogénica y pro-apoptótica, tanto *in vitro* como *in vivo* (Crombet-Ramos y cols., 2002).

Este anticuerpo ha mostrado buenos resultados en diferentes ensayos clínicos conducidos en cáncer de diferentes localizaciones, como cabeza y cuello y gliomas (Crombet y cols., 2004; Ramos y cols., 2006).

## 2.4 Cristalografía de proteínas

Un conocimiento detallado de las macromoléculas biológicas, incluyendo la organización y estructura tridimensional de los átomos, es esencial para la comprensión completa de los procesos biológicos en que participan. El nivel de detalle o de resolución en todos los tipos de microscopios está limitado por la longitud de onda. Consecuentemente, los científicos que usaron el microscopio de luz estuvieron restringidos a estudiar objetos no menores que la mitad de la longitud de onda de la luz visible (~0.25  $\mu\text{m}$ ). Por tanto, el descubrimiento de los

rayos X por Wilhem Honrad Röntgen en 1885 fue un punto de referencia en los pasos hacia la resolución de los átomos individuales, ya que su longitud de onda era del mismo orden de magnitud que las distancias atómicas ( $\sim 1 \text{ \AA}$  ó  $10^{-10}\text{m}$ ). En 1912, William Laurence Bragg describió que la difracción de los cristales, la cual había sido observada primero por Max von Laue en el mismo año, contenía información sobre la disposición de los átomos en el cristal. Este descubrimiento crucial también permitió a Bragg resolver la primera estructura tridimensional de un compuesto, el cloruro de sodio cristalino. Sin embargo, pasaron otros 50 años antes de que la primera estructura proteica pudiera ser determinada, cuando Kendrew y colaboradores publicaron la estructura de la mioglobina a baja resolución (Kendrew y cols, 1958). Actualmente, el número de estructuras de proteínas depositadas en el PDB (siglas del inglés, "Protein Data Bank") es aproximadamente 45 000 (1000 plegamientos basados en SCOP), de las más del 85% están determinadas por cristalografía de rayos X, indicando la importancia de este método para el campo de la biología estructural.

#### 2.4.1 *Cristalización de proteínas.*

La mayoría de los materiales estudiados usando cristalografía, incluyendo las proteínas, no aparecen naturalmente como cristales. La razón por la cual se requieren los cristales, es porque la dispersión de una sola molécula es muy débil para ser medida, mientras que los cristales constituidos por moléculas dispuestas con simetría translacional amplifican el efecto requerido. Desafortunadamente, el proceso de cómo aparecen y crecen los cristales es un problema complejo pobremente comprendido, que involucra la transición controlada de una solución a una fase sólida y está pobremente comprendida. Los cristales macromoleculares se materializan cuando una solución de proteínas como moléculas altamente solvatadas, cambian a un estado sobresaturado, donde no hay suficiente solvente para mantener una hidratación completa. Bajo estas condiciones el sistema no está en equilibrio, y las moléculas proteicas interactúan espontáneamente para formar precipitados amorfos o núcleos de cristales minimizando la energía libre.

La naturaleza compleja de las proteínas hace imposible predecir las condiciones que van a permitir el crecimiento de los cristales, lo cual constituye el paso limitante en la obtención de nuevas estructuras por cristalografía de proteínas. En la práctica, la formación de cristales

difractantes es un tedioso procedimiento de ensayo y error, que requiere de grandes cantidades de muestra de proteína pura y homogénea, determinación y suerte. Un número de técnicas han sido desarrolladas para llegar al estado sobresaturado y evitar la precipitación. Sin embargo, el método más popular es por difusión de vapores u otros volátiles para equilibrar un pequeño volumen de solución de proteína, sobre un gran volumen de solución precipitante. Estos experimentos pueden ser conducidos de varias formas, pero la gota colgante y sentada son los más ampliamente usados. La macromolécula y la solución precipitante son mezcladas en una razón 1: 1 en un volumen total de entre 1 y 10  $\mu\text{L}$ . La gota es entonces suspendida sobre un pozo con un volumen significativo de solución (0.25-2 mL) y consecuentemente la concentración del agente precipitante en la gota es aproximadamente igual a la concentración del reservorio después del equilibrio.

#### 2.4.2 *Difracción de rayos X*

Los cristales de proteínas consisten en un gran número de moléculas de proteínas empacadas regularmente, para formar una estructura tridimensional. El menor número posible donde estas entidades están repetidas solamente por translación, es representativo del cristal completo y es designado como celda unidad. La celda unidad está subdividida en regiones más pequeñas denominadas “unidad asimétrica”, la cual es la menor unidad que puede ser rotada y/o trasladada de acuerdo a la simetría cristalográfica, para representar la unidad celular entera. Cuando un cristal es iluminado por rayos X, estos interactúan con los electrones de los átomos y se dispersan en todas direcciones. Sin embargo, por un fenómeno de interferencia la estructura del cristal puede reforzar o extinguir los fotones dispersados, dando lugar a un patrón de difracción característico del cristal. En contraste, las intensidades de reflexión y las fases de los rayos X difractados contienen la información precisa de la organización atómica de las moléculas dentro de los cristales. En el experimento de difracción sobre la disposición espacial del cristal el grupo espacial puede ser extraído por una o varias imágenes de difracción medidas con un detector de rayos X. Consecuentemente, el patrón de difracción es predecible y es posible diseñar una estrategia de colección de datos, lo cual resulta importante, ya que se requiere de mucha información que permita la reconstrucción de la estructura de la proteína diana. En la práctica, se necesita cubrir entre 60 – 180 grados por pequeñas rotaciones

para recobrar suficientes patrones de difracción del cristal. Las reflexiones del patrón tridimensional son entonces indexados (denominados índice de Miller, h, k, l) y sus intensidades integradas y escaladas. El procesamiento de los datos se realiza con programas de cristalografía macromolecular tales como MOSFLM (Leslie, 1992), SCALA (Evans, 2006). Estos procedimientos tienen asociados estadígrafos tales como  $R_{sym}$ , el cual es auxiliador en el aseguramiento de la calidad y los límites de resolución final de los datos.  $R_{sym}$  es una comparación de las intensidades de las reflexiones relacionadas por la simetría  $I_{i(hkl)}$ , con respecto a la media de la intensidad de la reflexión  $I_{(hkl)}$ , pero su eficiencia para asegurar la calidad de los datos es limitada por su dependencia inherente a su multiplicidad.

$$R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{i(hkl)} - \bar{I}_{hkl}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_{i(hkl)}} \quad \text{Ecuación 1}$$

La disposición periódica de las celdas unitarias en el cristal, hace posible describir matemáticamente la relación entre la distribución de electrones en las celdas unitarias (espacio real) y el patrón de difracción (llamado espacio recíproco), usando una ecuación de Fourier.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{h,k,l}| e^{-2\pi i(hx + ky + kz) + i\alpha(hkl)} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $\rho(xyz)$  es la densidad de electrones tridimensional (una representación de los electrones responsables de la difracción de rayos X), indicando la organización atómica de la molécula,  $V$  es el volumen de la celda unidad,  $|F_{h,k,l}|$  indica la amplitud del factor de estructura, el cual es proporcional a la raíz cuadrada de la intensidad ( $I_{h,k,l} \propto |F_{h,k,l}|^2$ ) de cada reflexión (h,k,l), y  $\alpha(h,k,l)$  es la fase relativa al rayo responsable de cada reflexión (h,k,l). De esta ecuación es aparente que la posición e intensidad de cada reflexión no es suficiente para reconstruir la densidad electrónica del objeto observado.

### 2.4.3 El problema de fase

Desafortunadamente no hay detectores que puedan medir la fase relativa de los rayos X, y por

lo tanto es imposible deducir directamente la densidad electrónica de los datos colectados. Este dilema es conocido como “el problema de fase” en cristalografía de rayos-X, y existe un número de métodos para resolver este problema. Sólo en el caso de moléculas pequeñas, es posible la solución directa de este problema por las relaciones estadísticas sólo entre los datos de la alta resolución (Usón y Sheldrick, 1999). Un enfoque alternativo para extraer las fases experimentales es emplear los métodos de átomos pesados tales como el reemplazo de isómeros (Gibson, y cols, 1956) o la difracción anómala. En una perspectiva histórica, el reemplazo isomérico permitió determinar la primera estructura proteica en 1958 (Kendrew y cols, 1958), mientras que la difracción anómala fue pionera en 1981 (Hendrickson, 1991). En resumen, el tema común de estas técnicas es que utilizan unos pocos átomos electro-densos en posiciones únicas en la celda unitaria, que contribuye significativamente a las intensidades, pero que no afectan severamente la estructura de la macromolécula. Estos átomos pesados son suplementados en la preparación de proteínas, procedimiento de cristalización, o son introducidos usando métodos de ingeniería genética. Usando las diferencias de intensidades entre los juegos de datos con y sin átomos pesados, la posición (o distancia interatómica) del grupo de átomos pesados pueden ser derivados usando una función reducida de la ecuación 2, la “función de Patterson”:

$$P(u, v, x) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{h,k,l}|^2 \cos(2\pi [hu + kv + lw]) \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde las intensidades están elevadas al cuadrado y la dependencia de las fases eliminada. Con esta información se pueden calcular las fases relativas de los átomos pesados, y subsecuentemente se pueden estimar las fases relativas a la proteína proteínas.

#### 2.4.4 Reemplazo molecular.

Todas las técnicas de fase tienen en común la provisión de un grupo inicial de fases aproximadas. Con un incremento dramático de las estructuras disponibles en el PDB, el método más usado para resolver el problema de fase, es “el reemplazo molecular” (MR, siglas del inglés “Molecular Replacement”). Descrito por primera vez en 1962 (Rossmann y Blow, 1992), el procedimiento se basa en la extracción de las fases iniciales de las estructuras

homólogas. Consecuentemente, el MR no es una técnica usada para determinar nuevas estructuras, y se requiere, como mínimo, de un 25 a 40 % de identidad de secuencia. Al igual que la determinación de las fases por átomos pesados, el MR toma ventaja de la función de Patterson para minimizar la diferencia entre los datos de difracción obtenidos y los datos calculados en el modelo para encontrar la posición espacial en la unidad celular del modelo final. Tradicionalmente, la investigación se divide en dos problemas tridimensionales separados y consecutivos, tres ángulos de orientación primero y después tres traslaciones. Ese enfoque puede ser dilucidado por programas tales como, MolRep (Vagin y Teplyakov, 1997) en el paquete CCP4; así como el CNS (Brünger y cols., 1998). La calidad de las soluciones sugeridas puede ser evaluada por el coeficiente de correlación lineal, el factor R y por el análisis de choques moleculares debido al empaquetamiento cristalino. Los primeros dos parámetros estiman cuán bien correlacionan las densidades observadas y los factores estructurales con los calculados. Un alto coeficiente de correlación (correlación perfecta = 1 y no correlación = 0) y bajo factor R pueden indicar una posible solución MR.

#### 2.4.5 Refinamiento estructural y validación

Cuando han sido recuperadas las fases iniciales es posible computar los primeros mapas de densidad electrónica de la proteína desconocida usando la ecuación 1. Dependiendo del método de determinación estructural se puede establecer un modelo inicial de forma manual o por métodos automáticos<sup>54</sup>, o por modificación del modelo MR. Este modelo tendrá errores que deben ser refinados hasta obtener una estructura aceptable. Típicamente la estructura se mejora de forma recurrente por adecuación manual de los átomos en la densidad electrónica (refinamiento en espacio real) usando programas tales como O (Jones y cols., 1991) o Coot (Emsley y Cowtan, 2004), y el refinamiento en el espacio recíproco contra los datos cristalográficos con limitantes geométricas (distancias de enlace, ángulos de enlace y torsiones) usando otros programas tales como CNS (Brünger y cols., 1998) o el CCP4 (CCP4, 1994). Los mapas de densidad electrónica empleados para este propósito son  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  y el mapa de diferencia  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ , donde se visualizan las diferencias entre los datos observados y calculados (con las fases calculadas en cada caso). Entonces un mapa perfecto de diferencias de  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  solamente contendrá ruido y si están presentes otras contribuciones los elementos

en el modelo pueden ser adicionados (densidad positiva) o removidos (densidad negativa). Un tipo diferente de mapa de densidad para reducir el sesgo del modelo es el OMIT (Bhat, T. and Cohen, G., 1984) o el mapa OMIT compuesto. Estos mapas se calculan cuando una fracción del modelo es excluida o cuando todas las fracciones son removidas individualmente y el resultado final es empalmado.

El curso del proceso del modelaje y refinamiento es asegurado usando varios parámetros de los cuales los factores  $R_{\text{crist}}$  y  $R_{\text{free}}$  (Brünger, 1992) son los más importantes. Los factores  $R$  cristalográficos son definidos como:

$$R = \frac{\sum_{h,k,l} \left| |F_{\text{obs}}(h,k,l)| - |F_{\text{calc}}(h,k,l)| \right|}{\sum_{h,k,l} |F_{\text{obs}}(h,k,l)|} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde  $F_{\text{obs}}$  y  $F_{\text{calc}}$  son los factores experimentales y estructurales, respectivamente. El factor  $R$  estima el error entre la concordancia entre el modelo y los factores estructurales experimentales.

Consecuentemente, el índice debe converger a un valor bajo si el refinamiento ha resultado exitoso. El  $R_{\text{free}}$  es calculado de la misma forma pero de la fracción de las reflexiones (típicamente 5%) que nunca fueron usadas en el proceso de refinamiento, para la validación cruzada. La ventaja de este parámetro independiente es que el riesgo de sobre refinamiento con un decremento artificial en  $R$ , pero con poco o ningún cambio en  $R_{\text{free}}$  puede ser reducido significativamente. Como regla, el  $R$  y  $R_{\text{free}}$  están en un rango del 16% (alta resolución estructural de una proteína soluble) a 30% (modelo de baja resolución de proteína de membrana), 55% es considerado para indicar un modelo al azar. En adición a los valores  $R$ , se pueden utilizar programas tales como Procheck (Laskowski y cols., 1993) para asegurar la calidad final de la estructura. Por ejemplo, la geometría de los enlaces peptídicos puede ser desplegada como 2D "Ramachandran plot" para visualizar si los ángulos phi ( $\phi$ ) y psi ( $\psi$ ) de cada aminoácido están en las regiones "permitidas", y si no, debe ser implementado el desarrollo de otro modelo adicional para resolver la geometría.

## **2.5 Modelación computacional**

Como complemento a los estudios cristalográficos, se puede usar la modelación computacional para predecir las interacciones antígeno-anticuerpo. La dinámica molecular brinda la posibilidad de seguir la evolución de determinado complejo u otros tipos de sistemas por cierto período de tiempo. Por otro lado, cuando no existe la estructura tridimensional de determinado complejo, las simulaciones de acoplamiento pueden dar un modelo teórico de la formación de este.

### **2.5.1 Dinámica molecular**

De manera general, estos programas se basan en asignar una velocidad inicial a todos los átomos del sistema, el cual puede ser solamente la proteína en el vacío o embebida en una caja de agua, y dejando el sistema libre para que evolucione por cierto tiempo siguiendo un campo de fuerzas newtoniano. Cada cierto tiempo, a lo largo de la simulación, se graban (“fotografían”) las coordenadas de cada uno de los átomos del sistema, para finalmente generar un fichero de trayectoria con todas las coordenadas de todas las estructuras “fotografiadas”.

Estas técnicas han tenido un desarrollo muy acelerado debido al rápido crecimiento en las capacidades de cálculo y la ingeniería del software. Esto ha permitido acercar las simulaciones de biomoléculas a ambientes más realistas. Para que se tenga una idea, en el año 1997 el NAMD permitió una simulación de un complejo proteína-ADN de unos 36 000 átomos en el sistema por un tiempo de 100 ps (Kosztin y cols, 1997), mientras que en la actualidad se realizan simulaciones de proteínas que conforman canales y transportadores de membrana con varios cientos de miles de átomos conformando el sistema en una escala de tiempo cercana a 1  $\mu$ s (Khalili-Araghi y cols, 2009).

### **2.5.2 Predicción de complejos**

Varios son los programas que existen en la actualidad para la predicción de complejos proteína-ligando o proteína-proteína. Los protocolos de acoplamiento de estos programas se pueden describir como la combinación de algoritmos de búsqueda y funciones de evaluación. En la actualidad hay un número relativamente alto de ambos. Los algoritmos de búsqueda

deben permitir que la exploración de los grados de libertad del sistema proteína-ligando sea lo suficientemente exhaustiva para que incluya los modos reales de unión. Los puntos críticos para estos algoritmos de búsqueda son la velocidad y la capacidad de explorar el espacio conformacional relevante. Entre otras cosas, la función de evaluación debe representar adecuadamente la termodinámica del sistema proteína-ligando, para distinguir la solución correcta dentro del grupo total de posibles soluciones exploradas. Además, esta evaluación debe ser veloz para permitir su aplicación a un gran número de posibles soluciones (Sousa y cols, 2006).

El programa DOCKdyna (Moreno y León, 2002) es una versión del programa DOCK (Kuntz, 1992), que se usa para la predicción de complejos formados entre proteínas y ligandos pequeños. Este programa permite la flexibilidad del ligando y el barrido de miles de conformaciones del receptor para un solo ligando. Esto se logra mediante la representación automática del sitio de unión del receptor, y recalculando el enrejado del campo de fuerza a cada una de las conformaciones del receptor para su evaluación energética. El programa AutoDock (Garrett y cols., 1999), que es el de uso más extendido en este campo (Sousa y cols, 2006), también crea un enrejado de energía de interacción y permite cierta flexibilidad del ligando y de las cadenas laterales de algunos residuos que conforman el sitio de unión. Ambos programas, DOCKdyna y AutoDock, ordenan las soluciones siguiendo sus energías de interacción, y las mejores son entonces visualizadas para la selección del modelo final.

Por otra parte, para la predicción de los complejos proteína-proteína el RosettaDock 2.0 (Gray y cols., 2003) ha mostrado los mejores resultados en las dos últimas ediciones de la competencia CAPRI (Wang y cols., 2007) (siglas del inglés, “Critical Assessment of PRredicted Interactions”), para predicción de complejos formados entre dos proteínas. Este programa lleva a cabo simulaciones independientes en paralelo que luego se agrupan. Las soluciones se ordenan usando una función energética que es dominada por los términos de van der Waals, un modelo de implícito de solvatación y de los puentes de hidrógeno dependientes de la orientación.

De manera general, a pesar de los adelantos en el poder de cómputo que existen en la actualidad y la evolución de las funciones energéticas para la evaluación de las soluciones, los

programas, tanto de dinámica molecular como de predicción de complejos biológicos, todavía presentan problemas para asignar la mejor puntuación al modelo más exacto de una lista de posibles soluciones (falsos positivos). Este problema se debe, en gran medida, a que las funciones de evaluación tienen limitaciones y en muchos casos son funciones empíricas. Por esta razón, se hace imprescindible el uso de datos experimentales, como los de mutagénesis o estudios de unión, para obtener un modelo teórico fiable y lo más exacto posible.

## 3 Resumen de resultados

### 3.1 Anticuerpos relacionados con el gangliósido NeuGcGM3

#### 3.1.1 El AcM 14F7 (artículo I)

##### 3.1.1.1 La estructura del fragmento Fab del 14F7

La estructura cristalina del fragmento Fab del AcM 14F7 se determinó a 2.5 Å de resolución. La estructura se refinó hasta los factores cristalográficos  $R/R_{\text{free}}$  de 18.1%/23.8%. El Fab del 14F7 es estructuralmente muy parecido al plegamiento clásico de las inmunoglobulinas. Sin embargo, un rasgo distintivo de este anticuerpo lo constituye un CDR H3 muy largo, el cual comprende los residuos desde el 95 hasta el 102 (sigún la numeración de Kabat), incluyendo ocho inserciones en la posición 100, lo que hace un total de 16 aminoácidos. El largo CDR H3 sobresale en el medio del sitio de unión, dividiéndolo en dos zonas bien definidas: una formada por los CDRs de la cadena ligera y otra por los CDRs de la cadena pesada (Figura 2A, artículo I).

##### 3.1.1.2 Modelo del complejo 14F7-NeuGcGM3

Hasta el momento ha sido imposible cristalizar el complejo formado por el 14F7 con el NeuGcGM3. Por esta razón, se desarrolló un modelo teórico de la interacción de este anticuerpo con su ligando.

Para tener en cuenta la posible flexibilidad del sitio de unión, debido principalmente a un CDR H3 muy largo (16 aminoácidos), tomando como base la estructura cristalográfica se generaron 2000 estructuras usando dinámica molecular. Después de un proceso de agrupamiento, el conjunto de coordenadas se redujo a 754. Luego, las simulaciones de acoplamiento se realizaron usando el disacárido terminal del NeuGcGM3, el NeuGca3Gal $\beta$ , lo que dió como resultado el modelo teórico del complejo entre el AcM 14F7 y su ligando (Figura 2B, artículo I).

En el modelo, el motivo sacarídico está localizado en una cavidad hidrofílica, conformada solamente por residuos pertenecientes a la VH del anticuerpo, con una superficie enterrada de

206 Å<sup>2</sup>, la cual es comparable con otras estructuras similares depositadas en el PDB. La mayor parte de las interacciones anticuerpo-ligando están dadas por la formación de puentes de hidrógeno. Este hecho da una posible explicación a la capacidad de este anticuerpo de discriminar entre los gangliósidos NeuGcGM3 y NeuAcGM3, pues el grupo *N*-glicolilado del primero participa en la formación de tres posibles puentes de hidrógeno, dándole una estabilidad al complejo que no pudo ser alcanzada con la versión *N*-acetilada del gangliósido.

El hecho de que el sitio de unión del 14F7 esté solamente formado por la cadena pesada, está respaldado por experimentos realizados utilizando la tecnología de fagos (Rojas, y cols, 2004). En estos experimentos, la VH de este anticuerpo se expresó en conjunto con múltiples VLs, obteniéndose un reconocimiento comparable al del anticuerpo original para una gran variedad de estas últimas. La diversidad de estas VLs se muestra en amarillo en la Figura 2A del artículo I. Por otra parte, según el presente modelo, el Asp H52 es un residuo importante para la interacción con el grupo *N*-glicolil. Cuando este aminoácido se mutó por valina o isoleucina, el reconocimiento se perdió completamente (Figura 3, artículo I).

### 3.1.2 *Los AcMs P3 y 1E10 (artículo II)*

#### 3.1.2.1 *Estructura del fragmento Fab del anticuerpo chP3*

La estructura del fragmento Fab del anticuerpo chP3 se determinó a 1.8 Å de resolución y se refinó hasta valores cristalográficos de R/R<sub>free</sub> de 19.3%/22.6%. Fue imposible construir los tres residuos que componen la punta del CDR H3 (Glu 99, Gly 100 y Arg 100a) debido a discontinuidades en la densidad electrónica (Figura 1A y 1B, artículo II). Estos residuos están parcialmente expuestos al solvente.

#### 3.1.2.2 *Estudios de mutagénesis dirigida en la cadena pesada del P3*

El efecto de algunas mutaciones puntuales en la VH del P3 (Arg H31 →Ser, Arg H98 →Ser y Arg 100a →Ser) se probó previamente (López-Requena y cols., 2007a). Todas estas mutaciones abolen completamente la unión del anticuerpo al gangliósido NeuGcGM3, pero sólo la mutación Arg H31 →Ser afecta la unión del AcM P3 a su anti-idiotipo, el AcM 1E10.

En este trabajo se determinó la influencia de otras dos mutaciones en la cadena pesada del P3,

Arg H98 →Thr y Trp H100E →Tyr, sobre la unión al gangliósido y al 1E10 (Figura 2, artículo II). Sólo la mutación Arg H98 →Thr abrogó la unión del P3 al ligando, y ninguna de ellas afectó la unión con su anti-idiotipo.

### 3.1.2.3 Modelo del complejo chP3/NeuGcGM3

Hasta el momento, ha sido imposible obtener cristales del complejo formado entre el AcM chP3 y el motivo sacarídico del gangliósido NeuGcGM3. Tanto los experimentos de co-cristalización. Con el objetivo de de obtener una caracterización aproximada de esta interacción, se decidió realizar simulaciones computacionales de acoplamiento con el programa AutoDock 4.0 (Garrett y cols., 1999). Para simular la flexibilidad del lazo que conforma el CDR H3, se generaron cinco conformaciones alternativas (Figura 1C, artículo II).

Fueron varias las posibles conformaciones obtenidas como resultado de las simulaciones de acoplamiento. Para evaluar la calidad de las distintas soluciones se chequeó su ajuste respecto a cinco criterios experimentales: 1) El grupo *N*-glicolilo, en especial su distintivo grupo hidroxilo, debe estar en contacto cercano, debido a que este grupo define la especificidad del AcM P3 por los gangliósidos *N*-glicolilados (Vázquez y cols., 1995); 2) El grupo carboxilo del ácido siálico debe interactuar con la proteína, porque la derivatización de este grupo abole la interacción con el P3 (Moreno y cols., 1998); 3) la orientación del residuo de ácido siálico debe permitir la adición del monosacárido Galβ en una de las dos conformaciones observadas para el disacárido NeuGc2α-3 Galβ (Siebert y cols., 1992), sin colicionar con el anticuerpo; 4) además, la orientación del NeuGc2α-3 Galβ debe permitir el enlace, en la posición 4 de la galactosa, del residuo GalNAcβ presente en el gangliósido GM2, que también es reconocido por el AcM P3 (Vázquez y cols., 1995); y 5) la Arg H31, H98 debe participar en la interacción, porque la mutación de este residuo abole la unión del P3 al gangliósido NeuGcGM3 (López-Requena y cols., 2007a).

De las estructuras generadas del complejo, sólo una cumplió con las cinco condiciones al mismo tiempo (Figura 3A, artículo II). En este modelo del complejo chP3/NeuGcGM3, el grupo NeuGc del gangliósido está fuertemente involucrado en las interacciones con el anticuerpo. El grupo distintivo *N*-glicolilo (CH<sub>2</sub>OH) está ubicado en una cavidad hidrofílica

(Figura 3A, artículo II). Este grupo participa en la posible formación de tres puentes de hidrógeno con los residuos Ser H33 y Ser H95 (Figura 3B, artículo II), lo cual puede explicar la capacidad del P3 de distinguir entre los gangliósidos *N*-glicolilados y los *N*-acetilados.

El modelo también concuerda con los resultados obtenidos con los derivados químicos del gangliósido NeuGcGM3, donde el grupo carboxilo y la cola de glicerol del ácido siálico se modificaron (Moreno y cols., 1998). El grupo carboxilato del ácido siálico está formando un puente salino con la Arg H31. El grupo glicerol está parcialmente expuesto al solvente, pero también hace contactos de van der Waals con el Trp H52. Teniendo en cuenta la alta flexibilidad de la cadena lateral del residuo Arg H100b, esta también pudiera formar puentes de hidrógeno con el ligando.

#### 3.1.2.4 *Modelo de la interacción entre el AcM P3 y su anti-idiotipo, el AcM 1E10*

El estudio a nivel molecular de la interacción entre el AcM P3 y su anti-idiotipo, el AcM 1E10, puede contribuir a un mejor entendimiento de la capacidad de este último anticuerpo de mimetizar el gangliósido NeuGcGM3. Para esto, se construyó un modelo del complejo formado por el P3 y el 1E10. Para la construcción de este modelo fue necesaria la modelación del fragmento Fv del AcM 1E10, debido a que esta estructura no ha sido aún determinada. Para simular la flexibilidad potencial de su CDR H3, debido a la longitud, se generaron cinco conformaciones.

Las diferentes conformaciones del fragmento Fv del 1E10 se combinaron con las cinco de del Fv del P3, dando lugar a 25 geometrías iniciales para las simulaciones de acoplamiento con el programa RosettaDock (Gray y cols., 2003). Las mejores 20 soluciones de estas simulaciones se seleccionaron para análisis posteriores. Usando el programa RosettaInterface (Kortemme y Baker, 2002), se evaluó computacionalmente la significación de las mutaciones probadas experimentalmente. El modelo final seleccionado (Figura 3C, artículo II) fue el único consistente de todas las posibles soluciones. El área total enterrada después de la interacción es de 672 Å<sup>2</sup>, y la complementariedad de superficies es de 0.57.

La interacción entre los dos anticuerpos se caracteriza por contactos polares e hidrofóbicos (Figura 3D, artículo II), donde el 1E10 interactúa principalmente con el P3 a través de su

cadena pesada. Su CDR H3 es el que más contribuye a la interacción con ocho residuos (95 a 100b), luego el CDR H2 (Trp 50, Phe 52, Asp 54 y Lys 58) y el CDR H1 (Ser 31, Tyr 32, Glu 33), mientras que su cadena ligera sólo contribuye con cuatro aminoácidos (Asn 92, The 93, Lys 94 y Tyr 32).

El epítipo reconocido por el 1E10 está conformado por 16 aminoácidos de pertenecientes todos a la cadena pesada del AcM P3. Este hecho está respaldado por experimentos previos que muestran que un anticuerpo híbrido conformado por la cadena pesada del P3 y la cadena ligera del 1E10, mantiene la reactividad con este último anticuerpo (López-Requena y *cols.*, 2007b).

Un acercamiento a la interfase formada por ambos anticuerpos en el modelo teórico propuesto (Figura 3D, artículo II), muestra que la Arg H31 del P3 desempeña un papel fundamental en la unión, en el medio del área de contacto. Esto explica la pérdida completa de la reactividad del anticuerpo cuando este residuo es mutado, ya sea por serina (López-Requena y *cols.*, 2007a). El resto de los aminoácidos que se mutaron (todos del CDR H3 del P3) sin consecuencias para la unión, están en la periferia del sitio de interacción y sus cadenas laterales no están directamente involucradas en ningún contacto.

Las estructuras de los complejos idiotipo-anti-idiotipo depositadas en el PDB (códigos 1IAI (Ban y *cols.*, 1994), 1PG7 (Eigenbrot y *cols.*, 2003), 1C1C (Bentley y *cols.*, 1990) y 1DVF (Fields y *cols.*, 1995)) tienen un área media de interacción de 950 Å<sup>2</sup>. En contraste, el área media de interacción del modelo del complejo P3/1E10 es 672 Å<sup>2</sup>, aproximadamente un tercio más pequeña. Esta diferencia se debe a que en los otros complejos idiotipo-anti-idiotipo, las cadenas pesada y ligera de cada uno de los anticuerpos tienen una contribución similar a la unión. Por otra parte, la combinación de los datos experimentales con el modelo teórico del complejo muestra que el P3 y el 1E10 interactúan principalmente a través de sus cadenas pesadas, lo que conduce a una superficie de interacción menor. Este tipo de interacción idiotipo-anti-idiotipo mediada fundamentalmente por las cadenas pesadas, se informó recientemente para el complejo formado por el AcM anti-HIV1 2H5 y su anti-idiotipo el AcM Ab2/3H6 (Bryson y *cols.*, 2008). Resulta interesante que, la superficie media de interacción es de 615 Å<sup>2</sup>, muy similar a la calculada para nuestro modelo.

## 3.2 El AcM anti-EGFR Nimotuzumab

### 3.2.1 Estructura del fragmento Fab del Nimotuzumab

La estructura del fragmento Fab del Nimotuzumab se determinó a 2.5 Å de resolución y se refinó hasta los valores cristalográficos de  $R/R_{\text{free}}$  de 22.0%/28.4%. El mapa de densidad electrónica resultó muy bien definido para la región Fv, mientras que algunos lazos de la región constante fueron imposibles de determinar debido a discontinuidades en el mapa de densidad electrónica (Figura 1A, artículo III).

En el PDB se encuentra depositada una gran cantidad de estructuras de fragmentos Fab (cerca de mil), cuyo plegamiento está bien conservado. Sin embargo, el Nimotuzumab muestra dos rasgos distintivos sorprendentes. El primero es una hélice  $\alpha$  que comprende al CDR H1, la cual no pertenece a ninguna de las estructuras canónicas descritas para este lazo (Al-Lazikani y cols., 1997; Chothia y Les, 1987; Decanniere y cols., 2000). Esta hélice  $\alpha$  está presente sólo en dos anticuerpos cuyas estructuras están depositadas en el PDB (códigos: 1b2w y 2cmr). La segunda característica interesante y única se relaciona con la posición del Trp H103 de la cadena pesada (siguiendo la numeración de Kabat). La posición espacial de este residuo, en la interfase VH/VL está estrictamente conservada en todas las estructuras de anticuerpos depositadas en el PDB. En contraste, en el Nimotuzumab este residuo está desplazado tres aminoácidos hacia la región constante (Figura 1B, artículo III). La posición que era esperada para el Trp H103 está ocupada por un residuo de fenilalanina, el cual posee características hidrofóbicas similares a las del triptófano. Esto hace el lazo del CDR H3 más corto con respecto a los modelos teóricos que se habían construido para este anticuerpo (Mateo y cols., 1997).

Estas dos características estructurales distintivas del Nimotuzumab hubieran sido imposibles de predecir por cualquiera de los programas disponibles para ese fin, por ejemplo el WAM (Whitelegg y Rees, 2000) o el Modeller (Sali y Blundell, 1993). A pesar de los adelantos en los algoritmos para la predicción de la estructura de las proteínas, la cristalografía de rayos X es el método más exacto para su determinación.

### 3.2.2 *Ensayos de competencia*

El AcM Cetuximab fue el primer anticuerpo anti-EGFR en ser cristalizado en complejo con su ligando (Li y cols., 2005). Esta estructura mostró que el Cetuximab se une sólo al dominio III del eEGFR. Por lo tanto, en una primera aproximación a la definición del epítipo reconocido por el Nimotuzumab, se decidió determinar si este competía con el Cetuximab por su unión al eEGFR. Los resultados de los ensayos, tanto de ELISA como de citometría de flujo, demostraron la existencia de dicha competencia (Figura 2A, artículo III), pues la señal obtenida por la unión del Nimotuzumab al eEGFR disminuía cuando se iba aumentando la concentración del Cetuximab. Ya con anterioridad había sido descrita la capacidad del Nimotuzumab de bloquear la unión del EGF a su receptor (Mateo y cols., 1997). Esta observación se confirmó a través de experimentos de resonancia de plasmones de superficie (SPR, siglas del inglés “Surface Plasmon Resonance”, también conocido por Biacore) (Figura 2B, artículo III).

Todos estos experimentos evidencian que el Cetuximab se une al eEGFR más fuertemente que el Nimotuzumab. Esta observación concuerda perfectamente con las mediciones de afinidad realizadas por SPR, donde el Nimotuzumab mostró una constante de afinidad ( $K_D$ ) de  $2.1 \times 10^{-8}$  M, que es un orden de magnitud inferior a la informada para el Cetuximab ( $2.3 \times 10^{-9}$  M) (Li y cols., 2005).

Estos estudios de competencia, en combinación con los datos estructurales de los complejos formados por el Cetuximab (Li y cols., 2005) o el EGF (Ogiso y cols., 2002) con el eEGFR, sugieren que el Nimotuzumab se une al eEGFR por su dominio III.

### 3.2.3 *Modelo del complejo Nimotuzumab/eEGFR*

Para estudiar las interacciones entre el Nimotuzumab y el eEGFR, se procedió a la construcción de un modelo computacional del complejo formado entre estas dos proteínas. De acuerdo con el modelo obtenido, y en concordancia con los datos experimentales mostrados anteriormente, el epítipo reconocido por el Nimotuzumab en el eEGFR se superpone en gran medida con la superficie de unión del Cetuximab sobre el EGFR, como se muestra en la Figura 3A del artículo III. El modelo muestra una buena complementariedad tanto geométrica (0.78) como química entre el Nimotuzumab y el eEGFR, con un alto número de puentes de

hidrógeno y fuertes contactos hidrofóbicos (Figura 3B, artículo III). La superficie de interacción entre ambas proteínas es de  $1584 \text{ \AA}^2$ , un poco menor que el área de contacto en el complejo Cetuximab/EGFR ( $1770 \text{ \AA}^2$  (Li y cols., 2005)), lo cual correlaciona con la mayor afinidad del Cetuximab.

La mayor cantidad de contactos del Nimotuzumab con el eEGFR, ocurre a través de la cadena pesada del anticuerpo. El CDR H3 es el lazo que más contribuye a esta interacción, siguiéndole los CDRs L2, L1 y H1, por ese orden. Por otro lado, el epítipo reconocido por el Nimotuzumab en el dominio III del eEGFR está compuesto por 20 aminoácidos, que se ubican hacia la parte C-terminal de este dominio.

Un hecho importante a tener en cuenta para analizar el modelo propuesto, es que el Nimotuzumab prácticamente no reconoce el EGFR murino (Arteaga-Pérez y cols., 2004), a pesar de su alta identidad en secuencia (88%) con el receptor humano. En el modelo, cinco de los veinte residuos que conforman el epítipo del Nimotuzumab son diferentes entre el EGFR humano y el murino (Figura 3B, artículo III).

#### *3.2.4 Estudios de mutagénesis dirigida que sustentan el modelo del complejo Nimotuzumab/eEGFR*

Con base en los experimentos de competencia del Nimotuzumab con el Cetuximab y en el modelo propuesto del complejo Nimotuzumab/eEGFR, se sintetizaron dos variantes del gen que codifica para el EGFR murino (chEGFR-III y chEGFR-siteC). En estas variantes, se mutaron dos grupos diferentes de aminoácidos del dominio III por sus homólogos humanos (“humanización”). En la variante chEGFR-III se mutaron 16 de un total de 21 residuos del dominio III que son diferentes (posiciones mutadas: 353, 359, 366, 388, 418, 443, 460, 461, 467, 468, 471, 473, 474 y del 478-480). En la variante chEGFR-siteC, sólo se “humanizó” el epítipo del Cetuximab, para lo cual se mutaron siete aminoácidos, entre los que se encuentran los cinco que forman parte del epítipo del Nimotuzumab y que son diferentes entre el eEGFR humano y murino (posiciones mutadas: 418, 443, 467, 468, 471, 473 y 474).

La reactividad del Nimotuzumab con estas proteínas recombinantes se probó por citometría de flujo con células transfectadas. El anticuerpo reconoció las células que expresan la quimera chEGFR-III (Figura 4B, artículo III). El resultado confirma que el epítipo del Nimotuzumab

se localiza en el dominio III del eEGFR. De hecho, el Nimotuzumab también reconoció las células que expresaban la quimera chEGFR-siteC (Figura 4C, artículo III). Por lo tanto, al menos un subgrupo de los residuos que se mutaron en la quimera chEGFR-siteC está contenido en el epítipo del Nimotuzumab.

### *3.2.5 El Nimotuzumab bloquea la unión del EGF sin inhibir la conformación activa del EGFR*

El modelo Nimotuzumab/eEGFR también concuerda con resultados de los experimentos de bloqueo de la unión del EGF al EGFR por el Nimotuzumab (Figura 3C, artículo III). Esta inhibición no se debe a una superposición de los epítopos, sino a impedimentos estéricos que se producen entre los residuos de cada proteína, los cuales imposibilitan la unión simultánea del ligando y el anticuerpo al EGFR. Aún más significativo, es que a diferencia del Cetuximab (Figura 3D, artículo III), la unión del Nimotuzumab es compatible con la conformación activa del EGFR. Como se muestra en la Figura 3C del artículo III, la cadena ligera del Nimotuzumab se acerca al dominio I del EGFR, sin colisionar con este.



## 4 Discusión general

Este trabajo se enfoca en el estudio de la relación estructura función de cuatro anticuerpos anti-tumorales. Tres de ellos, 14F7 (Carr *y cols.*, 2000), chP3 (López-Requena *y cols.*, 2003) y 1E10 (Vázquez *y cols.*, 1998), están relacionados con el gangliósido NeuGcGM3, el cual es un antígeno tumor-específico (Oliva *y cols.*, 2006). El cuarto anticuerpo, Nimotuzumab, tiene como diana al receptor del factor de crecimiento epidérmico, que en la actualidad es uno de blancos tumorales más estudiados (Ciardiello y Tortora, 2008).

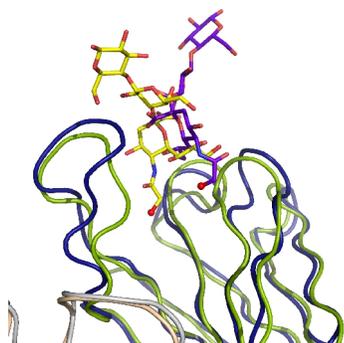
Para caracterizar las interacciones moleculares de estos anticuerpos con sus respectivos antígenos se utilizó una aproximación estructural constituida por la cristalografía de proteínas y el modelado computacional, complementada con estudios de mutagénesis dirigida, experimentos de unión y datos extraídos de la literatura. Esta combinación de técnicas permitió la obtención de modelos teóricos de los complejos formados por cada uno de los anticuerpos con sus ligandos.

Para el caso de los anticuerpos 14F7 y chP3, se determinaron las bases estructurales que les confieren la capacidad de discriminar entre las variantes *N*-glicosilada y *N*-acetelida del gangliósido GM3. Además, para los AcMs 1E10 y Nimotuzumab, a partir de sus modelos de unión a sus respectivos ligandos, se propusieron sendos mecanismos de acción a nivel molecular que permiten explicar un conjunto de resultados observados para estos anticuerpos en diferentes ensayos clínicos.

### 4.1 Comparación de los modelos 14F7/ NeuGcGM3 y chP3/NeuGcGM3

La interacción de los anticuerpos 14F7 y chP3 con el gangliósido, presenta varias características comunes. Los dos poseen un largo CDR H3 que sobresale del sitio de unión y lo divide en dos áreas separadas, donde sólo la cadena pesada de ambos anticuerpos participa en la interacción con el ligando. Además, los tres CDRs están involucrados en los contactos; el grupo carboxilo del NeuGc interactúa con el guanidinio de una arginina; el grupo hidroxilo que distingue al NeuGc está ubicado en una cavidad hidrofílica; y los anticuerpos interactúan principalmente con el residuo de ácido siálico del gangliósido. A pesar de estas semejanzas, la orientación espacial que adopta el gangliósido en su unión a cada uno de los anticuerpos es

muy diferente (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Comparación de los modelos de los complejos del chP3 y el 14F7 con el NeuGcGM3. Los fragmentos Fv en los complejos chP3/ NeuGcGM3 y 14F7/ NeuGcGM3 fueron superpuestos. En el modelo chP3/NeuGcGM3, el chP3 se muestra en verde y su ligando en barras amarillas, mientras que el 14F7 está en azul con su ligando en morado. Ver anexos para figura en colores.

La interacción del AcM 14F7 con el gangliósido NeuGcGM3 se caracteriza por la posibilidad de formación de un gran número de puentes de hidrógeno (18 en total). Por otra parte, el complejo chP3/NeuGcGM3, a pesar de que el área de interacción del ligando ( $244 \text{ \AA}^2$ ) es algo mayor que en el complejo 14F7/NeuGcGM3 ( $205 \text{ \AA}^2$ ), sólo tiene la posibilidad de formar seis puentes de hidrógeno. Esta característica observada en ambos modelos está en concordancia con experimentos en los que el 14F7 reconoce con mucha mayor intensidad células L1210, que expresan el gangliósido NeuGcGM3, que el AcM chP3 (Roque-Navarro y cols., 2008), así como con experimentos por ELISA reportados en el presente trabajo (artículo II).

**Tabla 4.1.** Caracterización de la interacción de diferentes proteínas con los gangliósidos NeuGcGM3 o NeuAcGM3

	trisacárido			monosacárido		
	Puentes de hidrógeno	Área de interacción del ligando ( $\text{\AA}^2$ )	Área de interacción de la proteína ( $\text{\AA}^2$ )	Puentes de hidrógeno	Área de interacción del ligando ( $\text{\AA}^2$ )	Área de interacción de la proteína ( $\text{\AA}^2$ )
14F7	18	205	217	14	170	194
chP3	6	244	269	6	181	221
1se3	1	139	153	5	129	149
2osx	18	308	377	2	99	118

En la base de datos PDB no se encontró ningún complejo proteína/NeuGcGM3, mientras que

sí se encontraron dos complejos proteína/NeuAcGM3, 2osx (Caines y cols., 2007) y 1se3 (Swaminathan y cols., 1995). Los modelos de los complejos 14F7/NeuGcGM3 y chP3/NeuGcGM3 tienen áreas de interacción comparables con los con los complejos depositados en la base de datos PDB (Tabla 4.1). Es de señalar que tanto para el complejo formado por 14F7 como por chP3 la interacción fundamental es con el ácido siálico que contiene al grupo *N*-glicolilo distintivo, mientras que en los otros dos complejos esta mas distribuida a lo largo de todo el trisacárido.

## **4.2 Mimetiza el AcM 1E10 a los gangliósidos N-glicolilados?**

Diferentes ensayos clínicos han demostrado que el AcM 1E10 es efectivo para el tratamiento de tumores en diferentes localizaciones (Alfonso y cols., 2002; Díaz y cols., 2003; Guthmann y cols., 2006; Hernández y cols., 2008; Neninger y cols., 2007). En los pacientes que han respondido a la terapia, el AcM 1E10 fue capaz de generar una respuesta de anticuerpos Ab<sub>3P3</sub> que reconocen gangliósidos N-glicolilados, que son únicamente expresados por las células tumorales (Malykh y cols., 2001).

La superposición de los modelos de los complejos P3/NeuGcGM3 y P3/1E10, muestra que el 1E10 cubre el sitio de unión del gangliósido (Figura 5, artículo II). De esta manera, el 1E10 bloquea la unión del gangliósido debido a impedimentos estéricos, principalmente con su cadena ligera. De acuerdo con estos modelos, el residuo de ácido siálico, con su grupo *N*-glicolilo distintivo, se inserta en una cavidad hidrofílica que permanece vacía después de la unión del 1E10. Además, no existen similitudes, ni estructurales ni químicas, entre el NeuGcGM3 y los determinantes de la unión del 1E10 (Figura 5, artículo II). Por lo tanto, nuestra hipótesis de partida es refutada, ya que el anticuerpo 1E10 no porta una “imagen interna” de los motivos sacarídicos del gangliósido. Como una explicación alternativa, no descrita anteriormente en la literatura, se sugiere que en la respuesta de anticuerpos generada por la inmunización con el anti-idiotipo 1E10, existe un subgrupo de anticuerpos, denominados en este trabajo como Ab<sub>3P3</sub>, que se unen al 1E10 de una manera similar a como lo hace el P3. O sea, que la topología del epitopo reconocido por los Ab<sub>3</sub> va a fijar una conformación espacial en un subgrupo estos anticuerpos, que se unen al 1E10 por una zona similar a la del P3. Como resultado, la topografía del sitio de unión de los anticuerpos Ab<sub>3P3</sub>

reproduce en cierta medida el sitio de unión del P3, lo que les confiere a estos anticuerpos la capacidad de reconocer a los gangliósidos *N*-glicosilados.

### **4.3 Propuesta de un novedoso mecanismo de inhibición del EGFR**

El mecanismo propuesto mediante el cual el anticuerpo Nimotuzumab inhibe la señalización por el EGFR, no ha sido descrito con anterioridad para ningún otro AcM anti-EGFR, y conduce hacia una posible explicación de observaciones hechas en la clínicas. Todos los otros AcMs anti-EGFR con mecanismos de inhibición conocidos, como Cetuximab, IMC-11F8, Matuzumab y el mAb806, previenen, de alguna manera, que el eEGFR adopte su conformación activa, donde su dominio II queda libre para la dimerización (Schmitz, KR. and Ferguson, KM., 2009). Nuestro modelo computacional, apoyado por datos experimentales, refuta nuestra hipótesis inicial, e indica que el anticuerpo Nimotuzumab se une al EGFR de una manera diferente, bloqueando la unión del EGF sin impedir que el receptor adopte la conformación activa en ausencia del ligando (Figura 3C, artículo III). A pesar de que Nimotuzumab no ofrece ningún obstáculo estérico al EGFR para que adopte su conformación activa, sí evita el desplazamiento del equilibrio entre ambas conformaciones hacia la forma activa del receptor inducida por la unión del EGF, y por lo tanto disminuye drásticamente la señal de proliferación celular.

Se ha estimado que ente el 10% y el 15% del total de EGFR presente en la superficie celular están en la conformación inactiva (Burgess y cols., 2003). También se ha descrito la posibilidad de la activación del EGFR en ausencia del ligando (Kang y cols., 2007; Kumagai y cols., 2003). De acuerdo con el modelo propuesto, el AcM Nimotuzumab no interferiría con este nivel basal de señalización por el EGFR independiente de ligando, la cual puede requerirse para la supervivencia de las células epiteliales normales (Forsberg y cols., 2008). En contraste, este nivel basal de señal no sería suficiente para la proliferación de las células tumorales.

Una representación esquemática del mecanismo de inhibición propuesto para el Nimotuzumab comparado con el de Cetuximab, se muestra en la Figura 5, artículo III. El mecanismo de inhibición de Cetuximab, cuya unión abroga completamente la dimerización y subsecuente

fosforilación del EGFR, puede ser extrapolado a los otros AcMs anti-EGFR mencionados anteriormente, por su capacidad de inhibir el cambio conformacional del EGFR.

#### 4.3.1 *Implicaciones del modelo propuesto*

Usando el modelo propuesto del complejo Nimotuzumab/eEGFR, es posible postular una explicación para algunas observaciones clínicas. Los diferentes ensayos clínicos, que ya incluyen más de 4000 pacientes, han demostrado la baja incidencia de efectos secundarios adversos debidos al tratamiento con Nimotuzumab. En contraste, otros anticuerpos o pequeñas moléculas inhibitoras del EGFR tienen una alta incidencia de reacciones indeseables, comúnmente erupciones cutáneas, que en algunos casos pueden conducir a la interrupción del tratamiento (Lenz, 2006; Saif y Kim, 2007). Estas manifestaciones cutáneas podrían ser la consecuencia de la eliminación de la señalización basal (independiente de ligando) a través del EGFR sobre el epitelio normal. Por lo tanto, el hecho de que Nimotuzumab no impida esta señalización basal, podría reducir la aparición de estas erupciones.

En el Centro de Inmunología Molecular también se ha desarrollado una vacuna basada en la molécula EGF acoplada a la proteína p64 de *Neisseria Meningitidis* (González y cols., 1998), que ha mostrado buenos resultados en diferentes ensayos clínicos en tumores de células no pequeñas de pulmón (González y cols., 2007). Con esta vacuna se genera una respuesta de anticuerpos que al unirse a la hormona EGF inhibe la señalización dependiente de esta del EGFR, mientras que la señalización basal se mantiene intacta. Esto explica, al igual que para el Nimotuzumab, la ausencia de efectos adversos, principalmente erupción cutánea, en los pacientes incluidos en los diferentes ensayos clínicos de la vacuna (González y cols., 2007).

Además, el modelo sugiere que la generación de un anticuerpo con mayor afinidad que el Nimotuzumab, pero con el mismo mecanismo de acción, pudiera ser más efectivo para la terapia del cáncer.



## 5 Conclusiones

1. La estructura cristalográfica del fragmento Fab del anticuerpo Nimotuzumab evidencia que, a pesar de la gran conservación en el plegamiento de estos fragmentos, pueden existir variaciones conformacionales, no predecibles a partir del conocimiento actual, que afecten la topología del sitio de unión.
2. En la unión de los anticuerpos P3 y 14F7 al NeuGc GM3 participa solo la región VH. Según nuestros modelos computacionales, la capacidad de estos dos anticuerpos de discriminar entre las variantes *N*-acetilada y *N*-glicolilada del gangliósido GM3, está dada por la inserción del grupo hidroxilo distintivo del NeuGc en una cavidad hidrofílica.
3. No existen rasgos estructurales comunes entre el AcM 1E10 y el gangliósido NeuGcGM3 que expliquen la capacidad de este anticuerpo de inducir respuesta anti-gangliósidos *N*-glicolilados en pollos y humanos.
4. El anticuerpo Nimotuzumab se une al eEGFR por el dominio III. Nuestro modelo computacional predice además, que el Nimotuzumab bloquea la unión del EGF sin impedir el cambio conformacional necesario para la dimerización de este receptor.

## 6 Recomendaciones

1. Obtener la estructura de los siguientes complejos: P3 y 14F7 con los residuos sacarídicos del gangliósido NeuGcGM3; P3/1E10; y Nimotuzumab/dominio III del eEGFR.
2. Realizar mutaciones a partir del modelo 14F7/NeuGcGM3 que permitan obtener anticuerpos que reconozcan el NeuAcGM3.
3. Aislar y secuenciar los anticuerpos anti-gangliósidos *N*-glicosilados inducidos por el AcM 1E10 en pacientes y/o pollos, para determinar su similitud con el AcM P3.

## 7 Referencias Bibliográficas

- Al-Lazikani, B., Lesk, AM. y Chothia, C. 1997. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* 273, 927-948.
- Alfonso, M., Díaz, A., Hernández, AM. y cols. 2002. An anti-idiotypic vaccine elicits a specific response to *N*-glycolyl sialic acid residues of glycoconjugates in melanoma patients. *J Immunol* 168, 2523-2529.
- Alfonso, S., Diaz, RM., de la Torre, A. y cols. 2007. 1E10 anti-idiotypic vaccine in non-small cell lung cancer: experience in stage IIIb/IV patients. *Cancer Biol Ther* 6, 1847-1852.
- Allan, DGP. 2005. Nimotuzumab: evidence of clinical benefit without rash. *Oncologist* 10, 760-761.
- Allende, ML. y Proia, RL. 2002. Lubricating cell signaling pathways with gangliosides. *Curr Opin Struct Biol* 12, 587-592.
- Arteaga-Pérez, ME., Maceira, M., Casacó, A. y cols. 2004. Multiple dose toxicity study of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody h-R3 intravenously administered to cercopithecus aethiops sabaeus monkeys. *Hum Exp Toxicol* 23, 219-227.
- Azuma, Y., Ishikawa, Y., Kawai, S. y cols. 2007. Recombinant human hexamer-dominant igm monoclonal antibody to ganglioside GM3 for treatment of melanoma. *Clin Cancer Res* 13, 2745-2750.
- Ban, N., Escobar, C., Garcia, R. y cols. 1994. Crystal structure of an idiotype-anti-idiotypic fab complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1604-1608.
- Bardor, M., Nguyen, DH., Diaz, S. y cols. 2005. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid *N*-glycolylneuraminic acid into human cells. *J Biol Chem* 280, 4228-4237.
- Bentley, GA., Boulot, G., Riottot, MM. y cols. 1990. Three-dimensional structure of an idiotope-anti-idiotope complex. *Nature* 348, 254-257.
- Berman, H., Henrick, K. y Nakamura, H. 2003. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat Struct Biol* 10, 980.
- Bhat, T. and Cohen, G. 1984. Omitmap: an electron density map suitable for the examination of errors in a macromolecular model *J. Appl. Cryst* 17, 244-248.
- Bhattacharya-Chatterjee, M., Chatterjee, SK. y Foon, KA. 2000. Anti-idiotypic vaccine against cancer *Immunol Lett* 74, 51-58.
- Birklé, S., Zeng, G., Gao, L. y cols. 2003. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie* 85, 455-463.
- Boerner, JL., Danielsen, A. and Maihle, NJ. 2003. Ligand-independent oncogenic signaling by the epidermal growth factor receptor: v-ErbB as a paradigm *Exp Cell Res* 284, 111-121.
- Bona, CA., Victor-Kobrin, C., Manheimer, AJ., Bellon, B. and Rubinstein, LJ. 1984. Regulatory arms of the immune network *Immunol Rev* 79, 25-44.
- Braden, BC., Fields, BA., Ysern, X. y cols. 1996. Crystal structure of an Fv-Fv idiotope-

- anti-idiotope complex at 1.9 a resolution. *J Mol Biol* 264, 137-151.
- Brünger, A. 1992. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures *Nature* 355, 472-475.
- Brünger, AT., Adams, PD., Clore, GM. y cols. 1998. Crystallography & nmr system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54, 905-921.
- Bryson, S., Julien, J., Isenman, DE. y cols. 2008. Crystal structure of the complex between the f(ab)' fragment of the cross-neutralizing anti-hiv-1 antibody 2f5 and the f(ab) fragment of its anti-idiotypic antibody 3h6. *J Mol Biol* 382, 910-919.
- Burgess, AW., Cho, H., Eigenbrot, C. y cols. 2003. An open-and-shut case? recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 12, 541-552.
- Caines, MEC., Vaughan, MD., Tarling, CA. y cols. 2007. Structural and mechanistic analyses of endo-glycoceramidase II, a membrane-associated family 5 glycosidase in the apo and GM3 ganglioside-bound forms. *J Biol Chem* 282, 14300-14308.
- Carr, A., Mullet, A., Mazorra, Z. y cols. 2000. A mouse IgG1 monoclonal antibody specific for *N*-glycolyl GM3 ganglioside recognized breast and melanoma tumors. *Hybridoma* 19, 241-247.
- CCP4 1994. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50, 760-763.
- Chapman, P. 2003. Vaccinating against GD3 ganglioside using bec2 anti-idiotypic monoclonal antibody. *Curr Opin Investig Drugs* 4, 710-715.
- Chapman, PB. and Houghton,AN. 1991. Induction of IgG antibodies against GD3 ganglioside in rabbits by an anti-idiotypic monoclonal antibody. *J Clin Invest* 88, 186-192.
- Chothia, C. and Lesk,AM. 1987. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 196, 901-917.
- Chothia, C., Lesk, AM., Tramontano, A. y cols. 1989. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342, 877-883.
- Chou, HH., Takematsu, H., Diaz, S. y cols. 1998. A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the homo-pan divergence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11751-11756.
- Ciardiello, F. and Tortora,G. 2008. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 358, 1160-1174.
- Crombet-Ramos, T., Rak, J., Pérez, R. y cols. 2002. Antiproliferative, antiangiogenic and proapoptotic activity of h-R3: a humanized anti-EGFR antibody. *Int J Cancer* 101, 567-575.
- Crombet, T., Osorio, M., Cruz, T. y cols. 2004. 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* 22, 1646-1654.
- Cumar, FA., Maggio, B. and Caputto,R. 1978. Dopamine release from nerve endings induced by polysialogangliosides. *Biochem Biophys Res Commun* 84, 65-69.

- Dauer, LT., St Germain, J., Williamson, MJ. y cols. 2007. Whole-body clearance kinetics and external dosimetry of <sup>131</sup>I-3f8 monoclonal antibody for radioimmunotherapy of neuroblastoma. *Health Phys* 92, 33-39.
- Dawson, JP., Bu, Z. y Lemmon, MA. 2007. Ligand-induced structural transitions in ErbB receptor extracellular domains. *Structure* 15, 942-954.
- de Mello Coelho, V., Nguyen, D., Giri, B., Bunbury, A., Schaffer, E. and Taub, DD. 2004. Quantitative differences in lipid raft components between murine CD4+ and CD8+ t cells. *BMC Immunol* 5, 2.
- Decanniere, K., Muyldermans, S. y Wyns, L. 2000. Canonical antigen-binding loop structures in immunoglobulins: more structures, more canonical classes? *J Mol Biol* 300, 83-91.
- Díaz, A., Alfonso, M., Alonso, R. y cols. 2003. Immune responses in breast cancer patients immunized with an anti-idiotypic antibody mimicking neugc-containing gangliosides. *Clin Immunol* 107, 80-89.
- Eigenbrot, C., Meng, YG., Krishnamurthy, R. y cols. 2003. Structural insight into how an anti-idiotypic antibody against d3h44 (anti-tissue factor antibody) restores normal coagulation. *J Mol Biol* 331, 433-446.
- Emsley, P. y Cowtan, K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.
- Evans, P. 2006. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62(Pt 1), 72-82.
- Ferguson, K. 2008. Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annu Rev Biophys* 37, 353-373.
- Ferguson, KM., Berger, MB., Mendrola, JM. y cols. 2003. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 11, 507-517.
- Fernandez, A., Spitzer, E., Perez, R. y cols. 1992. A new monoclonal antibody for detection of EGF-receptors in western blots and paraffin-embedded tissue sections. *J Cell Biochem* 49, 157-165.
- Fernández, LE., Alonso, DF., Gomez, DE. y cols. 2003. Ganglioside-based vaccines and anti-idiotypic antibodies for active immunotherapy against cancer. *Expert Rev Vaccines* 2, 817-823.
- Fields, BA., Goldbaum, FA., Ysern, X. y cols. 1995. Molecular basis of antigen mimicry by an anti-idiotypic. *Nature* 374, 739-742.
- Forsberg, S., Ostman, A., Rollman, O. 2008. Regeneration of human epidermis on acellular dermis is impeded by small-molecule inhibitors of egf receptor tyrosine kinase. *Arch Dermatol Res* 300, 505-516.
- Friedländer, E., Barok, M., Szöllosi, J. y cols. 2008. ErbB-directed immunotherapy: antibodies in current practice and promising new agents. *Immunol Lett* 116, 126-140.
- Garrett M, M., David S, G., Robert S, H. y cols. 1999. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comp Chem* 19(14), 1639-1662.
- Garrett, TPJ., McKern, NM., Lou, M. y cols. 2002. Crystal structure of a truncated

- epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 110, 763-773.
- Giaccone, G., Debruyne, C., Felip, E., y cols. 2005. Phase III study of adjuvant vaccination with bac2/bacille calmette-guerin in responding patients with limited-disease small-cell lung cancer (european organisation for research and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 23, 6854-6864.
- Gibson, JF., Ingram, DJ. y Perutz, MF. 1956. Orientation of the four haem groups in haemoglobin. *Nature* 178, 906-908.
- Giusti, RM., Shastri, KA., Cohen, MH. y cols. 2007. FDA drug approval summary: panitumumab (vectibix). *Oncologist* 12, 577-583.
- González, G., Crombet, T., Catalá, M. y cols. 1998. A novel cancer vaccine composed of human-recombinant epidermal growth factor linked to a carrier protein: report of a pilot clinical trial. *Ann Oncol* 9, 431-435.
- González, G., Crombet, T., Neninger, E. y cols. 2007. Therapeutic vaccination with epidermal growth factor (EGF) in advanced lung cancer: analysis of pooled data from three clinical trials. *Hum Vaccin* 3, 8-13.
- Graham, J., Muhsin, M. y Kirkpatrick, P. 2004. Cetuximab. *Nat Rev Drug Discov* 3, 549-550.
- Gray, JJ., Moughon, S., Wang, C. y cols. 2003. Protein-protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations. *J Mol Biol* 331, 281-299.
- Graziano, C. 1998. Her-2 breast assay, linked to herceptin, wins FDA's okay. *CAP Today* 12, 1, 14-6.
- Guthmann, MD., Castro, MA., Cinat, G. y cols. 2006. Cellular and humoral immune response to *N*-glycolyl-GM3 elicited by prolonged immunotherapy with an anti-idiotypic vaccine in high-risk and metastatic breast cancer patients. *J Immunother* 29, 215-223.
- Hakomori Si, S. 2002. Inaugural article: the glycosynapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 225-232.
- Hendrickson, W. 1991. Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science* 254, 51-58.
- Hernández, AM., Rodríguez, M., López-Requena, A. y cols. 2005. Generation of anti-Neu-glycolyl-ganglioside antibodies by immunization with an anti-idiotypic monoclonal antibody: a self versus non-self-matter. *Immunobiology* 210, 11-21.
- Hernández, AM., Toledo, D., Martínez, D. y cols. 2008. Characterization of the antibody response against neugcgm3 ganglioside elicited in non-small cell lung cancer patients immunized with an anti-idiotypic antibody. *J Immunol* 181, 6625-6634.
- Higashi, H., Sasabe, T., Fukui, Y., Maru, M. and Kato, S. 1988. Detection of gangliosides as *n*-glycolylneuraminic acid-specific tumor-associated antigen in human retinoblastoma cells. *Jpn J Cancer Res* 79, 952-956.
- Holbro, T. and Hynes, NE. 2004. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 195-217.
- Hoon, DS., Okun, E., Neuwirth, H., Morton, DL. and Irie, RF. 1993. Aberrant expression of gangliosides in human renal cell carcinomas. *J Urol* 150, 2013-2018.

- Irie, A. and Suzuki,A. 1998. [the molecular basis for the absence of n-glycolylneuraminic acid in humans] *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 43, 2404-2409.
- Jerne, N. 1974. Towards a network theory of the immune system *Ann Immunol (Paris)* 125C, 373-389.
- Jerne, N. 1984. Idiotypic networks and other preconceived ideas *Immunol Rev* 79, 5-24.
- Jones, TA., Zou, JY., Cowan, SW. y cols. 1991. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A* 47 ( Pt 2), 110-119.
- Kang, E., Oh, M., Lee, S. y cols. 2007. EGFR phosphorylation-dependent formation of cell-cell contacts by ras/erks cascade inhibition. *Biochim Biophys Acta* 1773, 833-843.
- Kendrew, JC., Bodo, G., Dintzis, HM. y cols. 1958. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis *Nature* 181, 662-666.
- Khalili-Araghi, F., Gumbart, J., Wen, P., y cols. 2009. Molecular dynamics simulations of membrane channels and transporters. *Current Opinion in Structural Biology* 19, 1-10.
- Kirkwood, JM., Mascari, RA., Edington, HD. y cols. 2000. Analysis of therapeutic and immunologic effects of r(24) anti-GD3 monoclonal antibody in 37 patients with metastatic melanoma. *Cancer* 88, 2693-2702.
- Klee, GG. 2000. Human anti-mouse antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 124, 921-923.
- Köhler, G. y Milstein,C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Kortemme, T. y Baker,D. 2002. A simple physical model for binding energy hot spots in protein-protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14116-14121.
- Kosztin, D., Bishop, TC. and Schulten,K. 1997. Binding of the estrogen receptor to dna. the role of waters *Biophys J* 73, 557-570.
- Kumagai, T., Katsumata, M., Hasegawa, A. y cols. 2003. Role of extracellular subdomains of p185c-neu and the epidermal growth factor receptor in ligand-independent association and transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9220-9225.
- Kuntz, ID. 1992. Structure-based strategies for drug design and discovery. *Science* 257, 1078-1082.
- Ladisch, S., Kitada, S. y Hays,EF. 1987. Gangliosides shed by tumor cells enhance tumor formation in mice. *J Clin Invest* 79, 1879-1882.
- Lamers, MH., Georgescu, RE., Lee, S., O'Donnell, M. and Kuriyan,J. 2006. Crystal structure of the catalytic alpha subunit of e. coli replicative dna polymerase III *Cell* 126, 881-892.
- Lammerts van Bueren, JJ., Bleeker, WK., Brännström, A. y cols. 2008. The antibody zalutumumab inhibits epidermal growth factor receptor signaling by limiting intra- and intermolecular flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6109-6114.
- Laskowski, RA., MacArthur, MW., Moss, DS. y cols. 1993. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst* 26, 283-291.
- Ledeen, RW. y Yu,RK. 1982. Gangliosides: structure, isolation, and analysis. *Methods*

Enzymol 83, 139-191.

- Lenz, H. 2006. Anti-EGFR mechanism of action: antitumor effect and underlying cause of adverse events. *Oncology (Williston Park)* 20, 5-13.
- Leslie, A. 1992. Recent changes to the mosflm package for processing film and image plate data Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography No. 26, .
- Li, S., Kussie, P. y Ferguson, KM. 2008. Structural basis for egf receptor inhibition by the therapeutic antibody IMC-11F8. *Structure* 16, 216-227.
- Li, S., Schmitz, KR., Jeffrey, PD. y cols. 2005. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 7, 301-311.
- Livingston, P. 1995. Approaches to augmenting the immunogenicity of melanoma gangliosides: from whole melanoma cells to ganglioside-klh conjugate vaccines *Immunol Rev* 145, 147-166.
- López-Requena, A., De Acosta, CM., Moreno, E. y cols. 2007a. Gangliosides, Ab1 and Ab2 antibodies i. towards a molecular dissection of an idioType-anti-idioType system. *Mol Immunol* 44, 423-433.
- López-Requena, A., Mateo de Acosta, C., Pérez, A. y cols. 2003. Chimeric anti-N-glycolyl-ganglioside and its anti-idiotypic mabs: immunodominance of their variable regions. *Hybrid Hybridomics* 22, 235-243.
- López-Requena, A., Rodríguez, M., de Acosta, CM. y cols. 2007b. Gangliosides, Ab1 and Ab2 antibodies II. light versus heavy chain: an idioType-anti-idioType case study. *Mol Immunol* 44, 1015-1028.
- Lu, D., Zhang, H., Koo, H. y cols. 2005. A fully human recombinant IgG-like bispecific antibody to both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor for enhanced antitumor activity. *J Biol Chem* 280, 19665-19672.
- Maccioni, H. 2007. Glycosylation of glycolipids in the golgi complex. *J Neurochem* 103 Suppl 1, 81-90.
- Malykh, YN., Krisch, B., Shaw, L. y cols. 2001. Distribution and localization of cmp-n-acetylneuraminic acid hydroxylase and N-glycolylneuraminic acid-containing glycoconjugates in porcine lymph node and peripheral blood lymphocytes. *Eur J Cell Biol* 80, 48-58.
- Marquina, G., Waki, H., Fernandez, LE. y cols. 1996. Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res* 56, 5165-5171.
- Mateo, C., Moreno, E., Amour, K. y cols. 1997. Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the epidermal growth factor receptor: recovery of antagonistic activity. *Immunotechnology* 3, 71-81.
- Miyake, M., Hashimoto, K., Ito, M., Ogawa, O., Arai, E., Hitomi, S. and Kannagi, R. 1990. The abnormal occurrence and the differentiation-dependent distribution of N-acetyl and N-glycolyl species of the ganglioside GM2 in human germ cell tumors. a study with specific monoclonal antibodies *Cancer* 65, 499-505.
- Miyoshi, I., Fujii, Y. y Naiki, M. 1982. Avian antisera to various gangliosides: detection by enzyme immunoassay. *J Biochem* 92, 89-94.
- Modak, S. y Cheung, NV. 2007. Disialoganglioside directed immunotherapy of

- neuroblastoma. *Cancer Invest* 25, 67-77.
- Moreno, E. y León, K. 2002. Geometric and chemical patterns of interaction in protein--ligand complexes and their application in docking. *Proteins* 47, 1-13.
- Moreno, E., Lanne, B., Vázquez, AM. y cols. 1998. Delineation of the epitope recognized by an antibody specific for n-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides. *Glycobiology* 8, 695-705.
- Morrison, SL., Johnson, MJ., Herzenberg, LA. y cols. 1984. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6851-6855.
- Mueller, BM., Romerdahl, CA., Gillies, SD. and Reisfeld, RA. 1990. Enhancement of antibody-dependent cytotoxicity with a chimeric anti-gd2 antibody *J Immunol* 144, 1382-1386.
- Nagai, Y. y Iwamori, M. 1984. Ganglioside distribution at different levels of organization and its biological implications. *Adv Exp Med Biol* 174, 135-146.
- Neninger, E., Díaz, RM., de la Torre, A. y cols. 2007. Active immunotherapy with 1E10 anti-idiotypic vaccine in patients with small cell lung cancer: report of a phase I trial. *Cancer Biol Ther* 6, 145-150.
- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O. y cols. 2002. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110, 775-787.
- Oliva, JP., Valdés, Z., Casacó, A. y cols. 2006. Clinical evidences of GM3 (NeuGc) ganglioside expression in human breast cancer using the 14f7 monoclonal antibody labelled with (99m)tc. *Breast Cancer Res Treat* 96, 115-121.
- Padlan, EA. 1994. Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 31, 169-217.
- Perera, RM., Zoncu, R., Johns, TG. y cols. 2007. Internalization, intracellular trafficking, and biodistribution of monoclonal antibody 806: a novel anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Neoplasia* 9, 1099-1110.
- Portoukalian, J., David, MJ., Gain, P. and Richard, M. 1993. Shedding of gd2 ganglioside in patients with retinoblastoma *Int J Cancer* 53, 948-951.
- Portoukalian, J., David, MJ., Shen, X., Richard, M. and Dubreuil, C. 1989. Tumor size-dependent elevations of serum gangliosides in patients with head and neck carcinomas. *Biochem Int* 18, 759-765.
- Portoukalian, J., Zwingelstein, G. and Doré, JF. 1979. Lipid composition of human malignant melanoma tumors at various levels of malignant growth. *Eur J Biochem* 94, 19-23.
- Prenzel, N., Fischer, OM., Streit, S., Hart, S. and Ullrich, A. 2001. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 8, 11-31.
- Ramos, TC., Figueredo, J., Catala, M. y cols. 2006. 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* 5, 375-379.
- Reglero, A., Hueso, P., Rodrigo, M. y cols. 1982. [gangliosides of neural and extraneural tissues of various species of mammals] *Rev Esp Fisiol* 38 *Suppl*, 37-43.
- Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. y cols. 1988. Reshaping human antibodies for

- therapy. *Nature* 332, 323-327.
- Rojas, G., Talavera, A., Munoz, Y., y cols. 2004. Light-chain shuffling results in successful phage display selection of functional prokaryotic-expressed antibody fragments to *N*-glycolyl GM3 ganglioside. *Journal of Immunological Methods* 293, 71 – 83.
- Roque-Navarro, L., Chakrabandhu, K., de León, J. y cols. 2008. Anti-ganglioside antibody-induced tumor cell death by loss of membrane integrity. *Mol Cancer Ther* 7, 2033-2041.
- Rossmann, M. and Blow, D. . The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallogr* 15, 24-31.
- Rubin Grandis, J., Melhem, MF., Gooding, WE., Day, R., Holst, VA., Wagener, MM., Drenning, SD. and Twardy, DJ. 1998. Levels of *tgf*-alpha and *egfr* protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival *J Natl Cancer Inst* 90, 824-832.
- Saif, MW. y Kim, R. 2007. Incidence and management of cutaneous toxicities associated with cetuximab. *Expert Opin Drug Saf* 6, 175-182.
- Sali, A. y Blundell, TL. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234, 779-815.
- Schmiedel, J., Blaukat, A., Li, S. y cols. 2008. Matuzumab binding to *egfr* prevents the conformational rearrangement required for dimerization. *Cancer Cell* 13, 365-373.
- Schmitz, KR. and Ferguson, KM. 2009. Interaction of antibodies with *ErbB* receptor extracellular regions. *Exp Cell Res* 315, 659-670.
- Scott, AM., Liu, Z., Murone, C. y cols. 2005. Immunological effects of chimeric anti-GD3 monoclonal antibody km871 in patients with metastatic melanoma. *Cancer Immun* 5, 3.
- Siebert, H., Reuter, G., Schauer, R. y cols. 1992. Solution conformations of GM3 gangliosides containing different sialic acid residues as revealed by noe-based distance mapping, molecular mechanics, and molecular dynamics calculations. *Biochemistry* 31, 6962-6971.
- Simon, T., Hero, B., Faldum, A. y cols. 2005. Infants with stage 4 neuroblastoma: the impact of the chimeric anti-gd2-antibody ch14.18 consolidation therapy. *Klin Padiatr* 217, 147-152.
- Simons, K. y Ikonen, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Sivasubramanian, A., Chao, G., Pressler, HM. y cols. 2006. Structural model of the mab 806-EGFR complex using computational docking followed by computational and experimental mutagenesis. *Structure* 14, 401-414.
- Sousa, S., Fernandes, P. and Ramos, M. 2006. Protein–ligand docking: current status and future challenges *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 65, 15–26.
- Spiegel, S. and Merrill, AHJ. 1996. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation *FASEB J* 10, 1388-1397.
- Stroop, CJ., Weber, W., Gerwig, GJ., y cols. 2000. Characterization of the carbohydrate chains of the secreted form of the human epidermal growth factor receptor

- Glycobiology 10, 901-917.
- Swaminathan, S., Furey, W., Pletcher, J. y cols. 1995. Residues defining  $\alpha$  and  $\beta$  specificity in staphylococcal enterotoxins. *Nat Struct Biol* 2, 680-686.
- Tangvoranuntakul, P., Gagneux, P., Diaz, S. y cols. 2003. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12045-12050.
- Todaro, GJ., De Larco, JE. y Cohen, S. 1976. Transformation by murine and feline sarcoma viruses specifically blocks binding of epidermal growth factor to cells. *Nature* 264, 26-31.
- Tramontano, A., Chothia, C. and Lesk, AM. 1990. Framework residue 71 is a major determinant of the position and conformation of the second hypervariable region in the VH domains of immunoglobulins. *J Mol Biol* 215, 175-182.
- Tsuchida, T., Ravindranath, MH., Saxton, RE. and Irie, RF. 1987. Gangliosides of human melanoma: altered expression in vivo and in vitro *Cancer Res* 47, 1278-1281.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, JS., y cols. 1984. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells *Nature* 309, 418-425.
- Usón, I. y Sheldrick, GM. 1999. Advances in direct methods for protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol* 9, 643-648.
- Usuki, S., Lyu, SC. and Sweeley, CC. 1988. Sialidase activities of cultured human fibroblasts and the metabolism of GM3 ganglioside. *J Biol Chem* 263, 6847-6853.
- Uttenreuther-Fischer, MM., Krüger, JA. y Fischer, P. 2006. Molecular characterization of the anti-idiotypic immune response of a relapse-free neuroblastoma patient following antibody therapy: a possible vaccine against tumors of neuroectodermal origin? *J Immunol* 176, 7775-7786.
- Vagin, A. y Teplyakov, A. 1997. Molrep: an automated program for molecular replacement *J. Appl. Cryst* 30, 1022-1025.
- Vázquez, AM., Alfonso, M., Lanne, B. y cols. 1995. Generation of a murine monoclonal antibody specific for *N*-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides that also recognizes sulfated glycolipids. *Hybridoma* 14, 551-556.
- Vázquez, AM., Gabri, MR., Hernández, AM., y cols. 2000. Antitumor properties of an anti-idiotypic monoclonal antibody in relation to *N*-glycolyl-containing gangliosides. *Oncol Rep* 7, 751-756.
- Vázquez, AM., Pérez, A., Hernández, AM. y cols. 1998. Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody. *Hybridoma* 17, 527-534.
- Wang, C., Schueler-Furman, O., Andre, I. y cols. 2007. RosettaDock in CAPRI rounds 6-12. *Proteins* 69, 758-763.
- Watarai, S., Kushi, Y., Shigeto, R., y cols. 1995. Production of monoclonal antibodies directed to human active gangliosides, *N*-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides *J Biochem* 117, 1062-1069.
- Whitelegg, NR. y Rees, AR. 2000. Wam: an improved algorithm for modelling antibodies on the web. *Protein Eng* 13, 819-824.

- Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., y cols. 1999. A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation Proc Natl Acad Sci U S A 96, 9142-9147.
- Zhang, H., Berezov, A., Wang, Q. y cols. 2007. Erbb receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. J Clin Invest 117, 2051-2058.
- Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., y cols. 2006. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor Cell 125, 1137-1149.